

누룩치(*Pleurospermum kamtschaticum*) 추출물의 항산화 효과 및 생리활성

김미선 · 김경희 · 육홍선[†]

충남대학교 식품영양학과

Antioxidative and Physiological Activities of Fractions from *Pleurospermum kamtschaticum* Extracts

Mi-Seon Kim, Kyoung-Hee Kim, and Hong-Sun Yook[†]

Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

This study investigated the antioxidant activities, whitening effects, and antimicrobial activities of fractions from *Pleurospermum kamtschaticum* extract. Total polyphenolic contents of fractions from *Pleurospermum kamtschaticum* extract were 116.44~382.73 mg/g GAE (gallic acid equivalent), with the highest value in the ethyl acetate fraction. Fractions of *Pleurospermum kamtschaticum* showed the highest DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity ($IC_{50}=0.04$ mg/mL) and ABTS radical scavenging activity (98.86% at 0.5 mg/mL), which was similar to ascorbic acid. Further, reducing power and FRAP activity were significantly high in the ethyl acetate and *n*-butanol fractions. The ethyl acetate and *n*-butanol fractions showed significantly high SOD-like activities (1 mg/mL, 86.93%, and 78.23%, respectively) compared to other fractions. Tyrosinase inhibition activities of the *n*-butanol fraction and 80% ethanol extract were 43.52% and 41.64%, respectively. Antimicrobial activity against *Escherichia coli* was only observed in the chloroform fraction (16.7 mm in 0.5 mg/disc). These results suggest that fractions from *Pleurospermum kamtschaticum* extract show comparatively high antioxidant activity and thus could be used as a food additive or cosmeceutical ingredient.

Key words: *Pleurospermum kamtschaticum*, antioxidant, free radical, tyrosinase, antimicrobial activity

서 론

산화적 스트레스(oxidative stress)는 생체막의 필수 구성 성분인 불포화지방산의 탄소사슬을 공격하여 microsome, mitochondria, ribosome의 막을 손상시키고, 이로 인해 과산화물이 생성된다(1,2). 신체는 이러한 산화적 스트레스로부터 세포막과 세포내 물질을 보호하기 위한 항산화 기전이 존재하는데 그중 하나는 체내에 존재하는 항산화 효소에 의해서, 나머지는 생체 내 여러 가지 항산화 물질과 식이를 통하여 공급되는 항산화 영양소와 폴리페놀류와 같은 항산화제에 의한 것이다. 그러나 신체가 항산화 방어체계를 구축하여 스스로를 보호하지만 항산화 체계가 약화되거나 산화적 스트레스가 가해질 때 증가되는 활성산소종에 대항하기는 역부족 상태에 놓이게 된다. 따라서 항산화 성분의 섭취나 항산화 효소 활성 증가 등으로 체내 항산화 효능을 증진시키는 것은, 누적되는 산화적 손상에 대항하기 위해서 매우 중요한 것으로 보고되고 있으며, 더불어 항산화 물질을 함유한 천연 자원에 대한 관심이 증가되고 있다(3-5).

우리나라에 자생하는 식물은 약 3,200여종 중에 480여종

이 식용으로 이용이 가능하다고 보고 있으나 이는 넓은 의미에서 산채를 이야기하는 것이며 실제로는 사람이 먹을 수 있는 식물 중 기호성이 좋고 식품적 가치가 높은 식물을 산채로 이용하는 것으로(6), 산채는 예로부터 구황식물로서 우리 조상들이 식량부족으로 어려움을 겪을 때 주로 이용하여 왔으며 비타민, 미네랄, 엽록소를 비롯한 영양소 및 식물 섬유소가 풍부하게 함유되어 있고 특히 산채 고유의 향기와 맛을 가지고 있는 등 채소로서 매우 가치가 높다(7). 현재 100여종의 산채가 알려져 있고, 이 안에는 각종 알칼로이드, 탄닌, 사포닌, 배당체, 플라보노이드류가 많이 함유되어 있기 때문에 특수한 생리학적 기능을 나타낼 가능성이 매우 높은 것으로 지적되고 있다(8). 국내에서도 자생하는 식용식물의 식품적 가치가 재인식되어 수요가 매년 증가되고 있어, 천연물 즉 식품, 한약 및 민간약 등으로부터 생리활성 물질을 탐구하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근에는 식품으로서 영양 불균형에서 오는 만성 퇴행성 질환 등을 예방하여 항비만 효과(9), 중금속 해독효과(10), 항돌연변이능(11), 항암·항산화 효과(12), 항균효과(13) 및 유전독성억제능(14)이 높은 것으로 밝혀져 다양한 산채류의 생리적 기능에 관한

[†]Corresponding author. E-mail: yhsuny@cnu.ac.kr
Phone: 82-42-821-6840, Fax: 82-42-821-8887

연구 및 개발의 필요성이 강조되고 있다.

