

해당화 열매 성숙단계에 따른 생리활성 및 기능성 물질 변화 분석

곽민정 · 엄승희 · 길진수 · 김주성 · 현태경

Variation in bioactive principles and bioactive compounds of *Rosa rugosa* fruit during ripening

Minjeong Kwak · Seung Hee Eom · Jinsu Gil · Ju-Sung Kim · Tae Kyung Hyun

Received: 22 August 2019 / Revised: 29 August 2019 / Accepted: 30 August 2019

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Fruit ripening is a genetically programmed process involving a number of biochemical and physiological processes assisted by variations in gene expression and enzyme activities. This process generally affects the phytochemical profile and the bioactive principles in fruits and vegetables. To appraise the variation in bioactive principles of fruits from *Rosa rugosa* during its ripening process, we analyzed the changes in antioxidant and anti-elastase activities and polyphenolic compounds during the four ripening stages of fruits. Overall, an extract of unripe fruits contained the highest levels of total phenolic and flavonoid contents, radical scavenging activity, reducing power, oxygen radical antioxidant capacity, and elastase inhibitory activity, compared with the extracts of fruits at other stages of ripening. Additionally, we found that the reduction of flavonoid content occurs because of decreased transcriptional levels of genes involved in flavonoid biosynthesis pathway during the ripening process. Based on HPLC analysis, we found that the extract of unripe fruits contained the highest amount of myricetin, caffeic acid, chlorogenic acid, syringic acid, and p-coumaric acid and suggested that the antioxidant and anti-elastase activities of

the extract obtained from stage 1, should be mediated by the presence of these compounds. Additionally, we analyzed the interaction sites and patterns between these compounds and elastase using the structure-based molecular docking approach, and suggested that chlorogenic acid strongly interacted with elastase. Together, these findings suggest that the maturity of fruits has profound effects on the pharmaceutical value of *R. rugosa*.

Keywords *Rosa rugosa*, Antioxidant, Anti-elastase, *In-silico* docking

서 언

장미과(family *Rosaceae*) 식물들은 91개의 속에 4,828을 포함하고 있으며, 식용 또는 관목용으로 유럽, 아시아, 북아메리카 전역에서 이용되고 있다(Christenhusz and Byng 2016). 특히 장미과 나무의 열매로 알려진 로즈 힙(rose hip)은 vitamin C, folic acid, catechin, carotenoid 그리고 proanthocyanidin을 다량 함유하고 있으며, 이들 기능성 물질을 바탕으로 항산화 활성, 항비만 효과, 항당뇨 활성 및 항암 활성 등의 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Chrubasik et al. 2008; Kim and Ko 2013). 또한 유럽과 미국에서는 오랫동안 차, vitamin C 보충제, 화장품 원료 등으로 이용되는 등(Choi 2009) 기능성 원료로서 많은 관심을 끌고 있다.

해당화(*Rosa rugosa*)는 해안가에 자생하는 장미과 장미속의 낙엽관목으로 원예용으로 식재되었으며, 한국을 포함한 동양에서는 위통, 토혈, 설사 등 다양한 질환에 대한 민간요법 치료제로 사용되어 왔다(Park 2008). 해당화의 주성분로는 vitamin C, terpenoids 그리고 quercetin, isoquercetin, rutin

M. Kwak · S. H. Eom · J. Gil · T. K. Hyun (✉)
충북대학교 농업생명환경대학 특용식물학과
(Department of Industrial Plant Science and Technology, College of Agricultural, Life and Environmental Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea)
e-mail: taekyung7708@chungbuk.ac.kr

J.-S. Kim (✉)
제주대학교 식물자원환경전공
(Major in Plant Resource and Environment, SARI, Jeju National University, Jeju, 63243, Korea)
e-mail: aha2011@jejunu.ac.kr

등의 플라보노이드 계열의 성분 및 tellimagrandin I, II, rugosin 등의 가수분해형 tannin 등이 보고되어 있으며, 이러한 성분들을 바탕으로 해당화 줄기, 뿌리, 과육 및 종자를 활용한 항염증, 진경작용, 항알레르기작용, 항고지혈증, 피부노화에 방, 미백효과, 당뇨치료 등의 연구가 보고되고 있다(Jung et al. 2005; Okawa 2005; Park 2008; Kang and Sohn 2010). 특히 해당화 열매 추출분말은 고지방 식이로 유도된 쥐의 체내에서의 혈중 중성지방을 낮추는 효과가 탁월한 것으로 보고됨에 따라 기능성 식품으로서의 이용 및 의약품소재로서 주목을 받고 있다(Choi et al. 2015).

과실의 발달 및 성숙은 다양한 유전자 발현 및 효소 활성의 변화에 의한 생화학적 그리고 생리적 변화 과정이다. 또한 과실이 성숙되는 동안 cell wall polysaccharides의 구조 및 조성의 변화, 전분의 당 전환, 엽록소의 분해, anthocyanin과 같은 색소의 축적, 향미 및 휘발성 향기 성분의 축적 등이 발생하게 된다(Carrari and Fernie 2006; Zhang et al. 2011). 이와 같은 생화학적/생리적 변화는 기능성물질의 함량 변화 및 이를 매개로 하는 생리활성의 변화에 중요한 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 예를 들어 복분자의 경우 과실이 성숙함에 따라 total phenolic content의 함량이 감소하며, 이로 인하여 항산화 활성 및 α -glucosidase 저해능 또한 감소하는 것으로 알려져 있다(Hyun et al. 2014). 이와 유사하게 올리브, 대추, 참다래, 딸기 그리고 아로니아의 경우 과실이 성숙함에 따라 항산화 활성이 감소하는 것으로 보고되었다(Beltran et al. 2005; Shin et al. 2008; Oh et al. 2011; Park and Kim 2016). 이상의 연구결과는 생리활성 기반 기능성 제품 개발에 있어 과실의 성숙 정도가 제품 품질 변화에 큰 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

따라서 본 연구에서는 기능성식품소재, 의약품원료로서의 이용성을 증대시키기 위한 목적으로 해당화 열매 성숙 단계별 생리활성의 변화 및 다양한 기능성 물질의 함량 변화를 비교 분석하였다. 또한 *in-silico* docking 분석을 통하여 항노화 관련 해당화 열매 추출물의 생리활성 물질을 탐색하였고, 이를 통하여 해당화 열매가 기능성소재로 활용될 수 있음을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 해당화 열매는 충북대학교 포장에서 수확하여 사용하였다. 시료는 4단계의 성숙단계(Fig. 1A)로 나누어 수확하였으며, 동결 건조 후 분쇄된 시료에 증류수(1:10)를 가하여 80°C에 1시간씩 3회 추출하였고, 여과지를 이용하여 여과하였다. 여과한 추출물은 감압농축기를 사용하여 농축하였으며, 이 시료는 -70°C에 보관하여 사용하였다.

