

## 종자 추출물의 항산화 활성 및 Tyrosinase 저해 활성 탐색

정진아, 권수현, 김영중, 신창섭<sup>1</sup>, 이철희\*

충북대학교 원예과학과 & 생물건강산업개발연구센터, <sup>1</sup>충북대학교 농업생명환경대학 부속학술림

### Investigation of Antioxidative and Tyrosinase Inhibitory Activities of the Seed Extracts

Jin-A Jeong, Su-Hyun Kwon, Young Jung Kim Chang-Seob Shin and Cheol Hee Lee\*

Dept. of Horticultural Science & Research Center for Bioresource and Health, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea  
<sup>1</sup>Scientific Forest, College of Agriculture, Life & Environment Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**Abstract** - Bioactive substances, antioxidant activities and tyrosinase inhibitory activities of seed extracts were evaluated to discover new functional materials, using 13 edible or medicinal plants. Total polyphenol and flavonoid contents were highest in *Taxus cuspidata*, with 57.51 mg · g<sup>-1</sup> and 7.98 mg · g<sup>-1</sup>, respectively. Seed extract of *Vitis coignetiae* × *Vitis labruscana* (RC<sub>50</sub>=0.030 mg · ml<sup>-1</sup>) was found to be the most effective in DPPH radical scavenging test, and the highest ABTS radical scavenging activity was shown in *Diospyros lotus* (RC<sub>50</sub>=0.044 mg · ml<sup>-1</sup>). Inhibitory effects on peroxidation of linoleic acid determined by ferric thiocyanate (FTC) method were similar to BHT in *Diospyros kaki*, *Diospyros lotus*, *Magnolia officinalis*, *Styrax obassia*, *Vitis coignetiae*, *Vitis coignetiae* × *Vitis labruscana*, *Zizyphus jujuba*, *Zizyphus jujuba* var. *inermis*. For the inhibition against mushroom tyrosinase, *Diospyros kaki*, *Diospyros lotus*, *Poncirus tritoliata*, *Prunus serrulata* var. *spontanea*, *Zizyphus jujuba* and *Zizyphus jujuba* var. *inermis* exhibited inhibitory activity, and especially *Diospyros lotus* showed the strongest inhibition.

**Key words** - Polyphenols, Flavonoids, Antioxidative effect, Tyrosinase inhibitory effect, Seed

### 서 언

인체 내에서 활성산소의 과산화반응으로 생성된 산화물들이 각종 질병의 주요 원인으로 밝혀짐에 따라 최근 활성산소를 조절할 수 있는 항산화물질의 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 생체막의 구성성분인 불포화 지방산이 산화되어 축적된 과산화지질은 생체기능을 저하시킴으로써 성인병 및 노화와 깊은 연관성을 지니는 것으로 알려지고 있다(Cha *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2001). 뿐만 아니라 불포화 지방산을 다량 함유한 음식물의 소비가 늘어가는 추세에서 지방산의 산화를 방지하기 위한 식품첨가제로써 항산화제의 중요성 또한 점점 높아지고 있다. 하지만 BHA(butylated hydroxyanisole)나 BHT(butylated hydroxytoluene)와 같은 인공적인 항산화제는 발암가능성과 같은 유독성이 제기되어 그 사용이 제한되고 있다(Jayaprakasha *et al.*, 2003). 그러므로 식물소재의 천연항산화제를 찾기

위한 노력들이 크게 증가하고 있는데, 지방종자, 곡류, 채소, 과일, 식물의 잎, 뿌리, 향신료 등 다양한 식물소재로부터 몇몇 천연 항산화물질이 분리되었다(Soong and Barlow, 2004).

일반적으로 유지를 많이 함유한 식물종자에는 항산화물질이 함유되어 있다고 알려져 있지만(Choi *et al.*, 1992), 그 밖의 종자는 다른 식물소재에 비하여 천연항산화제의 소재로서 그다지 주목을 받지 못한 편인데, 이는 지방종자를 제외하고는 그 생산성 및 대중성이 떨어지기 때문으로 생각된다. 그러나 최근 포도종자(Mielink *et al.*, 2006; Jayaprakasha *et al.*, 2003; Park and Oh, 2003; Lee *et al.*, 2002; Chung and Yoon, 2002)의 높은 항산화성이 밝혀짐에 따라 천연항산화제 또는 건강식품으로서의 활용연구가 활발히 진행되고 있으며, 연꽃(Rai *et al.*, 2006; Yen *et al.*, 2005), 석류(Koh *et al.*, 2005), 망고(Soong and Barlow, 2004), 감귤류(Giamperi *et al.*, 2004), 자운영(Yeom *et al.*, 2003), 토마토(Malecka, 2002), 오미자(Jung *et al.*, 2000), 홍화(Kim *et al.*, 2000) 등과 같은 식물종자에서도 항산화 및 항균활성이 보고되고 있다. 그러므로 종자 역시 식

\*교신저자(E-mail) : leech@chungbuk.ac.kr

품보조제로 소용될 수 있는 천연항산화제의 소재로서 연구할 만한 가치가 있는 것으로 여겨진다.