산야에서 자생하는 여러 식물성 자원 중 누룩치(*PleurospERMUM kAMTSCHATICUMIN*)는 산형과에 속하는 여러해살이풀로 왜우산나물, 왜우산풀 또는 누리대로 불리워진다. 외형적 특색은 키 50~100 cm이며, 하얀색의 꽃이 6~7월경에 피어나며, 한줄기에 3개의 잎을 가지고 꽃이 지고 난 후에는 달걀 모양의 열매가 열린다(15). 민간용법에서는 누룩치가 소화력을 향상시켜 식욕을 촉진시키며(16), 산모가 섭취하면 젖이 잘 나오고 콜레스테롤 저하 기능이 있다고 알려져 있다. 누룩치는 4월 중순~5월 상순 연한 잎줄기를 채취하여 날것으로 양념장에 찍어 먹거나 데쳐서 무침으로 먹기도 하는데, 신맛, 쓴맛 및 뚱은 맛을 지닌 잎을 장아찌로 가공하여 식용하는 누룩치는 강원도 특히 설악산 지역의 유명 산채로 꼽히고 있다(17). 누룩치는 맛이 유사한 샬러리에 비해 탄수화물, 회분, 인 그리고 비타민 A가 더 많은 것으로 보고되고 있으며, *in vitro* 실험에서 항돌연변이원 효과가 있는 것으로 보고하였다(17,18).

따라서 본 연구는 누룩치를 이용하여 에탄올 추출물과 용매별 분획물을 얻어 항산화 활성, 미백활성 및 항균효과를 검정함으로써 누룩치의 생리활성효과를 알아보고 화장품 재료 및 식품 첨가물 등의 산업적 소재로서 활용가능성이 있는지 알아보고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 누룩치는 6월에 강원도농업기술원 특화작물시험장으로부터 제공받아, 일주일간 음건하였고 마쇄하여 분말로 만든 후 각종 항산화 및 생리활성 관련 분석을 실시하였다.

용매별 추출물 제조

건조된 산채류는 시료 200 g당 15배량(w/v)의 80% 에탄올로 24시간 동안 3회 추출한 다음, 추출액은 여과지(Whatman No.4, Maidstone, England)로 여과하였다. 여액을 40°C 수욕상에서 rotary vacuum evaporator(EYELA A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 용매를 제거하고 감압·농축한 후 동결 건조하여 4°C 이하로 냉장보관하면서 실험에 사용하였다. 건조된 80% 에탄올 추출물에 증류수를 넣어 녹인 후, *n*-hexane 용액을 1:1이 되게 혼합한 후 separating funnel을 이용하여 분획한 후 rotary vacuum evaporator로 감압·농축하여 *n*-hexane 분획물을 얻었다. 동일한 방법으로 chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol 그리고 물 층을 분획하여 각각의 순차 분획물을 얻었으며, 모든 과정은 3회 반복 실시하였다. 각 시료 분획물은 메탄올에 용해하여 실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 함량

폴리페놀 화합물 함량은 페놀성 물질인 phosphomolybdic

acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법(19)을 이용하여 측정하였다. 1 mg/mL 농도로 메탄올에 용해시킨 시료액 0.2 mL와 Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 0.2 mL를 첨가하여 혼합한 후 3분간 실온에서 반응시킨 뒤, 10% sodium carbonate(Na₂CO₃) 용액 3 mL를 가하여 암실에서 1시간 동안 방치하여 상등액을 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid(Sigma)를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 이 검량곡선으로부터 시료중의 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

항산화활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과(radical scavenging effect)를 측정하는 Blois법(20)을 활용하였다. 각 분획물을 농도별(0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 mg/mL)로 제조한 시료 0.2 mL에 0.2 mM DPPH 0.6 mL를 가하고 vortex mixing 후 실온에서 15분간 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도 감소를 조사하였다. 무처리구와 처리구의 값을 비교하여 free 라디칼 소거활성을 결정하였다. 이때 IC₅₀(mg/mL)는 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 값을 50% 감소시키는 추출물의 농도를 나타냈으며, 기존의 항산화제인 ascorbic acid를 대조군으로 사용하여 비교하였다.

ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능 측정은 Pellegrin 등(21)의 방법에 의해 측정하였다. 즉, 7 mM ABTS와 140 mM K₂S₂O₈을 5 mL:88 μL로 섞어 어두운 곳에 14~16시간 방치시킨 후, 이를 absolute ethanol과 1:88 비율로 섞어 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7±0.002가 되도록 조절한 ABTS solution을 사용하였다. 500 μg/mL 농도의 시료용액 50 μL와 ABTS solution 1 mL를 30초 동안 섞은 후 2.5분간 incubation하여 734 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 의해 저해율을 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right) \times 100$$

FRAP(Ferric-reducing antioxidant potential) 측정

FRAP 측정 방법은 Benzie와 Strain(22)의 방법을 참고하여 측정하였다. FRAP reagent는 25 mL acetate buffer(300 mM, pH 3.6)를 37°C에서 가온한 후, 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma) 5 mL와 20 mM ferric sulfate(FeSO₄) 2.5 mL를 가하여 제조하였다. 제조된 0.9 mL FRAP reagent에 1 mg/mL의 농도로 용해시킨 산채류 분획물 0.03 mL와 증류수 0.09 mL를 넣은 다음 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 593 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Blank는 시료 대신 메탄올을 넣어 측정하였다. Ascorbic acid를 1 mg/mL 농도로 제조하여 대조군으로 사용하였고, 0.125, 0.25, 0.5,

1, 2.5 및 5 mM의 농도로 반복하여 작성한 FeSO₄의 검량식에 대입하여 환산하였다.