총 페놀 함량(TPC), 총 플라보노이드 함량(TFC) 및 총 카로테노이드 함량(TCC) 측정

성숙 단계별 해당화 열매 추출물의 TPC와 TFC는 각각 Folin-Ciocalteu 방법과 Colorimetric 방법을 통하여 측정하였다(Hyun et al. 2015). 해당화 추출물의 TPC는 gallic acid를 표준물질로 한 표준검량을 이용하여 GAE(gallic acid equivalent)로 나타냈으며, TFC의 경우에는 quercetin으로 표준검량을 작성하여 QE(quercetin equivalent)로 나타내었다.

추출물에서의 TCC를 분석하기 위하여 Microplate Absorbance Reader(iMark™, Bio-Rad, USA)를 이용하여 흡광도 490 nm (OD480), 510 nm (OD510) 그리고 750 nm (OD750)에서 측정하였다(Parsons and Strickland 1963). TCC는 아래와 같은 식에 대입하여 농도를 계산하였다.

$$TCC(\mu\text{g/g of extract}) = 7.6 \times (OD480 - OD750) - 1.49 \times (OD510 - OD750)$$

DPPH radical 소거능 측정

Radical 소거활성 측정은 안정한 상태로 존재하는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 사용하여 측정하였다. 해당화 열매 성숙단계 별 DPPH 활성 저해율의 변화를 분석하기 위해 90 μL 의 0.4 mM DPPH를 다양한 농도(62.5 – 1000 $\mu\text{g/mL}$)의 시료 10 μL 에 가한 후 상온에서 10분간 반응시키고 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 radical 소거능은 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도(RC₅₀) 값을 계산하였다.

Reducing power assay

해당화 열매 성숙 단계별 환원력의 변화는 Fe³⁺ 이온에서 Fe²⁺ 이온으로 환원하는 능력을 비색법을 이용하여 측정하였다. 각각 다른 농도의 시료(100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$) 30 μL 에 0.2 M sodium phosphate buffer 200 μL (pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide 200 μL 를 혼합하여, 50°C에서 20분 동안 반응시킨 후, 10% trichloroacetic acid 1 mL을 첨가하여 반응을 정지하였다. 이후 500 μL 씩 다른 tube로 옮기고 동일한 양의 증류수와 0.1% ferric chloride 0.1 mL를 첨가하여 잘 혼합한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조구로 BHT (butylated hydroxytoluene)를 사용하였다.

Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) 측정

0.08 μM fluorescein을 각 well에 150 μL 씩 첨가 후, 75 mM phosphate buffer (pH 7.0, blank) 25 μL 또는 농도 별 각 시료를 25 μL 씩 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 다음에 2,2'-azobis

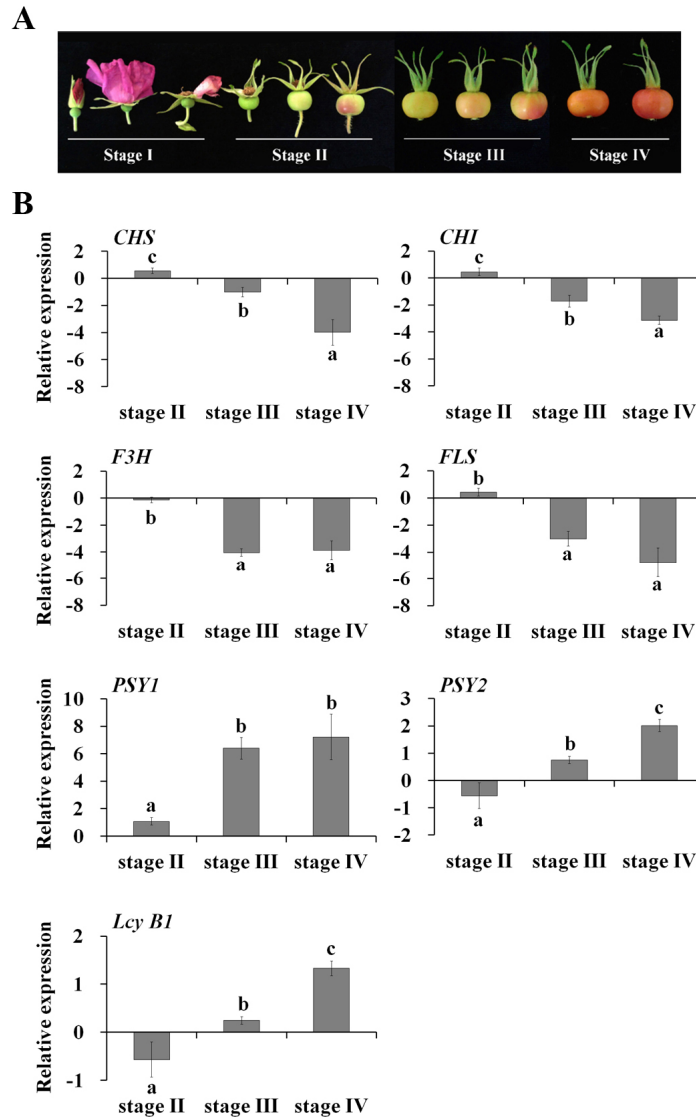


Fig. 1 The expression pattern of flavonoid and carotenoid biosynthesis genes at various stages of the ripening process. (A) *Rosa rugosa* fruit ripening stages considered in this study. (B) The expression levels for each gene were calculated, relative to their expression (Log₂ expression ratio) in stage 1. The means were significantly different as calculated, from a paired Duncan's test at $p < 0.05$. Enzyme names were abbreviated as follow: chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavanone 3-hydroxylase (F3H), flavonol synthase (FLS), Phytoene synthase 1 and 2 (PSY1 and 2) and lycopene β -cyclase 1 (Lcy B1).