멜라닌은 동물, 식물 및 미생물에 걸쳐 널리 존재하는 페놀류의 고분자물질로 인체에서 자외선에 의한 피부손상을 막아주는 중요한 역할을 하지만, 멜라닌의 과잉생성은 얼굴의 탈색과 점, 주근깨, 과색소 침착과 같은 피부노화를 가져온다(Seo and Yoo, 2003). Tyrosinase는 멜라닌 생합성 과정의 key enzyme으로 melanocyte내의 melanosome에서 연속적인 산화반응을 일으켜 멜라닌을 생성하는 것으로 알려져 있다. 현재 미백제로서 멜라닌 생성의 억제에 이용되고 있는 ascorbic acid 및 그 유도체, kojic acid, arbutin 등은 모두 tyrosinase 저해제로 밝혀졌다(Lee *et al.*, 2001). 최근에는 천연물 유래의 미백제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 지금까지 보고된 바에 의하면 뽕나무(Wang *et al.*, 2006), 녹차(Kim *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2005), 감초(Lee *et al.*, 2003), 고삼뿌리(Kim, 2003), 자리공뿌리(Lee *et al.*, 2001), 석이버섯(Park and Chang, 1997) 등에서 tyrosinase 저해활성이 밝혀졌다. 또한 종자 중에서는 나팔꽃의 종자(Wang *et al.*, 2006)가 높은 tyrosinase 저해활성을 지닌 것으로 보고되었다

본 연구는 과일로서 대중적으로 소비되고 있는 감나무와 대추나무를 비롯하여 고욤나무, 탕자나무, 벗나무, 뿔대추나무, 머루 등의 야생과수, 머루×'캠벨얼리'의 교잡종, 그리고 쥐똥나무, 당후박나무, 쪽동백나무, 주목, 산초나무와 같은 약용식물의 종자추출물을 각각 조제하여 이들의 항산화활성과 tyrosinase 저해활성을 조사함으로써 새로운 식물소재의 항산화제 또는 미백물질을 탐색하기 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 및 추출물의 조제

본 실험에 사용된 종자는 2005년 6월에서 10월에 걸쳐 채취하였으며(Table 1), 과피와 과육을 제거한 후 수돗물로 깨끗이 수세하고 60℃에서 건조시킨 후 분쇄기(FM-681C, 한일전기주식회사, Korea)로 곱게 갈아 사용하기 전까지 -70℃에 보관하였다. 추출은 분말시료를 일정량 취한 후 50배 양의 80% 에탄올을 첨가하여 60℃ 수욕상에서 순환냉각장치를 이용하여 6시간 동안 실시하였다. 각 추출시료 5ml를 증발접시에 취하여 drying oven(KPI-507L, Korea)에서 완전히 건조시킨 후 잔사의 무게를 측정하여 분말시료 건조중량에 대한 가용성고형분의 함량으로 추출수율을 구하였다.

### 시약 및 기기

추출물 조제에 사용된 에탄올은 일급시약을 사용하였으며,

ABTS[2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfoic acid)], DPPH(1,1-diphenylpicryl-2-hydrazyl), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, linoleic acid, BHT(butylated hydroxytoluene), mushroom tyrosinase 등 분석에 사용된 시약은 Sigma 제품이였다. 흡광도 측정에는 Ultrospec 4000 (Pharmacia Biotech, Sweden)을 사용하였으며, linoleic acid 과산화저해 실험에는 VS-9108MS incubator(Vision Scientific Co., Korea)를 사용하였다.

### 총 폴리페놀 함량

건조시료 g당 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약을 이용하여 측정하였다(Velioglu *et al.*, 1998). 추출물 희석액 0.1ml에 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액을 2ml를 첨가하고 3분 후에 Folin-Ciocalteu 시약 0.1ml를 혼합·발색시키고 30분간 정치한 후 750nm에서 흡광도를 측정하였다. Tannic acid를 표준물질로 이용하여 검량선을 작성한 후 총 폴리페놀 함량을 tannic acid 기준으로 환산하였다.

### 총 플라보노이드 함량

건조시료 g당 총 플라보노이드 함량은 diethylene glycol 비색법을 이용하여 정량하였다(NFRI, 1990). 추출물 희석액 0.2ml에 diethylene glycol 2ml를 첨가하고 1N NaOH 0.2ml를 첨가하였다. 이를 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. Naringin을 표준물질로 이용하여 검량선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 naringin 기준으로 환산하였다.

### DPPH radical 소거활성

DPPH는 0.15mM의 농도로 99.9% 에탄올에 녹여 사용하였으며, DPPH 용액 0.8ml에 여러 농도의 시료 0.2ml를 각각 혼합하여 30분 후에 517nm에서 흡광도를 측정하였다(Blois, 1958). DPPH 자유 라디칼에 대한 소거능(RC<sub>50</sub>)은 용매만을 사용한 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 농도로 나타내었으며, 소거효과의 비교를 위한 양성 대조군으로는 ascorbic acid와 BHT를 사용하였다.

### ABTS radical 소거활성

ABTS 라디칼을 이용한 항산화력 측정은 ABTS<sup>+</sup>cation decolorization assay방법에 의하여 실시하였다(Roberta *et al.*, 1999). 최종농도를 7.4mM ABTS와 2.6mM potassium persulfate로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS<sup>+</sup>를 형성시킨 후 732nm에서 흡광도 값이 1.4~1.5가 되도록 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 희석하

였다. 희석된 ABTS 용액 950 $\mu$ l에 시료를 농도별로 50 $\mu$ l씩 첨가한 후 10분 후에 732nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 자유라디칼에 대한 소거능(RC<sub>50</sub>)은 용매만을 사용한 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 농도로 나타내었으며, 소거효과의 비교를 위한 대조군으로는 ascorbic acid와 BHT를 사용하였다.