Reducing power 측정

Reducing power는 Oyaizu(23)의 방법에 따라 측정하였다. 농도를 각각 달리하여(0, 50, 200, 300, 400 µg/mL) 첨가한 화합물 1에 sodium phosphate buffer(0.25 mL, 200 mM, pH 6.6)와 potassium ferricyanide(0.25 mL, Sigma)를 혼합시켰다. 그리고 혼합물을 50°C에서 20분 동안 incubation시킨 후 trichloroacetic acid(0.25 mL, 10%, w/v)를 첨가시킨 후 10분 동안 3,000 rpm으로 원심분리를 시켜 상정액(0.5 mL)에 탈이온수(0.5 mL)와 1% ferric chloride(0.1 mL, Sigma)를 첨가시켰고, UV/Visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1800, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 유사 활성 측정

Marklund와 Marklund(24)의 방법의 변법을 이용하여 시료의 SOD 유사활성을 측정하였다. 즉, 시료 0.1 g에 50 mM tris-cacodylic acid buffer(TCB, pH 8.2) 10 mL를 가한 후, 0.1 N NaOH와 HCl로 pH 8.2로 조절한다. 이 용액 0.9 mL에 20 mM pyrogallol(1,2,3-benzenetriol, Sigma, 10 mM HCl을 용매로 하여 제조) 0.1 mL를 첨가한 후 1 mL pipette로 3회 혼합하여 2분후 420 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

$$\text{SOD-like activity (\%)} = \left(1 - \frac{A-B}{C}\right) \times 100$$

A: Absorbance at 420 nm determined with test sample
B: Absorbance at 420 nm determined with buffer instead of pyrogallol

C: Absorbance at 420 nm determined with buffer instead of test sample

Tyrosinase 저해 활성

산채류 추출물의 tyrosinase 저해 활성은 Yagi 등(25)의 방법에 따라 측정하였다. 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL와 시료용액 0.1 mL를 혼합한 용액에 mushroom tyrosinase(110 U/mL) 0.2 mL 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시킨 후, 생성된 DOPA chrome을 spectrophotometer의 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{Tyrosinase inhibition ability (\%)} = \left(1 - \frac{A-B}{C}\right) \times 100$$

A: Absorbance at 475 nm determined with test sample
B: Absorbance at 475 nm determined with buffer instead of enzyme

C: Absorbance at 475 nm determined with buffer instead of test sample

Table 1. List of strains used for antimicrobial experiments

	Strains	Media	Temp. (°C)
Gram positive bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	NA/NB	30
	<i>Bacillus subtilis</i>	NA/NB	30
	<i>Staphylococcus aureus</i>	NA/NB	30
Gram negative bacteria	<i>Escherichia coli</i>	NA/NB	30
	<i>Salmonella enterica</i>	NA/NB	37
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA/NB	37

Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정

각 추출물의 항균활성은 각 균주를 대상으로 disc diffusion assay로 측정하였으며, 측정에 사용된 균주는 그램 양성균 3종류와 그램 음성균 3종류로 한국생명공학연구원에서 분양받아 사용하였고 사용된 배지 조건은 Table 1과 같다. 항균시험용 평판배지는 계대 배양된 각 균주를 멸균 면봉을 이용하여 100 µL씩 도말하여 준비하였고, 시료를 disc당 0.1, 0.5 mg이 되도록 paper disc(8 mm)에 천천히 흡수시킨 뒤 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시킨 후 평판배지 위에 밀착시킨 상태로 30~37°C에서 24시간 배양한 후 disc 주변에 생성된 저해환(clear zone, mm)을 측정하여 항균활성을 비교하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 실시하였으며, 얻어진 결과들은 SPSS 14.0(Statistical Package for Social, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software를 이용하여 유의적 차이가 있는 항목에 대해서 Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 유의차 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

80% 에탄올 추출물 및 용매별 분획물 수율

산채류의 항산화 효과를 검토하기 위해 자연 건조하여 마쇄한 시료를 80% 에탄올로 추출하여 감압농축후 고형분 함량을 추출수율(dry basis, %)로 계산한 결과는 Table 2와 같다. 누룩치의 80% 에탄올 추출물 수율은 22.98%였다. 에탄올 추출물에 대한 각 용매별 분획물의 추출 수율은 chloroform 분획이 1.28%로 가장 낮았고, water 분획이 65.63%로 가장

Table 2. Yield of each fractions extracted from *Pleurosporum kamschaticum*

Fraction	Yield (% , w/w)
80% Ethanol ¹⁾	22.98
Fractions of 80% ethanol extract ²⁾	
n-Hexane	7.49
Chloroform	1.28
Ethyl acetate	4.22
n-Butanol	21.66
Water	65.36

¹⁾Yield (%)=weight of solid extract/ weight of dry sample×100.

²⁾Yield (%)=weight of solid fraction/ weight of 80% ethanol extract×100.

Table 3. Total polyphenol contents of various solvent fractions from 80% ethanol extract of *Pleurospermum kamtschaticum*

Solvent	Polyphenol contents (mg/g GAE ¹⁾)
80% Ethanol	155.78 ± 0.97 ^{1)c2)}
<i>n</i> -Hexane	130.60 ± 0.56 ^e
Chloroform	140.72 ± 0.40 ^d
Ethyl acetate	382.73 ± 3.08 ^a
<i>n</i> -Butanol	198.90 ± 0.28 ^b
Water	116.44 ± 0.09 ^f

¹⁾GAE: gallic acid equivalents.

²⁾Values are mean ± SD (n=3).

³⁾Values with different letters within a same column (a-f) differ significantly (p<0.05).

높은 수율을 보였다.