(isobutyramidine) dihydrochloride (0.12 g/mL)를 25 μ L씩 첨가하였다(Prior 2015). Fluorescence microplate reader (SpectraMax® Gemini™ EM, Molecular Devices®, CA, USA)를 이용하여 excitation 파장 485 nm, emission 파장 538 nm에서 1분 간격으로 90분간 형광도를 측정하여 area under the curve (AUC)를 계산하였다. 표준품으로 0, 12.5, 25, 및 50 μ M의 trolox를 사용하였으며, ORAC은 표준시약 농도와 AUC 간의 회귀곡선을 이용하여 μ M trolox equivalent (μ M TE)로 표기하였다.

Neutrophil elastase inhibition assay

해당화 열매 추출물의 neutrophil elastase 저해 활성은 Neutrophil

elastase Inhibitor Screening Kit (Bio Vision, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 37°C에서 5분간 반응 후, Fluorescence microplate reader (SpectraMax® Gemini™ EM, Molecular Devices®, CA, USA)를 이용하여 excitation 파장 400 nm, emission 파장 505 nm에서 5분 간격으로 30분간 형광도를 측정하였다. Neutrophil elastase 저해 활성은 무첨가구 대비 시료 첨가구에서의 형광 감소율로 나타내었으며 3번 반복하여 수행하였다.

HPLC 분석

Polyphenol 화학물 분석을 위해 HPLC (Shimadzu liquid-chromatography system) 및 Luna 5 μ C18(2) 100A column (4.6

mm × 250 mm, particle size 5 μm)을 이용하였다. 이동상 용매는 증류수에 희석한 0.1% trifluoroacetic acid(용매 A)와 아세트니트릴에 희석한 0.1% trifluoroacetic acid(용매 B)를 사용하였다. 용매 구배는 다음과 같은 조건에서 수행하였으며(0 - 0.01 min, 90% A; 0.01 - 28 min, 60% A; 28 - 39 min, 40% A; 39 - 50 min, 10% A; 50 - 55 min, 10% A; 55 - 56 min, 90% A; and 56 - 65 min, 90% A), 유속은 0.7 mL/min으로 하고, UV 검출기의 254 nm, 280 nm 및 360 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Real time PCR을 통한 유전자 발현 분석

해당화 열매 성숙 단계별 anthocyanin 생합성 및 carotenoid 생합성 관련 유전자들의 발현 양상을 분석하기 위해 해당화 열매로부터 total RNA를 FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini kit (Favogen, PingTung, Taiwan)을 이용하여 추출하였다. 추출된 total RNA는 Nanodrop (DS-11+, DeNovix Inc, Wilmington, USA)을 이용하여 정량 하였으며, 500 ng의 total RNA는 ReverTra Ace[®]qPCR RT Master Mix (Toyobo, Co., Ltd, Osaka, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 SYBR[®]Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo, Co., Ltd, Osaka, Japan)와 CFX96TM Real-time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, USA)을 이용하여 Real-time PCR을 실행하였으며, 각 유전자들의 발현량은 actin의 발현량으로 정량 비교 분석하였다. Real-time PCR에 사용된 primer는 Table 1과 같다.

Molecular docking 분석

Human Neutrophil Elastase (PDB code : 1H1B), Caffeic acid (PubChem CID : 689043), Chlorogenic acid (PubChem CID : 1794427), p-coumaric acid (PubChem CID : 637542), Gallic acid (PubChem CID : 46780424), Lupeol (PubChem CID : 259846), Myricetin (PubChem CID : 5281672) SPCK (PubChem CID : 5486692), Syringic acid (PubChem CID : 10742)를 이용하여 Molecular blind docking과 defined docking을 수행하였으며, 결과 산출을 위해 AutoDock4 (Morris et al. 2009)를 이용하였다. Molecular docking 분석은 Seo and Efferth (2016)의 방법을 이용하여 수행하였다. Blind docking의 경우, 전체 잔기를 포함하는 grid maps을 형성하고 number of evaluation은 2,500,000으로 number of run은 100으로 설정 하였으며, Defined docking의 매개변수 값은 number of evaluation은 250,000으로 number of run은 250으로 설정하였다. Docking 결과는 Lamarckian Genetic Algorithm을 이용하여 계산하였으며, AutodockTools-1.5.7rc1을 사용하여 시각화 하였다. Elastase의 결합 포켓을 보여주는 표면표현이미지는 Visual Molecular Dynamics software (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>)를 사용하여 제작하였다.

통계처리

본 연구의 실험은 독립적으로 3회 실시되었으며 평균±표준 오차로 처리하였다. 통계분석은 SPSS (Version 23, IBM, USA)를 사용하여 ANOVA 분석을 실시하였으며, 유의적으

Table 1 Primer sequences for Real-time PCR analysis

Primer name	Sequence (5'-3')	Accession number
CHS-F	GTCGAGGAAGTCCGCAAAGC	KP775998.1
CHS-Rev	AGGAGTGGCTGTTCCGATGG	
CHI-F	AGTTCACGGCGATTGGAGTCT	KP775997.1
CHI-Rev	GTCAACTCCTCGGCCGTCTT	
F3H-F	GACTGGCGCGAGATTGTGAC	KP775999.1
F3H-Rev	CATGCCAAGCCCATCAGCTC	
FLS-F	TTGCTCTTGGTGTGGTTGCC	KP768083.1
FLS-Rev	TCGTACCACTGGCCATCTCG	
PSY1-F	AGAGAAAGGAGTCATGGAGCTCAG	KP768076.1
PSY1-Rev	TGTTCTTGATGGCAGAATCAGGGA	
PSY2-F	AGGTGTGGTGGGTTTGTGCT	KP768077.1
PSY2-Rev	AGTTCATCAGTCCTTCTGCACCA	
LcyB1-F	CCCTTCTAGCCGGTTTCGGT	KP768074.1
LcyB1-Rev	TGCCATACCGTGACACTTGC	
Actin-F	TGAGGCCATTTACGACAT	AF394915.1
Actin-Rev	AGATCACAGGAGCATAGGAG	