**Linoleic acid에 대한 항산화 효과**

Linoleic acid의 과산화에 대한 저해효과를 알아보기 위한 실험에서 반응액은 99.9% 에탄올에 녹인 2.51% linoleic acid 0.5ml, 0.05M phosphate buffer(pH 7.0) 1ml, 증류수 0.5ml, 그리고 최종농도가 25 $\mu$ g · ml<sup>-1</sup>가 되도록 조제한 시료 0.5ml로 조성하였으며, 뚜껑을 닫은 후 40℃의 압소에서 반응시켰다. 시료의 산화방지효과는 ferric thiocyanate(FTC)방법으로 측정하였는데(Haraguchi *et al.*, 1992), 8일을 주기로 반응액 0.1ml를 취하여 75% 에탄올 2.7ml, 30% ammonium thiocyanate 0.1ml, 3.5% HCl에 녹인 0.02M ferrous chloride 0.1ml와 혼합한 후 500nm에서 흡광도를 측정하였다. Linoleic acid의 과산화 저해율은 반응 16일째 용매만을 사용한 대조군의 흡광도에서 시료 첨가군의 흡광도 값을 뺀 값을 대조군의 흡광도 값으로 나눈 값의 백분율로 산출하였다.

**Tyrosinase 억제활성**

1/15M sodium phosphate buffer(pH 6.8)를 반응물의 용매로 사용하였으며, 5mM L-DOPA 200 $\mu$ l, tyrosinase(100 unit · ml<sup>-1</sup>) 200 $\mu$ l, 추출시료 200 $\mu$ l(4mg · ml<sup>-1</sup>), phosphate buffer(pH 6.8) 400 $\mu$ l를 혼합한 후 37℃에서 30분간 반응시키고 ice 상에서 반응을 정지시킨 후 475nm에서 흡광도를 측정하였다(Yagi *et al.*, 1986). Tyrosinase의 억제정도는 시료 첨가

하지 않은 반응물의 흡광도 값에서 시료를 첨가한 반응물의 흡광도 값과 효소 대신 buffer를 첨가한 대조군의 흡광도 값을 제하고 이를 시료를 첨가하지 않은 반응물의 흡광도 값으로 나눈 값의 백분율로 산출하였다.

**통계분석**

모든 실험은 2회 이상 반복하여 실시하였으며, SAS 9.1 프로그램을 이용하여 평균치와 표준오차로 표시하였다. 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량, DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능 그리고 지질산화 억제활성 간의 상호연관성은 단순 회귀 분석을 실시하여 검토하였다.

**결과 및 고찰**

고욤, 머루, 대추를 비롯하여 쥐똥나무, 탕자나무, 쪽동백나무에서 각각의 열매는 한방 또는 민간에서 약재로 쓰이며, 당후박나무는 나무껍질을, 산초나무는 열매껍질을 약재로 사용한다. 또한 땃대추나무의 종자는 산조인(酸棗仁)이라 하여 한방에서 건위 · 진정 · 최면제로 사용되며, 중국에서는 땃나무 핵과(核果)의 인(仁)을 약용하는 것으로 알려져 있다. 이처럼 식물의 일부를 식용 또는 약용하는 13종의 자원식물에서 종자추출물을 조제하여 기능성성분의 함량과 항산화 활성 그리고 미백활성을 검토하였다.

80% 에탄올을 이용하여 조추출물을 조제한 결과, 쥐똥나무, 주목, 탕자나무의 종자에서 추출수율이 15.65~24.20%로 높았으며, 대추나무, 땃나무, 땃대추나무, 머루 × ‘캠벨얼리’ 교배종의 종자에서 0.95~3.35%로 추출수율이 낮게 나타났다(Table 1).

식물체내에 널리 존재하는 페놀성 화합물의 phenolic

Table 1. List of plants used this study and extraction yield from seeds

Scientific name	Korean name	Collection time	Extraction yield (%)
<i>Diospyros kaki</i>	감나무	Oct. 2005	7.00
<i>Diospyros lotus</i>	고욤나무	Oct. 2005	6.35
<i>Ligustrum obtusifolium</i>	쥐똥나무	Oct. 2005	24.20
<i>Magnolia officinalis</i>	당후박나무	Oct. 2005	6.25
<i>Poncirus tritoliata</i>	탕자나무	Oct. 2005	15.65
<i>Prunus serrulata var. spontanea</i>	땃나무	Jun. 2005	2.60
<i>Styrax obassia</i>	쪽동백나무	Sep. 2005	8.55
<i>Taxus cuspidata</i>	주목	Oct. 2005	18.65
<i>Vitis coignetiae</i>	머루	Sep. 2005	6.60
<i>Vitis coignetiae</i> × <i>Vitis labruscana</i>	머루 × ‘캠벨얼리’	Sep. 2005	3.35
<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	산초나무	Sep. 2005	3.70
<i>Zizyphus jujuba</i>	땃대추나무	Sep. 2005	3.35
<i>Zizyphus jujuba var. inermis</i>	대추나무	Oct. 2005	0.95

hydroxyl기는 단백질 및 거대분자들과 쉽게 결합하기 때문에 항산화, 항암 등 다양한 생리활성을 지니는 것으로 알려져 있다 (Lee et al., 2005). 각각의 종자에서 건조중량 당 총 폴리페놀 함량을 조사한 결과, 주목에서 57.51mg · g<sup>-1</sup>으로 가장 높았고, 머루× '캠벨얼리' 교배종, 머루, 고욤나무의 종자에서도 44.36 mg · g<sup>-1</sup> 이상 비교적 높게 나타났다(Table 2). 반면 탕자나무, 뽕나무, 산초나무의 종자는 총 폴리페놀 함량이 3.94~8.33 mg · g<sup>-1</sup>으로 낮았다. 총 플라보노이드 함량은 총 폴리페놀 함량과 높은 연관성을 보였는데, 주목에서 7.98mg · g<sup>-1</sup>으로 함량이 가장 높았고, 머루× '캠벨얼리' 교배종과 머루에서도 비교적 높게 나타났다. 그러나 뽕나무의 종자는 함량이 0.04mg · g<sup>-1</sup>으로 플라보노이드를 거의 함유하지 않은 것으로 분석되었다.