총 폴리페놀 함량

누룩치 80% 에탄올 추출물 및 용매별 분획물의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준용액으로 하여 작성한 표준곡선으로부터 조사하여 Table 3에 나타내었다. 누룩치의 ethyl acetate 분획물에서 382.73 µg/mg으로 분획물중 가장 높은 총 폴리페놀 함량을 나타내었다. 각각의 *n*-butanol, 80% ethanol 추출물, chloroform, *n*-hexane, water 분획물이 198.90, 155.78, 140.72, 130.60, 116.44 µg/mg 순으로 나타내었다.

Choi 등(26)은 국내 시판되는 일부 다류의 경우 폴리페놀 함량이 홍차(101.51 µg/mg), 인삼차(28.30 µg/mg), 녹차(94.90 µg/mg)로 보고하였고, Miliuskas 등(27)은 한방아로마 식물인 *Salvia officinalis*, *Matricaria recutita*, *Potentilla fruticosa*의 폴리페놀 함량은 각각 22.6, 7.5, 37.9 µg/mg으로 보고하였다. 울릉도산 산채류의 80% 메탄올 추출물에서 섬고사리 잎 120.69, 물영정귀 잎 130.22, 눈개승마 잎 66.48 µg/mg의 총 폴리페놀 함량을 나타내었다는 Lee 등(28)의 보고와 비교할 때 본 연구에 사용된 누룩치는 80% ethanol 추출물 및 *n*-butanol, chloroform 분획물에서 높은 폴리페놀 함량을 가지는 것으로 여겨진다.

DPPH 라디칼 소거활성

DPPH 라디칼 소거활성은 검체 농도에 따른 항산화 활성 변화 곡선으로부터 산화를 50% 억제시키는 농도인 IC₅₀으로 나타내었으며, 누룩치 용매별 분획물의 DPPH free 라디칼 소거 활성을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 누룩치의 ethyl acetate 분획물에서 IC₅₀ 값이 0.04 mg/mL로 대조군인 ascorbic acid(0.03 mg/mL)와 비교 시 전혀 뒤떨어지지 않는 활성을 갖고 있었으며, 다음으로 0.25 mg/mL를 나타낸 *n*-butanol 분획물이 유의적으로 높은 소거활성을 나타내었다.

예로부터 식용 또는 약용식물로 사용된 자생식물 중 산초(29)는 ethyl acetate 및 *n*-butanol 분획물에서, 씀바귀(30)는 ethyl acetate 분획에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 보였다는 연구 결과와 일치하였으며, 제주도 자생 노루참나무 추출물의 순차적 분획물 중 ethyl acetate 분획물에서 IC₅₀

Table 4. DPPH radical scavenging activity and ABTS radical scavenging activity of various solvent fractions from 80% ethanol extract of *Pleurospermum kamtschaticum*

Solvent	DPPH radical scavenging activity, IC ₅₀ (mg/mL) ¹⁾	ABTS radical scavenging activity (%) ⁴⁾
80% Ethanol	0.45 ± 0.01 ^{2)d3)}	47.60 ± 0.47 ^d
<i>n</i> -Hexane	1.08 ± 0.01 ^b	17.33 ± 0.15 ^g
Chloroform	0.86 ± 0.02 ^c	35.68 ± 0.18 ^e
Ethyl acetate	0.04 ± 0.00 ^f	98.86 ± 0.09 ^b
<i>n</i> -Butanol	0.25 ± 0.01 ^e	93.68 ± 0.39 ^c
Water	1.14 ± 0.02 ^a	20.03 ± 0.41 ^f
Ascorbic acid	0.03 ± 0.00 ^f	99.42 ± 0.15 ^a

¹⁾Amount required for 50% reduction of hydrogen donating activity.

²⁾Values are mean ± SD (n=3).

³⁾Values with different letters within a same column (a-g) differ significantly (p<0.05).

⁴⁾ABTS radical scavenging activity were measured at 500 µg/mL concentration.

값이 96.99 µg/mL라고 Kang 등(31)은 보고하였으며, 눈개승마와 쇠무릎 잎의 80% 메탄올 추출물에서 RC₅₀ 값이 48.27, 253.87 µg/mL로 나타났다고 보고한 Lee 등(28)의 연구결과와 비교할 때 누룩치는 ethyl acetate 분획물에서 비교적 높은 활성을 나타내었다.

본 연구 결과 총 페놀함량이 가장 높게 측정된 누룩치의 ethyl acetate 분획물에서 DPPH 라디칼 소거 활성 또한 높게 측정되어, 각 추출물이 함유하고 있는 총 페놀 화합물의 함량이 증가하면 항산화 활성도 증가한다는 Seo 등(32)의 보고와 유사하였다.

ABTS 라디칼 소거활성

누룩치 추출물의 분획별 0.5 mg/mL 농도의 ABTS 라디칼 소거활성을 평가한 결과, Table 4에 나타난 바와 같이 누룩치의 ethyl acetate 분획물에서 98.86%로 가장 높게 나타났으며, *n*-butanol 분획물은 93.68%로 높은 활성을 보여 항산화 대조군인 ascorbic acid(99.42%)의 활성과 비교시 본 시료의 ethyl acetate 분획물 활성이 뒤떨어지지 않음을 알 수 있었다. Choi 등(33)은 산수유, 복분자, 음양곽, 우슬, 현삼, 지황 등 14종의 생약 추출물은 50 mg/mL 농도에서 90% 이상의 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었다고 보고하여 본 실험에 사용된 누룩치의 ethyl acetate, *n*-butanol 분획물 활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

Reducing power

환원력은 항산화 활성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있어 항산화 활성에 대한 중요한 인자로 작용한다(34). 따라서 본 실험은 Fe⁺³ 이온에서 Fe⁺² 이온으로의 환원력을 측정하였으며, 이를 700 nm에서의 흡광도 값으로 나타내었다. 환원력이 클수록 녹색에 가깝게 발색되므로 항산화 활성이 큰 물질일수록 높은 흡광도 값을 나타낸다.