로 차이가 있는 항목에는 Duncan's Multiple Range Test를 사용하여 유의성을 분석하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

해당화 열매 성숙 단계별 총 페놀, 플라보노이드 및 카로테노이드 함량 변화

일반적으로 작물의 성장 단계, 재배환경 및 유전적 변이는 작물 내 phytochemical 함량 변화에 많은 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Cordenunsi et al. 2002). 따라서, 우리는 해당화 열매 성숙 단계별 생리활성 물질의 함량 변화를 비교 분석하기 위하여 각 성숙 단계별 TPC, TFC 그리고 TCC를 측정하였다. 그 결과, TPC (19.63 ± 0.67 mg GAE/g to 4.74 ± 0.05 mg GAE/g)와 TFC (3.37 ± 0.04 mg QE/g to 0.67 ± 0.04 mg QE/g)는 열매가 성숙함에 따라 감소하였으며, 이와 반대로 TCC (19.06 ± 3.58 μ g/g to 179.75 ± 13.46 μ g/g)는 열매가 성숙함에 따라 증가하는 것으로 조사되었다(Table 1).

플라보노이드는 식물 특이적인 이차 대사산물로서 현재까지 8,000종 이상이 보고되어 있으며, 지질 산화 억제, 활성 산소 제거 및 산화적 스트레스 억제 등 항산화 작용 때문에 영양학적으로 중요한 의미를 갖는다(Harborne and Williams 2000; Han et al. 2013). 플라보노이드는 phenylalanine (L-phenylalanine)의 생합성 경로로부터 합성되며, Chalcone synthase (CHS)에 의해서 형성된 4-coumaryl-CoA는 다시 CHS에 의해서 tetrahydroxychalcon을 형성하고 chalcone isomerase (CHI)에 의해 naringenin을 전환된다. 이렇게 형성된 naringenin은 다시 flavonone 3-hydroxylase (F3H)에 의해 dihydrokaempferol로 전환되고 flavonol synthase (FLS)를 통해 quercetin과 kaempferol을 형성하게 된다(Carte et al. 2011). 이들 유전자들의 발현이 해당화 열매의 플라보노이드 함량 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 열매 성숙 단계별 CHS, CHI, F3H 그리고 FLS의 발현량을 real-time PCR을 통해 확인하였다. Fig. 1에서와 같이 CHS, CHI, F3H 그리고 FLS의 발현이 열매가 성숙됨에 따라 감소 하는 것으로 조사되었으며, 이는 해당화 열매가 성숙함에 따른 플라보노이드 함량 감소는 주로 이들 생합성 관련 유전자들의 발현 감소에 따른 결과임을 의미한다.

카로테노이드는 식물과 곰팡이, 박테리아, 조류 등 광합성 생물에서 합성되는 지용성 색소로 항산화 물질 및 암 발생 예방 물질로서 영양성과 기능성이 우수한 화합물이다(Ha et al. 2003). 또한 lycopene과 lutein, zeaxanthin, astaxanthin 등 항산화 효과를 나타내는 카로테노이드의 함량 증대에 대한 연구가 진행되고 있다. 다음으로 우리는 열매 성숙 단계별 카로테노이드 함량 변화와 생합성 관련 유전자들의 발현 간의 상호 관계를 알아보기 위하여 PSY 1과 2 (Phytoene synthase 1 and 2), 그리고 Lcy B1 (lycopene β -cyclase 1)의 발현

양상을 분석하였다. Fig. 1에서와 같이 이들 유전자의 발현 양상은 플라보노이드 생합성 관련 유전자들과는 상반되게 열매가 성숙함에 따라 증가하는 것으로 조사되었다. 식물의 플라보노이드 및 카로테노이드와 같은 이차대사산물은 서로 독립된 생합성 경로를 통하여 생합성 되지만, 특히 전자인자들에 의하여 대사산물들의 생합성이 상호 영향을 받는 것으로 보고되어 있다(Bedon et al. 2010; Ben Zvi et al. 2012). 또한 이와 같이 열매가 성숙됨에 따라 카로테노이드 함량이 증가하는 것은 과일을 먹는 동물들을 유혹하여 씨앗을 분산시키기 위한 하나의 생존 전략으로 사료 된다(Zifkin et al. 2012).

해당화 열매 성숙 단계별 항산화 활성 변화

항산화제는 다른 분자의 산화를 억제하는 분자로, reactive oxygen species(ROS)의 공격으로부터 유기체를 보호하는 역할을 담당함으로써 암, 당뇨병 및 신경질환 등 다양한 질병의 예방 및 치료에 관여한다(Surveswaran et al. 2007). 특히 과일 등에 존재하는 vitamins, 플라보노이드, 카로테노이드 그리고 anthocyanin은 강력한 항산화제로 잘 알려져 있으며, 과일의 성숙 단계별 이들의 물질의 함량 변화는 과일의 항산화능 변화와 상관관계가 있는 것으로 보고되어 있다(Gull et al. 2012). 본 실험에서는 해당화 열매 성숙 단계별 항산화능의 차이를 비교 분석하기 위하여 안정한 free radical인 DPPH가 전자 혹은 수소를 제공받거나, 유지에서 유래된 산화된 radical에 의해서 biradical로 전환되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하는 DPPH assay (Lee et al. 2007), radical chain reaction의 가장 핵심적인 단계인 수소 전자 전달과 관련하여 항산화 물질의 free radical 소거 능력을 측정하는 ORAC assay (Huang et al. 2005), 그리고 Fe^{3+} ferricyanide 복합체를 Fe^{2+} 형태로 환원시켜 푸른색을 발하는 정도를 보고 항산화 능력과 관련된 중요한 인자인 환원력을 측정하는 reducing power assay (Gulcin et al. 2006)를 수행하였다. Fig. 2A에서와 같이 항산화 활성을 조사하기 위하여, 50% DPPH free radical을 소거하는데 필요한 시료의 농도를 나타내는 RC_{50} 값을 측정하였으며, 그 결과 해당화 열매가 성숙함에 따라 DPPH free radical 소거능이 감소하는 것으로 조사되었다. 또한 stage I (OD_{750} value = 1.0017)은 가장 높은 환원력을 보였으며, stage II (OD_{750} value = 0.5560), stage III (OD_{750} value = 0.4243) 그리고 stage IV (OD_{750} value = 0.3577) 순으로 조사 되었다(Fig. 2B). 이와 유사하게 50 μ g/mL의 stage I 추출물은 127.19 μ M TE (trolox equivalent)의 hydrophilic oxygen radical scavenging 활성을 나타냈으며, stage IV (ORAC value of 44.91 μ M TE)에서 가장 낮은 ORAC 활성을 보였다(Fig. 2C). 페놀 화합물 및 플라보노이드를 포함한 polyphenol 화합물은 심혈관 질환 및 신경 퇴행성 질환, 암, 당뇨병, 자가 면역 질환 및 일부 염증성 질환과 같은 산화 스트레스 및 free radical에 의한 손상과 관