종자추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 조사한 결과, 50%의

소거활성을 보이는 추출물의 농도 RC<sub>50</sub>은 머루× '캠벨얼리' 교배종에서 0.03mg · ml<sup>-1</sup>로 조사되어 가장 높은 라디칼 소거활성을 보였다(Table 3). 그 뒤를 이어 고욤종자 추출물에서 RC<sub>50</sub> 값이 0.044mg · ml<sup>-1</sup>로 높은 소거활성을 보였으며, 머루와 감나무의 종자 또한 DPPH 라디칼 소거활성이 비교적 높은 것으로 조사되었다. 반면, 탕자나무나 뽕나무 종자는 RC<sub>50</sub>값이 각각 6.564mg · ml<sup>-1</sup> 및 3.515mg · ml<sup>-1</sup>로 조사되어 DPPH 라디칼 소거활성이 매우 낮음을 알 수 있었다.

ABTS 라디칼 소거활성은 DPPH 라디칼 소거활성에서 나타난 결과와 유사한 양상을 보였는데, 고욤종자에서 RC<sub>50</sub>값이 0.109mg · ml<sup>-1</sup>로 조사되어 가장 높은 소거활성을 보였다. 그 뒤를 이어 머루× '캠벨얼리' 교배종 및 대추의 종자가 각각 0.113mg · ml<sup>-1</sup>와 0.125mg · ml<sup>-1</sup>의 RC<sub>50</sub>값을 지녀 ascorbic

Table 2. Content of total polyphenols and flavonoids in seeds

Sample	Total polyphenols (mg · g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Total flavonoids (mg · g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
<i>Diospyros kaki</i>	26.75 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.13 ± 0.10
<i>Diospyros lotus</i>	44.36 ± 0.23	3.45 ± 0.49
<i>Ligustrum obtusitolum</i>	39.56 ± 0.57	3.54 ± 0.04
<i>Magnolia officinalis</i>	22.25 ± 0.02	2.61 ± 0.08
<i>Poncirus tritoliata</i>	3.94 ± 0.12	1.48 ± 0.09
<i>Prunus serrulata</i> var. <i>spontanea</i>	6.54 ± 0.65	0.04 ± 0.00
<i>Styrax obassia</i>	18.19 ± 0.63	2.71 ± 0.06
<i>Taxus cuspidata</i>	57.51 ± 0.03	7.98 ± 0.58
<i>Vitis coignetiae</i>	46.53 ± 0.54	4.14 ± 0.34
<i>Vitis coignetiae</i> × <i>Vitis labruscana</i>	51.07 ± 1.41	4.20 ± 0.14
<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	8.33 ± 0.42	0.37 ± 0.12
<i>Zizyphus jujuba</i>	14.60 ± 0.72	0.96 ± 0.14
<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	11.27 ± 0.40	0.52 ± 0.05

<sup>a</sup>Milligrams of total polyphenol content per g of seed on tannic acid as standard.

<sup>b</sup>Milligrams of total flavonoid content per g of seed on naringin as standard.

<sup>c</sup>Values are mean ± S.E.

Table 3. Radical scavenging activities of 80% ethanol extracts from seeds

Sample	DPPH (RC <sub>50</sub> , mg · ml <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	ABTS (RC <sub>50</sub> , mg · ml <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
Ascorbic acid	0.026 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.199 ± 0.009
BHT	0.121 ± 0.003	0.217 ± 0.004
<i>Diospyros kaki</i>	0.081 ± 0.001	0.833 ± 0.095
<i>Diospyros lotus</i>	0.044 ± 0.000	0.109 ± 0.012
<i>Ligustrum obtusitolum</i>	0.633 ± 0.017	0.812 ± 0.024
<i>Magnolia officinalis</i>	0.117 ± 0.005	0.283 ± 0.057
<i>Poncirus tritoliata</i>	6.564 ± 0.051	5.277 ± 0.434
<i>Prunus serrulata</i> var. <i>spontanea</i>	3.515 ± 0.055	2.369 ± 0.356
<i>Styrax obassia</i>	0.399 ± 0.040	0.856 ± 0.002
<i>Taxus cuspidata</i>	0.100 ± 0.003	0.272 ± 0.016
<i>Vitis coignetiae</i>	0.071 ± 0.000	0.220 ± 0.005
<i>Vitis coignetiae</i> × <i>Vitis labruscana</i>	0.030 ± 0.004	0.113 ± 0.011
<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	1.458 ± 0.202	0.776 ± 0.137
<i>Zizyphus jujuba</i>	0.190 ± 0.001	0.764 ± 0.245
<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	0.122 ± 0.021	0.125 ± 0.048

<sup>a</sup>Concentration required for 50% reduction of DPPH · at 30 min after starting the reaction.

<sup>b</sup>Concentration required for 50% reduction of ABTS+ · at 10 min after starting the reaction.

<sup>c</sup>Values are mean ± S.E.

acid( $RC_{50}=0.199\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) 및 BHT( $RC_{50}=0.217\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) 보다 높은 소거활성을 나타냈다. 반면 DPPH 라디칼 소거능처럼 탱자나무와 벧나무의 종자는  $RC_{50}$ 값이 각각  $5.277\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  및  $2.369\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 로 조사되어 이들 추출물은 라디칼 소거활성이 매우 낮은 것으로 확인되었다.