누룩치 추출물의 분획물을 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 mg/mL의

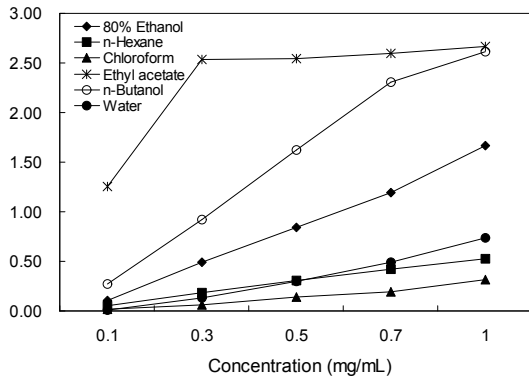


Fig. 1. Reducing power of various solvent fractions from 80% ethanol extract of *Pleurospermum kamtschaticum*.

농도에서 환원력을 측정된 결과(Fig. 1), 모든 용매 분획물은 농도가 증가함에 따라 유의적으로 환원력이 증가하였다. 추출물의 분획물 중 ethyl acetate 분획물이 2.66, *n*-butanol 분획물이 2.61, 80% ethanol 추출물이 1.67의 흡광도 수치로서 유의적으로 높은 환원력을 나타내었으며, 누룩치 ethyl acetate 분획물은 0.3 mg/mL와 1.0 mg/mL 농도 사이에 유의차를 나타내지 않았다. 환원력은 총 폴리페놀 함량 및 다른 항산화 활성 분석 결과와 정확하게 일치하지는 않는데, 이는 페놀 화합물만이 항산화력을 담당한다고는 보기 어렵고(35), 실제로 항산화물질은 연쇄 반응 개시, 전이금속이온 결합, 과산화물의 분해, 라디칼 소거 등의 여러 단계에서 각각 작용하기 때문이라 여겨지며(36), 시료 추출 시 사용되는 용매에 따른 환원력의 차이도 시료마다 상이하다는 보고도 있다(37).

FRAP(Ferric-reducing antioxidant potential) 측정

누룩치 추출물의 분획물에 대한 FRAP value의 결과는 Table 5에 나타내었다. 누룩치는 ethyl acetate(6.81 mM) > *n*-butanol(2.11 mM) > 80% ethanol(1.03 mM) > *n*-hexane(0.78 mM) > chloroform(0.64 mM) > water(0.40 mM) 순으로 ethyl acetate 분획물에서 가장 높은 FRAP value를 나타내었으며, 대조군인 ascorbic acid(9.09 mM) 다음으로 유의적으로 높은 활성을 나타내었다.

Table 5. FRAP (ferric reducing antioxidant potential) and superoxide dismutase (SOD) like activities of various solvent fractions from 80% ethanol extract of *Pleurospermum kamtschaticum*

Solvent	FRAP value (mM)	SOD like activity (%)
80% Ethanol	1.03 ± 0.02 ^{1)d2)}	39.32 ± 2.17 ^d
<i>n</i> -Hexane	0.78 ± 0.03 ^e	35.61 ± 0.23 ^e
Chloroform	0.64 ± 0.01 ^e	56.68 ± 2.23 ^c
Ethyl acetate	6.81 ± 0.04 ^b	86.56 ± 1.13 ^a
<i>n</i> -Butanol	2.11 ± 0.06 ^c	78.23 ± 1.69 ^b
Water	0.40 ± 0.05 ^f	18.64 ± 0.78 ^f
Ascorbic acid	9.09 ± 0.24 ^a	99.95 ± 0.06 ^a

¹⁾Values are mean ± SD (n=3).

²⁾Values with different letters within a same column (a-f) differ significantly (p<0.05).

Choi 등(37)의 칠면초 분획물 중 *n*-butanol 분획의 FRAP value가 2.42 mM로 가장 높았다고 보고와, Moon 등(38)의 부추 메탄올 추출물이 0.162 μM이라는 보고에 비하면 누룩치 추출물의 분획물은 비교적 높은 활성을 나타내었다. 또한 누룩치의 FRAP values는 총 페놀함량에 따른 유의차와 비슷한 경향을 나타내었다. 이는 polyphenol contents와 FRAP values는 높은 상관관계가 있다는 Sánchez-González 등(39)의 보고와 유사한 결과이다.

Superoxide dismutase(SOD) 유사 활성

누룩치 추출물의 SOD 유사활성능을 측정된 결과(Table. 5), ethyl acetate 분획물에서 86.93%로 가장 높은 SOD 유사 활성을 나타내었으며, *n*-butanol(78.23%), chloroform(56.68%), 80% ethanol(39.32%), *n*-hexane(35.61%), water(18.64%) 순으로 활성을 나타내었다. 대조군인 ascorbic acid는 1 mg/mL의 농도에서 99% 이상의 SOD 유사활성을 나타내었다.