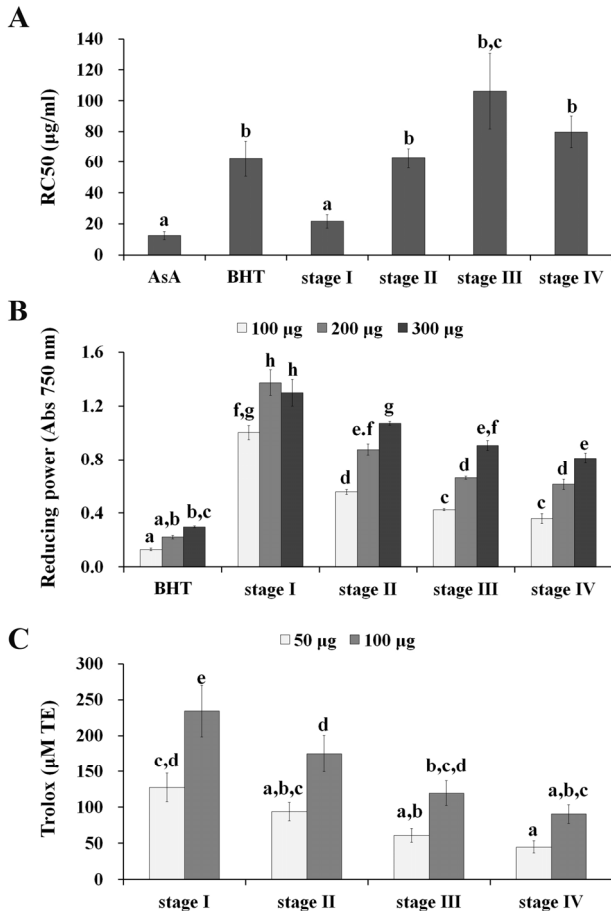


Fig. 2 Antioxidant activities of *Rosa rugosa* fruit extracts. (A) DPPH radical scavenging activity of *R. rugosa* fruit extracts. DPPH radical scavenging activity was calculated as RC₅₀. AsA: ascorbic acid. (B) Reducing power of *R. rugosa* fruit extracts. (C) ORAC values of *R. rugosa* fruit extracts. ORAC values of each extract are expressed as µmol of Trolox (TE) equivalents. Data are expressed as the mean±S.E of three independent experiments. Values in the same column with different superscripted letters are significantly different ($p < 0.05$)

련된 수많은 질병으로부터 보호 효과가 있는 물질로 잘 알려져 있다(Pandey and Rizvi 2009). 특히 polyphenol 화합물에 의한 free radical scavenging 활성은 수소원자 또는 전자를 free radical에 제공할 수 있는 phenolic hydroxyl groups 또는 비공유 전자를 이동시킬 수 있는 conjugated aromatic system에 의하여 나타나며(Dai and Mumper 2010), 해당화 열매 추출물에서의 항산화 활성은 이들 polyphenol 화합물에 의하여 나타냄을 시사한다.

해당화 열매 성숙 단계별 elastase 저해 활성 분석

사람 피부 노화는 유전적 요인, 호르몬의 변화 등에 의하여 발생하는 내인성 노화와 자외선 노출, 흡연, 환경 오염, 스트레스 증가에 따른 활성산소의 증가 등에 의해 발생하는 외인

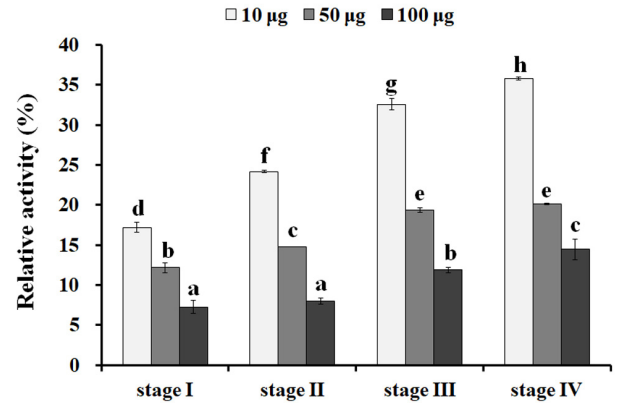


Fig. 3 Effects of *Rosa rugosa* fruit extracts on elastase activity. Values are the average of triplicate experiments and are represented as the mean±S.E. Mean separation within columns by Duncan's multiple range test is at the 0.05% level

성 노화로 나뉜다(Yang et al. 2016). 내인성 노화와 외인성 노화는 모두 피부 진피층에 존재하는 탄력섬유(elastic fiber)의 변성 및 교원질(collagen) 양의 감소 등에 의한 세포외기질(extracellular matrix)의 구조적인 변화를 유도하여 피부의 주름을 야기한다(Chiocchio et al. 2018). 특히 탄력섬유는 피부의 탄력을 관장하는 섬유로 elastin이라는 단백질로 구성되어 있으며, elastin을 분해하는 elastase는 주름생성의 주원인 효소로 알려져 있다(Tsuji et al. 2001). 따라서 elastase 저해제 탐색은 주름 개선제 개발에 있어 주요 target이 되고 있다. 해당화 열매 추출물의 elastase 저해활성을 조사해본 결과, 추출물의 처리 농도가 증가 할수록 elastase 저해 활성이 증가하였으며, 해당화 열매가 성숙함에 따라 elastase 저해 활성이 감소하는 것으로 조사되었다(Fig. 3). Stage I 추출물 10, 50, 100 µg 처리시 각각 82.7%, 87.8%, 92.7% elastase 저해 활성을 보였으며, 100 µg의 stage IV 추출물은 85.5%의 elastase 저해 활성을 나타냈다. 이상의 연구 결과를 통하여 해당화 미성숙 열매는 피부노화방지를 위한 화장품 소재로 개발이 가능할 것으로 생각된다.