Ferric thiocyanate(FTC)방법은 지질산화 초기에 생성되는 과산화물의 양을 측정하여 산화의 정도를 측정하는 것으로 (Haraguchi *et al.*, 1992), 형성된 과산화물은 ferrous chloride와 반응하여 붉은색의 ferric chloride 색소를 생성한다. 본 실험에서는 시료의 최종 농도를  $0.05\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 로 하여 linoleic acid와 반응시킨 후 8일 간격으로 흡광도를 측정하여 과산화물 생성량을 조사하였다. 시료를 첨가하지 않고 용매만으로 측정한 대조구(control)의 경우 반응 8일째에 지질산화에 의한 과산화물의 생성으로 흡광도가 3.659로 높게 측정되었으나, BHT를 비롯하여 종자추출물의 첨가구는 흡광도가  $0.357 \sim 0.497$ 로 지질산화가 억제되었음을 확인할 수 있었다(Table 4). 16일이 경과하자 탱자나무의 종자추출물에서 흡광도가 3.792로 높게 측정되었으며, 벧나무에서도 흡광도가 1.105로 과산화물의 생성을 확인할 수 있었다. 24일이 지나자 대조구의 흡광도가 2.558로 감소되었는데, 이는 지질산화 초기에 생성된 과산화물이 저분자 화합물로 분해되었기 때문인 것으로 보인다. 24일째에 벧나무와 탱자나무 종자추출물에서 흡광도가 각각 3.588과 3.178로 높게 측정되었고, 주목, 산초나무, 쥐똥나무 또한 흡광도가 각각 1.403, 0.875, 0.709로 지질산화가 진행되었음을 알 수 있었다. 반응 32일째가 되자 BHT 처리구의 흡광도는 0.521이었고, 감나무, 고욤나무, 당후박나무, 쪽동백나무, 머루, 머루×'캠벨엘리' 교배종, 땃대추나무, 대추나무의 종자추출물에서 흡

광도는  $0.379 \sim 0.657$ 로 지질산화가 억제되었음을 확인할 수 있었다. 반면, 쥐똥나무, 탱자나무, 벧나무, 주목, 산초나무의 종자추출물에서 흡광도는 2.230~3.714로 높게 측정되었다.

반응 16일째에 측정된 대조구의 흡광도 값을 기준으로 하여 각각 처리구의 지질산화 억제율을 산출한 결과, 당후박나무의 종자추출물에서 89.07%로 BHT의 87.06% 보다 다소 높은 산화억제율을 나타냈다(Fig. 1). 그 밖에 쪽동백나무, 머루, 땃대추나무, 대추나무의 종자추출물에서도 88% 이상 높은 억제율을 보였다. 반면 탱자나무의 경우 -4.8%로 지질산화 억제활성을 전혀 보이지 않았으며, 벧나무의 경우 산화억제율은 69.47%에 그쳤다.

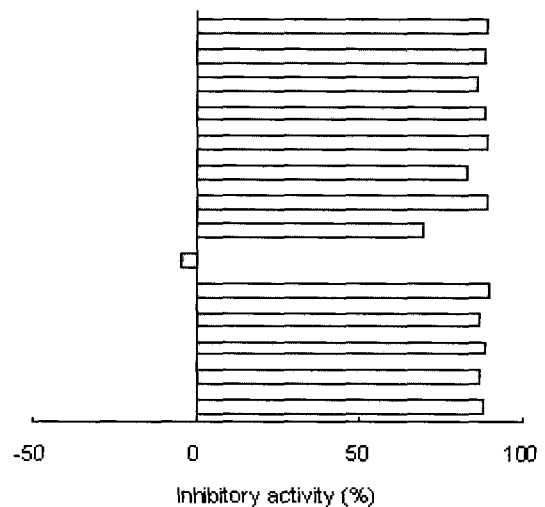


Fig. 1. Inhibitory activity of seed extracts and BHT against the oxidation of linoleic acid as measured by the thiocyanate method at 16 days. The final concentration of all tested sample was  $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Table 4. Inhibitory effects of 80% ethanol extracts from seeds on the oxidation of linoleic acid as measured by the thiocyanate method

Sample <sup>a</sup>	Incubation period (days)				
	0	8	16	24	32
Control	0.301 ± 0.003 <sup>b</sup>	3.659 ± 0.012	3.618 ± 0.076	2.558 ± 0.097	1.969 ± 0.068
BHT	0.306 ± 0.016	0.374 ± 0.012	0.460 ± 0.027	0.416 ± 0.006	0.521 ± 0.026
<i>Diospyros kaki</i>	0.300 ± 0.015	0.412 ± 0.014	0.496 ± 0.013	0.510 ± 0.016	0.657 ± 0.006
<i>Diospyros lotus</i>	0.298 ± 0.008	0.364 ± 0.007	0.446 ± 0.002	0.382 ± 0.015	0.462 ± 0.009
<i>Ligustrum obtusifolium</i>	0.324 ± 0.029	0.370 ± 0.010	0.502 ± 0.018	0.709 ± 0.032	2.230 ± 0.103
<i>Magnolia officinalis</i>	0.311 ± 0.009	0.354 ± 0.015	0.396 ± 0.010	0.320 ± 0.013	0.379 ± 0.004
<i>Poncirus tritoliata</i>	0.296 ± 0.027	3.629 ± 0.035	3.792 ± 0.070	3.178 ± 0.140	2.455 ± 0.102
<i>Prunus serrulata</i> var. <i>spontanea</i>	0.324 ± 0.008	0.497 ± 0.036	1.105 ± 0.013	3.588 ± 0.003	2.865 ± 0.084
<i>Styx obassia</i>	0.274 ± 0.007	0.357 ± 0.007	0.414 ± 0.026	0.356 ± 0.020	0.446 ± 0.006
<i>Taxus cuspidata</i>	0.304 ± 0.022	0.459 ± 0.018	0.638 ± 0.024	1.403 ± 0.077	3.595 ± 0.043
<i>Vitis coignetiae</i>	0.302 ± 0.004	0.373 ± 0.026	0.420 ± 0.007	0.338 ± 0.016	0.397 ± 0.008
<i>Vitis coignetiae</i> × <i>Vitis labruscana</i>	0.294 ± 0.000	0.386 ± 0.014	0.444 ± 0.011	0.360 ± 0.015	0.403 ± 0.017
<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	0.293 ± 0.018	0.375 ± 0.010	0.516 ± 0.031	0.857 ± 0.041	3.714 ± 0.030
<i>Zizyphus jujuba</i>	0.269 ± 0.007	0.376 ± 0.016	0.434 ± 0.016	0.383 ± 0.031	0.473 ± 0.022
<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	0.316 ± 0.009	0.368 ± 0.016	0.417 ± 0.011	0.349 ± 0.021	0.418 ± 0.002