Lim 등(40)은 약용식물 조추출액의 SOD 유사활성이 100 mg/mL 농도에서 원지 48.30%, 인진 25.40%, 금은화 21.60%, 광향 16.50%, 마황 5.83%의 활성을 나타내었다고 보고하였으며, 산사자(41) 에탄올 추출물은 1,000 ppm에서 12% 미만의 SOD 유사활성을 나타내었다고 보고되고 있다. 또한 Hong 등(42)은 과일 및 채소 착즙액 1,000 mg/mL 농도에서 케일농축액 26.7%, 키위착즙액 27.6%, 무착즙액 24.1%를 나타내었다고 보고하였다. 본 연구에 사용된 누룩치 ethyl acetate, *n*-butanol, chloroform 분획물은 ascorbic acid의 활성 보다는 낮은 수치를 나타내었으나, 위의 다른 연구 결과들과 비교할 때 여러 종류의 천연물보다 비교적 높은 SOD 유사활성을 갖는 것으로 여겨진다.

Tyrosinase 저해 활성

누룩치의 tyrosinase 저해 활성 측정 결과(Fig. 2.), 5 mg/mL의 농도에서 *n*-butanol 분획물이 43.52%, 80% 에탄올 추출물이 41.64%로 분획물 중 높은 활성을 나타내었으며, 두 분획물간의 유의차는 보이지 않았다. 1~5 mg/mL의 농도에서 누룩치의 *n*-hexane 분획물은 7.65 ± 1.62 ~ 23.82 ± 1.79%의 활성으로 가장 낮게 나타났다.

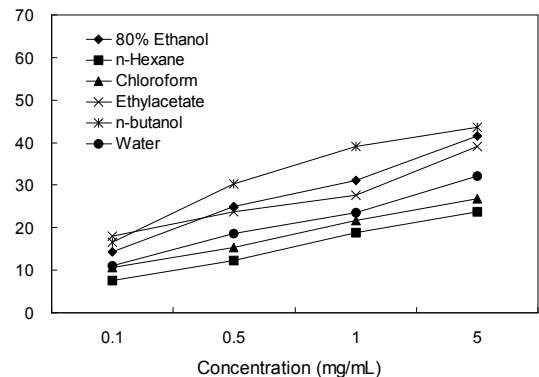


Fig. 2. Tyrosinase inhibition of various solvent fractions from 80% ethanol extract of *Pleurospermum kamtschaticum*.

해조류 및 생약(43)의 methanol 추출물(1 mg/mL)에서 마황 96%, 연교 54%, 감초 52%의 저해활성을 보였다고 보고된 바 있으며, 석이버섯 추출물(44)이 1 mg/mL의 농도에서 ethyl acetate 분획물은 78.2%의 높은 억제 효과를 보였고, 느타리버섯 40.2%, 양송이버섯 51.5%, 운지버섯 48.0%의 높은 tyrosinase 억제 활성을 나타내었다는 결과와 비교하면 누룩치의 tyrosinase 저해활성은 낮은 편이다. 반면, Lee 등(45)은 싸리 추출물이 1.0 mg/mL의 농도에서 6.17~27.61%의 저해활성을 나타내었다고 보고하였으며, Roh 등(46)은 곤달비 잎 추출물의 ethyl acetate 분획물(1 mg/mL)이 29.47%라고 보고하였다. 1 mg/mL의 농도에서 각각 25%, 지실 15%, 산수유 28%의 저해활성이 나타났다는 Choi 등(43)의 결과와 비교하면, 누룩치 *n*-butanol 분획물과 80% ethanol

추출물은 비교적 높은 tyrosinase 저해 효과를 나타내어 피부 미백효과를 나타내는 기능성 화장품 원료 및 식품의 효소적 갈변화를 방지하는 기능성 제품으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

Disc diffusion assay에 의한 항균활성

산채류 추출물에 대한 항균활성을 *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*과 같은 3종의 그람 양성 세균과 *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*과 같은 3종의 그람 음성 세균으로 구성된 총 6종의 세균에 대하여 disc 확산법으로 실시한 결과, Table 6와 같이 누룩치의 경우(0.5 mg/disc) *E. coli*에 대해서 chloroform 분획물의 생육저해환이 16.7 mm로 높은 활성을 나타내었으나, 80% 에탄올 추출물과 나머지 분획물에서는 6종의 세균에 대해 항균활성을 보이지 않았다.

민들레(47)의 메탄올 추출물의 용매 분획 중 ethyl acetate 분획물은 0.5 mg/disc의 농도에서 *E. coli*의 clear zone 직경이 10 mm로 나타났으며, chloroform 분획물은 2 mg/disc의 농도에서 12 mm의 clear zone 직경이 나타났다고 보고하였다. 또한 Lim과 Yun(48)은 냉이 에탄올 추출물(6 mg/disc)은 *B. cereus*(20 mm), *S. aureus*(17 mm), *E. coli* (14 mm)와 같은 항균활성을 나타내었고, 식품 보존료로 사용되는 sodium benzonate(6 mg/disc)의 경우 11~15 mm의 항균활성을 나타낸다는 보고와 비교하면, 누룩치의 주 항균성 물질은 극성용매인 chloroform 층에 잘 녹는 물질이며 부패와 식중독에 영향을 미치는 *E. coli* 균에 대해 강한 항균활성을 나타내는 물질로 추정된다.