In-silico molecular docking 분석을 통한 해당화 열매 유래 elastase 저해제 탐색

해당화 열매 추출물의 주요 polyphenol 성분을 규명 하고자 HPLC를 이용하여 성분 분석을 수행하였으며, 그 결과 총 19종의 polyphenol 성분을 검출하였다(Table 3). Stage I 추출물은 다른 추출물과 비교하여 mricetin (1.51±0.76 µg/10 mg of extract), potocatechuic acid (5.96±0.62 µg/10 mg of extract), clorogenic acid (39.69±2.76 µg/10 mg of extract), caffeic acid (18.37±8.14 µg/10 mg of extract), syringic acid (69.56±19.66 µg/10 mg of extract) 그리고 p-coumaric acid (15.68±1.69 µg/10 mg of extract)를 많이 함유하고 있는 것으로 조사되었다. 특

Table 2 Variation of total phenolic, total flavonoid, and total carotenoid contents during the ripening process of *Rosa rugosa* fruits

Extract and fractions	Total phenol (mg GAE/g) ¹⁾	Total flavonoid (mg QE/g) ²⁾	Total carotenoid (µg/g)
Stage I	19.63 ± 0.67c ³⁾	3.37 ± 0.04c	19.06 ± 3.58a
Stage II	9.55 ± 0.26b	1.11 ± 0.00b	39.65 ± 4.88a
Stage III	5.52 ± 0.28a	0.66 ± 0.04a	84.93 ± 7.56b
Stage IV	4.74 ± 0.05a	0.67 ± 0.04a	179.75 ± 13.46c

¹⁾Total phenolic content analyzed as catechin equivalent (CAE) mg/g of extract. Values are the average of triplicates.

²⁾Total flavonoid content analyzed as quercetin equivalent (QE) mg/g of extract. Values are the average of triplicates.

³⁾Each value represents the mean ± SD, and the means were significantly different as calculated from a paired Duncan's test at $p < 0.05$.

Table 3 Comparison of polyphenolic compounds from different ripening stages of *Rosa rugosa* fruits

No.	Polyphenolic compound	Concentration (µg/ 10 mg of extract values)			
		Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
1	Taxifolin	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.09 ± 0.33
2	Naringin	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.24 ± 0.54
3	Hesperidin	0.00 ± 0.00	0.76 ± 0.13	0.31 ± 0.16	2.59 ± 0.37
4	Myricetin	1.51 ± 0.76	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
5	Quercetin	0.00 ± 0.00	5.82 ± 0.03	3.85 ± 1.92	6.20 ± 0.03
6	Naringenin	0.25 ± 0.00	0.16 ± 0.08	0.20 ± 0.10	0.53 ± 0.08
7	Apigenin	0.00 ± 0.00	0.87 ± 0.38	1.29 ± 0.00	1.65 ± 0.10
8	Kaempferol	1.16 ± 0.01	0.76 ± 0.38	0.77 ± 0.38	1.25 ± 0.03
9	Isorhamnetin	1.53 ± 0.01	1.58 ± 0.03	1.57 ± 0.01	1.02 ± 0.51
10	Rhamnetin	0.80 ± 0.01	0.79 ± 0.00	0.79 ± 0.00	0.91 ± 0.03
11	Nobiletin	0.31 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.44 ± 0.05
12	Tangeretin	0.22 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.22 ± 0.11	0.36 ± 0.01
13	Gallic acid	5.78 ± 0.51	8.40 ± 4.83	4.49 ± 0.63	0.00 ± 0.00
14	Protocatechuic acid	5.96 ± 0.62	0.61 ± 0.23	0.56 ± 0.28	4.12 ± 2.80
15	Chlorogenic acid	39.69 ± 2.76	6.08 ± 0.54	16.82 ± 2.56	12.60 ± 0.19
16	Vanillic acid	0.00 ± 0.00	6.91 ± 0.14	10.29 ± 1.50	5.23 ± 2.62
17	Caffeic acid	18.37 ± 8.14	16.46 ± 1.22	11.04 ± 2.00	7.18 ± 0.20
18	Syringic acid	69.56 ± 19.66	3.87 ± 1.08	2.62 ± 1.31	4.71 ± 2.45
19	p-coumaric acid	15.68 ± 1.69	6.84 ± 0.65	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

히 stage I 추출물에서는 syringic acid, stage II 추출물에서는 caffeic acid, 그리고 stage III와 stage IV 추출물에서는 chlorogenic acid가 주요 성분으로 분석되었다(Table 3). 해당화 열매 성숙 단계에 따라 polyphenol 성분의 조성 및 함량의 차이가 있었으며, 이와 같은 차이가 해당화 열매 추출물의 생리 활성에 많은 영향을 미친 것으로 사료된다. 또한 myricetin, caffeic acid 등의 polyphenol 화합물은 elastase의 enzymatic activity을 억제 함으로써 피부 노화 예방효과가 있는 것으로 보고됨에 따라 기능성 화장품의 원료로 각광 받고 있다 (Duan et al. 2017; Widowati et al. 2017).