<sup>a</sup>The final concentration of all tested sample was  $25 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ .

<sup>b</sup>Values are mean ± S.E of absorbance at 500 nm.

총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량, DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능, 그리고 지질산화 억제율 간의 상호관련성을 분석하였다. 그 결과 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량은  $R^2=0.81$ 로 높은 연관성을 보여(Fig. 2), 대부분 식물에서 폴리페놀 함량이 높을 경우 플라보노이드 함량이 높았다는 Choi 등(2005)의 결과와 유사하였다. DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능 또한  $R^2=0.95$ 로 높은 연관성을 보였는데, Lee 등(2005)의 보고에서도 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능은  $R^2=0.76$ 의 상관관계를 보였다고 하였다. 총 폴리페놀 함량과 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능은 각각  $R^2=0.32$ ,  $R^2=0.31$ 로 연관성이 낮은 편이었으며, 플라보노이드 함량과 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성은 각각  $R^2=0.15$ ,  $R^2=0.13$ 로 연관성이 거의 없는 것으로 분석되었다(data not shown). Lee 등(2005)의 보고에서도 플라보노이드 함량과 자유 라디칼 소거능 사이에는 상관관계가 없었다고 하였다. 지질산화 억제활성은 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능과 각각  $R^2=0.88$ ,  $R^2=0.92$ 로 높은 연관성을 보인 반면, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과는 각각  $R^2=0.17$ ,  $R^2=0.04$ 로 연관성이 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나 Choi 등(2005)은 천연물의 폴리페놀 함량과 TBARS(Thiobarbituric

acid reactive substances) 생성 억제능의 연관성은  $R^2=0.12$ 로 낮았지만, 폴리페놀 함량과 라디칼 소거능은  $R^2=0.61$ 로 상관관계를 보였다고 하였다. 또한 Kim 등(2004)은 약용식물의 항산화활성 탐색에서 총 폴리페놀 함량과 지질산화 억제활성 간에  $R^2=0.74$ 의 높은 연관성을 보였고, 총 폴리페놀 함량과 수소이온 및 superoxide 라디칼 소거능과도 각각  $R^2=0.85$ ,  $R^2=0.74$ 의 높은 연관성이 있었다고 하였다. 본 실험에서는 식물종자의 폴리페놀 함량이  $10\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  이하로 낮을 경우 라디칼 소거능이나 지질산화 억제활성 역시 낮은 편이었지만, 폴리페놀 함량이 일정량 이상이 되면 항산화활성에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. Lee 등(2005)에 의하면 폴리페놀 함량과 자유 라디칼 소거능은 높은 연관성( $R^2=0.82$ )을 보이지만, 일정 농도를 기준으로 라디칼 소거능이 급격히 감소하였다고 하였다.

이러한 실험결과를 고려하면 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성과 지질산화 억제활성은 대체적으로 비례관계에 있는 것으로 보이며, 총 폴리페놀 함량은 라디칼 소거능 및 지질산화 억제활성 등의 항산화활성에 영향을 미치지 않지만 일정 함량 이상의 농도에서 관여하는 것으로 생각되었다.