요 약

본 연구는 누룩치의 생리활성효과와 미백 및 화장품 및 식품 보존제 등의 소재로서 활용가능성이 있는지 알아보고자 누룩치 에탄올 추출물과 용매별 분획물의 항산화 활성 및 tyrosinase 저해 활성, 항균효과를 측정하였다. 누룩치의 80% ethanol과 분획물의 총 폴리페놀 함량은 116.44~382.73 mg/g GAE로 나타났으며, 분획물 중 ethyl acetate 분획물에서 가장 높은 총 폴리페놀 함량을 나타내어 페놀화합물이 주로 ethyl acetate 분획물에 다량 존재하는 것으로 나타났다. 누룩치 용매분획물의 항산화 활성은 ethyl acetate 분획물에서 DPPH 라디칼 소거활성 IC₅₀ 값이 0.04 mg/mL, ABTS 라디칼 소거활성(0.5 mg/mL)이 98.86%로 대조군인 ascorbic acid와 비교 시 전혀 뒤떨어지지 않는 활성을 갖고 있는 것으로 분석되었으며, 다음으로는 *n*-butanol 분획물이 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 환원력은 ethyl acetate 분획물과 *n*-butanol 분획물에서 높은 흡광도 수치를 나타내었으며, FRAP value 측정 결과 ethyl acetate 분획물에서 높게 나타났다. SOD 유사활성은 1 mg/mL의 농도에서 ethyl acetate 분획물(86.93%), *n*-butanol(78.23%) 순으로 높은 활성을 나타내었다. Tyrosinase 저해 활성 측정 결과(5 mg/mL),

Table 6. Antibacterial activities of various solvent fractions from 80% ethanol extract of *Pleurospermum kamtschaticumin*

Microorganisms	Solvent	Size of clear zone (mm)	
		Fraction conc. (mg/disc)	
		0.1	0.5
<i>B. cereus</i>	80% Ethanol	— ¹⁾	—
	<i>n</i> -Hexane	—	—
	Chloroform	—	—
	Ethyl acetate	—	—
	<i>n</i> -Butanol	—	—
	Water	—	—
<i>B. subtilis</i>	80% Ethanol	—	—
	<i>n</i> -Hexane	—	—
	Chloroform	—	—
	Ethyl acetate	—	—
	<i>n</i> -Butanol	—	—
	Water	—	—
<i>S. aureus</i>	80% Ethanol	—	—
	<i>n</i> -Hexane	—	—
	Chloroform	—	—
	Ethyl acetate	—	—
	<i>n</i> -Butanol	—	—
	Water	—	—
<i>E. coli</i>	80% Ethanol	—	—
	<i>n</i> -Hexane	—	—
	Chloroform	—	16.7
	Ethyl acetate	—	—
	<i>n</i> -Butanol	—	—
	Water	—	—
<i>S. enterica</i>	80% Ethanol	—	—
	<i>n</i> -Hexane	—	—
	Chloroform	—	—
	Ethyl acetate	—	—
	<i>n</i> -Butanol	—	—
	Water	—	—
<i>P. aeruginosa</i>	80% Ethanol	—	—
	<i>n</i> -Hexane	—	—
	Chloroform	—	—
	Ethyl acetate	—	—
	<i>n</i> -Butanol	—	—
	Water	—	—

¹⁾Not detected.

n-butanol 분획물이 43.52%, 80% ethanol 추출물이 41.64%로 나타났다. Paper disc 방법에 의한 항균활성은 누룩치의 chloroform 분획물이 *E. coli*에 대해서 16.7 mm(0.5 mg/disc)의 저해환 크기를 나타내었다. 따라서 본 연구 결과 누룩치의 분획물들은 비교적 높은 항산화활성 및 미백 효과, 항균효과를 가지고 있으므로 식품 첨가물 및 화장품 원료 등 기능성 소재로 사용할 수 있을 것으로 여겨진다.