다음으로 우리는 stage I 추출물에 많이 함유 되어 있는 것으로 조사된 myricetin, chlorogenic acid, caffeic acid, syringic acid 그리고 p-coumaric acid의 elastase 억제제로서의 가능성을 알아보기 위해 *in-silico* molecular docking 분석을 통해 결합 부위 및 결합 형태를 예측해 보았다. 이를 위해 blind

molecular docking을 각각 100번씩 실행하여 elastase 내 binding site를 탐색하였으며, 그 결과를 바탕으로 defined molecular docking을 실행하여 elastase에 대한 myricetin, chlorogenic acid, caffeic acid, syringic acid 그리고 p-coumaric acid의 binding energy 값을 예측한 결과, chlorogenic acid (- 5.64 kcal/ mol)와 myricetin (- 5.59 kcal/ mol)가 높은 결합 친화력을 나타내는 것으로 조사되었다(Table 4). 4-hydroxybenzoic acid, pinocembrin, quercitrin 그리고 lupeol 등과 같은 elastase 억제제의 경우 elastase의 active site의 SER195 residue와 공유결합 함으로서 억제 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며(Narayanaswamy et al. 2013, 2015 and 2016), 이와 유사하게 chlorogenic acid과 myricetin은 SER195 residue와 hydrophobic interaction 하는 것으로 조사되었다(Table 4). 이상의 결과는 해당화 미성숙 열매 추출물 내 활성물질들은 elastase의 active site와 직접 결합 함으로써 elastase 활성을 직접 억제함을 시사한다.

Table 4 Defined molecular docking of selected polyphenolic compounds to human elastase

Compounds	Lowest binding energy (kcal/mol)	Mean binding energy (kcal/mol)	Residues involved hydrogen bond interaction	Residues involved in hydrophobic interaction	Pki (μM) ¹⁾
Caffeic acid	-5.6	-5.08	ASN159, ARG186	ARG20, ASN159, VAL185, ARG186, ARG187	79.04
Chlorogenic acid	-7.8	-5.64	ASN61, GLY193, SER195, VAL216	PHE41, CYS42, HIS57, CYS58, ASN61, VAL62, CYS191, PHE192, GLY193, ASP194, SER195, SER214, PHE215, VAL216	1.91
Myricetin	-6.4	-5.59	ASN61, GLY193, SER195	PHE41, CYS42, HIS57, CYS58, ASN61, CYS191, PHE192, GLY193, ASP194, SER195	20.98
Syringic acid	-5.06	-4.60	GLN135, ARG187	GLN135, ASN159, THR162, VAL185, ARG186, ARG187	194.89
p-coumaric acid	-5.58	-5.37	GLY18, ARG21	GLY18, GLY19, ARG20, ARG21, LEU144, GLN156	81.44
Lupeol	-8.63	-8.53		CYS42, HIS57, CYS58, CYS191, PHE192, ASP194, SER195, VAL216, CYS220	472.99 (nM)

¹⁾Pki indicates predicted inhibitory activity.

적 요

열매가 성숙하는 과정은 유전학적으로 프로그램화 되어 있는 과정으로 다른 여러 유전자 발현과 효소의 작용에 의한 생화학적, 생리적 조절의 결과물이다. 이런 일련의 과정에서 과실과 채소에 화학적 조성과 활성 물질에 변화가 나타나는 것을 당연한 결과일 것이다. 해당화의 열매가 성숙하는 과정에서 이들 활성 물질의 변화를 측정하기 위해 우리는 성숙단계 별로 채집된 열매 시료 추출물에서의 항산화 활성의 차이, 항 elastase 활성 및 polyphenol 화합물의 함량을 분석하였다. 결과적으로 미성숙 단계의 열매 추출물에서 높은 phenolic 화합물과 플라보노이드 함량이 검출되었으며, 그에 따라 높은 radical 소거능, 환원력 및 ORAC 활성을 나타냈다. 또한 elastase 저해 활성에서도 다른 성숙 단계의 추출물에 비해 미성숙 단계의 열매 추출물에서 높은 활성을 나타내는 것으로 조사되었다. 더불어 성숙과정에서 플라보노이드 생합성 과정에 관련된 유전자의 발현이 감소하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 플라보노이드의 함량이 감소하는 것을 설명할 수 있었다. HPLC분석을 통해 다른 성숙 단계의 추출물과 비교하여 미성숙 열매 추출물에서 높은 함량의 myricetin, caffeic acid, chlorogenic acid, syringic acid, p-coumaric acid 등이 검출되었다. 구조 기반의 molecular docking을 사용하며 이들 화합물과 elastase의 결합부위와 패턴을 분석하였으며 이를 통해 chlorogenic acid와 elastase가 강하게 결합하는 것을 확인하였다. 따라서, 본 연구를 통해서 해당화 열매의 성숙 정도가 이 식물의 약리학적 가치에 영향을 미치는 것을 규명하였고, 미성숙한 해당화 열매는 향후 활성산소 생성에 의

해 유발되는 피부 노화 억제 효과뿐 아니라 피부의 탄력성 강화를 위한 기능성 천연소재로서의 가능성을 입증하였다.

사 사

본 연구는 한국연구재단 기초연구실지원사업(NRF-2017 R1A4A1015515) 그리고 이공분야기초연구(NRF-2018R1D1 A1B07043720)의 지원에 의해 이루어졌다.

References

Bedon F, Bomal C, Caron S, Levasseur C, Boyle B, Mansfield SD, Schmidt A, Gershenzon J, Grima-Pettenati J, Seguin A, MacKay J (2010) Subgroup 4 R2R3-MYBs in conifer trees: gene family expansion and contribution to the isoprenoid-and flavonoid-oriented responses. *J Exp Bot* 61:3847-3864

Beltran G, Aguilera MP, Del Rio C, Sanchez S, Martinez L (2005) Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chem* 89:207-215

Carrari F, Fernie AR (2006) Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *J Exp Bot* 57:1883-1897

Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P (2011) Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules* 16:251-280

Choi KS, Kim YH, Lee KW, Shin KO (2015) Antioxidant activity of *Rosa rugosa* Thunberg and effect on serum lipid level in high fat diet-induced mice. *Korean J Food & Nutr* 28:320-327

Choi SH (2009) Essential oil components in herb teas (rose and rosehip). *Kor J Life Sci* 19:1333-1336