13종의 종자추출물에서 tyrosinase 억제활성을 조사한 결과,

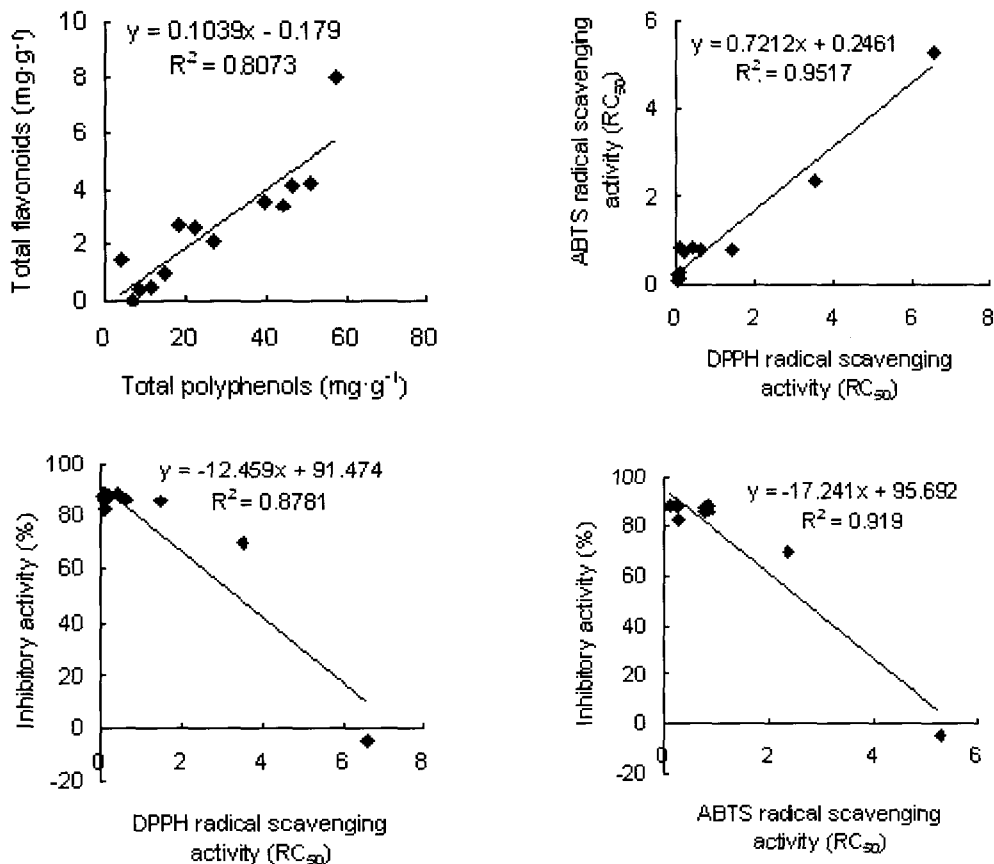


Fig. 2. Correlations among functional compounds, radical scavenging activities and antioxidative activity.

4mg · ml<sup>-1</sup>의 농도를 이용한 실험에서 감나무, 고욤나무, 탕자나무, 벗나무, 뿔대추나무, 대추나무에서만 활성이 나타났으며, 그 나머지 종자추출물에서는 오히려 tyrosinase 활성이 촉진되는 결과를 보였다(data not shown). Tyrosinase 억제활성은 특히 고욤나무의 종자추출물에서 46.7%로 가장 높았으며, 그 다음은 대추의 종자로 44.4%의 억제활성을 나타냈다(Fig. 3). 감과 뿔대추의 종자추출물은 각각 23.0 및 20.3%의 억제활성을 보인 반면 탕자나무와 벗나무의 경우 tyrosinase 억제활성은 매우 미미한 수준이었다.

본 실험결과에서 ascorbic acid 및 BHT에 준하는 항산화활성을 가진 것으로 나타난 머루 × ‘캠벨얼리’ 교배종의 종자와 항산화활성 및 미백활성을 가진 것으로 확인된 고욤나무 종자는 천연기능성 소재로서 개발가능성이 높은 것으로 생각되었다.

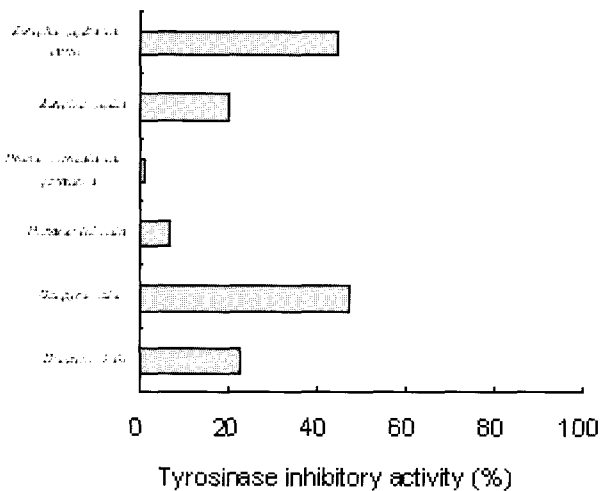


Fig. 3. Tyrosinase inhibitory activity of seed extracts at 4 mg · ml<sup>-1</sup>.

## 적 요

새로운 기능성 소재를 탐색하기 위하여, 13종의 식용 및 약용 식물의 종자추출물을 조제하여 생리활성물질 함량, 항산화활성 그리고 tyrosinase 억제활성을 분석하였다. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 주목에서 각각 57.51mg · g<sup>-1</sup>과 7.98mg · g<sup>-1</sup>으로 가장 높게 나타났다. 종자추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 머루 × ‘캠벨얼리’ 교배종에서 RC<sub>50</sub>이 0.03mg · ml<sup>-1</sup>로 가장 높았고, ABTS 라디칼 소거활성은 고욤나무 종자에서 RC<sub>50</sub>이 0.109mg · ml<sup>-1</sup>로 가장 높게 나타났다. Ferric thiocyanate (FTC) 방법으로 linoleic acid에 대한 과산화 억제효과를 조사한 결과, 감나무, 고욤나무, 당후박나무, 쪽동백나무, 머루, 머루 × ‘캠벨얼리’ 교배종, 뿔대추나무, 대추나무의 종자추출물에서 BHT와 유사한 수준의 억제활성을 보였다. 종자추출물의 tyrosinase 억제활성은 감나무, 고욤나무, 탕자나무, 벗나무,

뿔대추나무, 대추나무에서만 나타났으며, 특히 고욤나무에서 가장 높았다.