문헌

- Ames BN. 1989. Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radical Res Commun* 7: 121-128.
- Cha BC, Lee HW, Choi MY. 1998. Antioxidative and antimicrobial effects of nut species. *Kor J Pharmacogn* 29: 28-34.
- Chang SS, Ostric-Matijasevic B, Hsieh OAL, Huang CL. 1977. Natural antioxidants from rosemary and sage. *J Food Sci* 42: 1102-1106.
- Jeong SJ, Lee JH, Song NH, Seong SN, Lee SE, Baeg NI. 2004. Natural products organic chemistry; screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 135-140.
- Kim EJ, Ahn MS. 1993. Antioxidative effect of ginger extracts. *Korean J Soc Food Sci* 9: 37-42.
- Rural Development Administration. 1999. Wild vegetables cultivation (Standard Farming Handbook-60). Suwon, Korea. p 110-111.
- Lim SJ, Park NJ. 1994. A study on the development of new recipes of 5-Korean wild vegetables. *Korean J Soc Food Sci* 10: 412-419.
- Heo SI, Wang MH. 2008. Antioxidant activity and cytotoxicity effect of extracts from *Taraxacum mongolicum* H. *Kor J Pharmacogn* 39: 255-259.
- Hendrich S, Lee KW, Xu X, Wang HJ, Murphy PA. 1994. Defining food components as new nutritions. *J Nutr* 124: 1789S-1792S.
- Ueda S, Kuwabara Y, Hirai N, Sasaki H, Sugahara T. 1991. Antimutagenic capacities of different kinds of vegetables and mushrooms. *Nihon Shokubin Kogyoo Cakkaishi* 38: 507-514.
- Hwang BH, Zhao JL, Choi KP, Jung SW, Kim EJ, Ham SS. 1996. The antimutagenic and anticancer effect of *Taxus cuspidate* extracts. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 1062-1068.
- Jhee OH, Yang CB. 1996. Antioxidative activity of extract from *Bangah* herb. *Korean J Food Sci Technol* 28: 1157-1163.
- Lee BW, Shin DH. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. *Korean J Food Sci Technol* 23: 200-204.
- Ham SS, Lee SY, Oh DW, Jung SW, Kim SH, Chung CK, Kang IJ. 1998. Antimutagenic and antigenotoxic effects of *Ligularia fischeri* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 745-750.
- Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. 1995. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 27: 80-85.
- Shin DH, Kim MS, Han JS. 1997. Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractions against food-borne bacteria. *Korean J Food Sci Technol* 29: 808-816.
- Chung MS, Lee MS. 1998. Analysis of volatile flavor component of *Pleurospermum kamtschaticum*. *Korean J Soc Food Sci* 14: 541-546.
- Lim JH, Hong CK, Hong DG, Bang SB, Yoo KO. 1996. Studies on the cultivation of *Pleurospermum kamtschaticum* Hoff. as a special vegetable indigenous to high land area. *RDA J Agri Sci* 38: 31-41.
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-243.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Pellegrin N, Roberta R, Min Y, Catherine RE. 1998. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Method Enzymol* 299: 379-389.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 230: 70-76.
- Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucoseamine. *Jap J Nutr* 44: 307-315.
- Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
- Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. 1986. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Plant Medica* 52: 517-519.
- Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 723-727.
- Miliauskas G, Venskutonis PR, van Beek TA. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem* 85: 231-237.
- Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J Food Sci Technol* 37: 233-240.
- Jang MJ, Woo MH, Kim YH, Jun DY, Rhee SJ. 2005. Effects of antioxidative, DPPH radical scavenging activity and antithrombogenic by the extract of sancho (*Zanthoxylum schinifolium*). *Korean J Nutr* 38: 386-394.
- Kim MJ, Kim JS, Cho MA, Kang WH, Jeong DM, Ham SS. 2002. Biological activity of *Ilex dentata* Nakai juice extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 924-930.
- Kang MC, Lee JY, Lee JA, Han JH, Kim BS, Kim GO. 2008. Antioxidant effects and melanin inhibitory effect of natural *Pimpinella komarovii* extracts in Jeju island. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 77-82.
- Seo YH, Kim IJ, Yie AS, Min HK. 1999. Electron donating ability and contents of phenolic compounds, tocopherols and carotenoids in waxy corn (*Zea mays* L.). *Korean J Food Sci Technol* 31: 581-585.
- Choi SS, Yim DS, Lee SY. 2009. Radical scavenging activities and protective effects against oxidative damage to DNA of extracts from medicinal plants with known osteoprotective effects. *Kor J Pharmacogn* 40: 143-149.
- Meir S, Kanner J, Akiri B, Philosoph-Hadas S. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J Agric Food Chem* 43: 1813-1819.
- Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radic Res* 36: 177-187.
- Diplock AT. 1997. Will the 'good fairies' please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease?

- Free Radic Res* 27: 511-532.
37. Choi JI, Kim YJ, Kim JH, Song BS, Yoon Y, Byun MW, Kwon JH, Chun SS, Lee JW. 2009. Antioxidant activities of the extract fractions from *Suaeda japonica*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 131-135.
 38. Moon GS, Ryu BM, Lee MJ. 2003. Components and anti-oxidative activities of *Buchu* (Chines chives) harvested at different times. *Korean J Food Sci Technol* 35: 493-498.
 39. Sánchez-González I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F. 2005. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chem* 90: 133-139.
 40. Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM. 2004. Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. *Korean J Medicinal Crop Sci* 12: 191-202.
 41. An BJ, Lee JT. 2002. Studies on biological activity from extract of *Crataegi Fructus*. *Kor J Herbology* 17: 29-38.
 42. Hong HD, Kand NK, Kim SS. 1998. Superoxide dismutase-like activity of apple juice mixed with some fruits and vegetables. *J Korean Food Sci Technol* 30: 1484-1487.
 43. Choi BW, Kee BH, Kang JH, Lee ES, Lee NH. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor J Pharmacogn* 29: 237-242.
 44. Park YH, Chang SK. 1997. Screening of inhibitory effect of edible mushrooms on tyrosinase and isolation of active component. *J Fd Hyg Safety* 12: 195-199.
 45. Lee YS, Joo EY, Kim NW. 2006. Polyphenol contents and physiological activity of the *Lespedeza bicolor* extracts. *Korean J Food Preserv* 13: 616-622.
 46. Roh EJ, Kim YS, Kim BG. 2009. Effect of antioxidation and inhibition of melanogenesis form *Ligularia stenocephala* extract. *J Korean Oil Chemists' Soc* 26: 87-92.
 47. Kim KH, Chun HJ, Han YS. 1998. Screening of antimicrobial activity of the dandelion (*Taraxacum platycarpum*) extract. *Korean J Soc Food Sci* 141: 114-118.
 48. Lim HA, Yun SI. 2009. Antimicrobial activities of *Capsella bursa-pastoris* extracts. *Korean J Food Preserv* 16: 562-566.

(2012년 6월 28일 접수; 2012년 7월 19일 채택)