- Chiocchio I, Mandrone M, Sanna C, Maxia A, Tacchini M, Poli F (2018) Screening of a hundred plant extracts as tyrosinase and elastase inhibitors, two enzymatic targets of cosmetic interest. *Ind Crop Prod* 122:498-505
- Christenhusz MJ, Byng JW (2016) The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261:201-217
- Chrubasik C, Roufogalis BD, Muller-Ladner U, Chrubasik S (2008) A systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles. *Phytother Res* 22:725-733
- Cordenunsi BR, Oliveira do Nascimento JR, Genovese MI, Lajolo FM (2002) Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *J Agric Food Chem* 50:2581-2586
- Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313-7352
- Duan J, Xiaokaiti Y, Fan S, Pan Y, Li X, Li X (2017) Direct interaction between caffeic acid phenethyl ester and human neutrophil elastase inhibits the growth and migration of PANC-1 cells. *Oncol Rep* 37:3019-3025
- Gulcin I (2006) Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 217:213-220
- Gull J, Sultana B, Anwar F, Naseer R, Ashraf M, Ashrafuzzaman M (2012) Variation in antioxidant attributes at three ripening stages of guava (*Psidium guajava* L.) fruit from different geographical regions of Pakistan. *Molecules* 17:3165-3180
- Han YL, Lee SY, Lee JH, Lee SJ (2013) Cellular flavonoid transport mechanisms in animal and plant cells. *Korean J Food Sci Technol* 45:137-141
- Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55:481-504
- Ha SH, Kim JB, Park JS, Ryu TH, Kim KH, Hahn BS, Lim Jb, Kim YH (2003) Carotenoids biosynthesis and their metabolic engineering in plants. *J Plant Biotechnol* 30:81-95
- Hyun TK, Rim Y, Kim E, Kim JS (2014) Variation in bioactive principles of Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel) during ripening. *Plant Omics* 7:510
- Jung HJ, Nam JH, Choi J, Lee KT, Park HJ (2005) 19 α -hydroxy-ursane-type triterpenoids: antinociceptive anti-inflammatory principles of the roots of *Rosa rugosa*. *Biol Pharm Bull* 28:101-104
- Kang NS, Sohn EH (2010) Immunomodulatory effects of fructus and semen from *Rosa rugosa* on macrophages. *Korean J Plant Res* 23: 399-405
- Kim M, Ko K (2013) The effect of rosehip extracts addition on permanent wave and hair dye during repetition procedure. *Fashion Bus* 17:151-163
- Lee J, Chung H, Chang PS, Lee J (2007) Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food chem* 103:662-669
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30:2785-2791
- Radhakrishnan Narayanaswamy AI, Wai LK, Ismail IS (2016) Molecular docking analysis of selected *Clinacanthus nutans* constituents as xanthine oxidase, nitric oxide synthase, human neutrophil elastase, matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9 and squalene synthase inhibitors. *Pharmacog mag* 12:S21
- Narayanaswamy R, Lam KW, Ismail IS (2013) Molecular docking analysis of natural compounds as Human neutrophil elastase (HNE) inhibitors. *J Chem Pharm Res* 5:337-341
- Narayanaswamy R, Lam KW, Ismail IS (2015) In silico analysis of selected honey constituents as human neutrophil elastase (HNE) and matrix metalloproteinases (MMP 2 and 9) inhibitors. *Int J Food Prop* 18:2155-2164
- Oh HJ, Jeon SB, Kang HY, Yang YJ, Kim SC, Lim SB (2011) Chemical composition and antioxidative activity of kiwifruit in different cultivars and maturity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:343-349
- Okawa M (2005) Study on the antioxidative and antiproliferative activity of the polyphenol contained some functional foods. PhD Thesis Dissertation, pharmaceutical bulletin Fukuoka University, Japan
- Park BJ (2008) Isolation of main component and antioxidant activities on the stem and root of *Rosa rugosa*. *Korean J Plant Res* 21:402-407
- Park Y, Kim JH (2016) Antioxidant activity, total phenolics, vitamin c and sugar content during fruit ripening of five different jujube cultivars. *Korean J Plant Res* 29:539-546
- Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2:270-278
- Parsons TR (1963) Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equation for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J mar Res* 21:155-163
- Prior RL (2015) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Funct Foods* 18:797-810
- Surveswaran S, Cai YZ, Corke H, Sun M (2007) Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food chem* 102:938-953
- Seo EJ, Efferth T (2016) Interaction of antihistaminic drugs with human translationally controlled tumor protein (TCTP) as novel approach for differentiation therapy. *Oncotarget* 7:16818
- Shin Y, Ryu JA, Liu RH, Nock JF, Watkins CB (2008) Harvest maturity, storage temperature and relative humidity affect fruit quality, antioxidant contents and activity, and inhibition of cell proliferation of strawberry fruit. *Postharvest Biol Tec* 49:201-209
- Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G (2001) The Role of Elastases Secreted by Fibroblasts in Wrinkle Formation: Implication Through Selective Inhibition of Elastase Activity. *Photochem Photobiol* 74:283-290
- Widowati W, Rani AP, Hamzah RA, Arumwardana S, Afifah E, Kusuma HSW, Rihibiha DD, Nufus H, Amalia A (2017) Antioxidant and antiaging assays of *Hibiscus sabdariffa*

- extract and its compounds. *Nat Prod Sci* 23:192-200
- Yang WT, Kim KS, Kwon YS, Kim DK, Kim DH (2016). Whitening and anti-aging effects of *Cistanche deserticola* extract. *J Plant Biotechnol* 43:492-499
- Zhang J, Wang X, Yu O, Tang J, Gu X, Wan X, Fang C (2010) Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) during fruit development and maturation. *J Exp Bot* 62: 1103-1118
- Zifkin M, Jin A, Ozga JA, Zaharia LI, Schernthaner JP, Gesell A, Abrams SR, Kennedy JA, Constabel CP (2012) Gene expression and metabolite profiling of developing highbush blueberry fruit indicates transcriptional regulation of flavonoid metabolism and activation of abscisic acid metabolism. *Plant Physiol* 158:200-224
- Zvi MMB, Shklarman E, Masci T, Kalev H, Debener T, Shafir S, Ovadis M, Vainstein A (2012) PAP1 transcription factor enhances production of phenylpropanoid and terpenoid scent compounds in rose flowers. *New Phytol* 195:335-345