## 사 사

본 연구는 산업자원부 · 한국산업기술평가원지원의 지역협력 연구센터인 충북대학교 생물건강산업개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

## 인용문헌

- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1198-1204.
- Cha, C.C., S.K. Lee, H.W. Lee and E. Lee. 1997. Antioxidative effect of domestic plants. *Kor. J. Pharmacogn.* 28: 15-20.
- Cho, S.Y., Y.B. Han and K.H. Shin. 2001. Screening for antioxidant activity of edible plants. *Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 133-137.
- Choi, S.Y., S.H. Lim, J.S. Kim, T.Y. Ha, S.R. Kim, K.S. Kang and I.K. Hwang. 2005. Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 37: 549-556.
- Choi, U., D.H. Shin, Y.S. Chang and J.I. Shin. 1992. Screening of natural antioxidant from plant and their antioxidative effect. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 24: 142-148.
- Chung, H.Y. and S.J. Yoon. 2002. Antioxidant activity of grape seed ethanol extract according to serial solvent fractionation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 1092-1096.
- Giamperi, L., D. Fraternali, A. Bucchini and D. Ricci. 2004. Antioxidant activity of *Citrus paradisi* seeds glyceric extract. *Fitoterapia* 75: 221-224.
- Haraguchi H., K. Hashimoto and A. Yagi. 1992. Antioxidative substances in leaves of *Polygonum hydropiper*. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1349-1351.
- Jayaprakasha, G.K., T. Selvi and K.K. Sakariah. 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res. Int.* 36: 117-122.
- Kim, E.Y., I.H. Baik, J.H. Kim, S.R. Kim and M.R. Rhyu. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 36: 333-338.
- Kim, H.J., B.S. Jun, S.K. Kim, J.Y. Cha and Y.S. Cho. 2000. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout, and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J. Kor. Soc. Food Sci.* 29: 1127-1132.

- Kim, J.H., W.S. Cha, J. H. Park, S.L. Oh, Y.J. Cho, S.S. Chun and C. Choi. 1997. Inhibition effect against tyrosinase of condensed tannins from Korean green tea. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 29: 173-177.
- Kim, S.H. S.R. Kim, H.J. Lee, J.C. Kim, J.S. Jang, C.M. Kang, S.Y. Ryu and S.K. Jo. 2005. The effect of green tea extract on epidermal melanocytes in ultraviolet B-irradiated mice. *Lab. Animal Res.* 21: 49-54.
- Kim, S.J., M.Y. Heo, K.H. Son and H.P. Kim. 2003. Tyrosinase inhibitory activity of 80 plant extracts ( II ). *J. Appl. Pharmac.* 11: 5-7.
- Koh, J.H., M.O. Hwang, J.S. Moon, S.Y. Hwang and J.Y. Son. 2005. Antioxidative and antimicrobial activities of pomegranate seed extracts. *Kor. J. Food Cookery Sci.* 21: 171-179.
- Lee, J.S. J.A. Kim, S.H. Cho, A.R. Son, T.S. Jang, M.S. So, S.R. Chung and S.H. Lee. 2003. Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Glycyrrhiza glabra* L. *Kor. J. Pharmacogn.* 34: 33-39.
- Lee, N.H., S.J. Lee, D.S. Jung, H.J. Bu, H.C. Yang and K.Z. Riu. 2001. Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities, and radical scavenging effects using plants in Cheju. *Kor. J. Pharmacogn.* 32: 175-180.
- Lee, S.O., H.J. Lee, M.H. Yu, H.G. Im and I.S. Lee. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Kor. J. Food Technol.* 37: 233-240.
- Lee, Y.C., H.J. Hwang and S.S. Oh. 2002. Antioxidative properties of grape seeds extracts. *Food Eng. Prog.* 6: 165-171.
- Malecka, M. 2002. Antioxidant properties of the unsaponifiable matter isolated from tomato seeds, oat grains and wheat germ oil. *Food Chem.* 79: 327-330.
- Mielnik, M.B., E. Olsen, G. Vogt, D. Adeline and G. Skrede. 2006. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *LWT* 39: 191-198.
- NFRI. 1990. Manuals of Quality Characteristic Analysis for Food Quality Evaluation (2). National Food Research Institute, Tsukuba, Japan, pp. 61.
- Park, S.J. and D.H. Oh. 2003. Free radical scavenging effect of seed and skin extracts of black olympia grape (*Vitis labruscana* L.). *J. Kor. Soc. Food Sci.* 35: 121-124.
- Park, Y.H. and S.K. Chang. 1997. Screening of inhibitory effect of edible mushrooms on tyrosinase and isolation of active component. *J. Fd Hyg. Safety* 12: 195-199.
- Rai, S., A. Wahile, K. Mukherjee, B.P. Saha and P.K. Mukherjee. 2006. Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *J. Ethnopharmacology* 104: 322-327.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. & Med.* 26: 1231-1237.
- Seo, Y.W. and J.S. Yoo. 2003. Screening for antioxidizing and tyrosinase-inhibitory activities of the extracts of marine algae from Busan coastal area. *Ocean Polar Res.* 25: 129-132.
- Soong, Y.Y. and P.J. Barlow. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem.* 88: 411-417.
- Velioglu, Y.S., G. Mazza, L. Cao and B.D. Oomah. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4113-4117.
- Wang, K.H., R.D. Lin, F.L. Hsu, Y.H. Huang, H.C. Chang, C.Y. Huang and M.H. Lee. 2006. Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *J. Ethnopharmacology* 106: 353-359.
- Yagi, A., T. Kanbara and N. Morinobu. 1986. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica* 3981: 517-519.
- Yen, G.C., P.D. Duh and H.J. Su. 2005. Antioxidant properties of lotus seed and its effect on DNA damage in human lymphocytes. *Food Chem.* 89: 379-385.
- Yeom, S.H., M.K. Kim, H.J. Kim, J.G. Shim, J.H. Lee and M.W. Lee. 2003. Phenolic compounds from seeds of *Astragalus sinicus* and its antioxidative activities. *Kor. J. Pharmacogn.* 34: 344-351.

(접수일 2006. 12. 19 ; 수락일 2007. 3. 14)