

Radish(*Raphanus sativus* L. var. *sativus*)추출물의

피부노화 저해효과

김지은, 황현익, 이인순, 문혜연

대구대학교 공과대학 생물공학과

전화(053) 850-6552, FAX (053) 850-6559

Abstract

Antioxidative activities and anti skin aging effects of radish(*Raphanus sativus* L. var. *sativus*) extracts were studied.

The DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazal) inhibitory effects and CAT(Catalase) activities of hydrophilic radish extracts(DPPH 81.0%, CAT 175units/mg) were significantly higher than lipophilic radish extracts(DPPH 50.0%, CAT 45units/mg).

But, SOD(superoxide dismutase) activities of hydrophilic radish extracts(SOD 81.3%) were lower than lipophilic radish extracts(SOD 92.3%)

In the Bovine Achilles Tendon collagen treated with hydrophilic radish extracts and lipophilic radish extracts, the pyridinoline concentration of collagen were decreased, respectively.

서 론

대부분의 호기성 생물은 각종 스트레스를 받으면 생체내의 산소를 O_2 , H_2O_2 , OH 등의 반응성이 높은 활성산소종 (active oxygen species)으로 변화시킨다.

이들 활성산소종은 각종 성인병과 노화, 특히 피부노화의 원인물질로 알려져 관심의 대상이 되고 있다. 이러한 독성 활성산소종으로부터 자기를 보호하기 위하여 생물은 Superoxide Dismutase(SOD), Peroxide(POD), Catalase(CAT)등의 항산화 효소와 ascorbate, α -tocopherol, glutathione 등의 항산화물질을 생산하여 방어하지만 완벽하지는 못하다.

따라서 본 연구에서는 뿌리는 적색이며, 유럽이 원산지인 radish(*Raphanus sativus* L. var. *sativus*)를 수용성과 지용성으로 나누어 추출하였고, 그 추출물이 노화의 원인물질로 알려진 활성산소종에 대하여 억제효과가 있는지 알아보기 위하여 DPPH inhibition, SOD, CAT activity에 미치는 영향을 알아보았다.

또한, 노화동안에 피부결합조직에서 콜라겐의 안전성이 증가하는데, 이런 콜라겐 안전성에 관여하는 가교증가를 저해하는 효과가 있는지를 알아보기 위하여 가교물질인 pyridinoline 함량변화를 알아보았다.

재료 및 방법

Radish는 2001년 7월, 대구소재, 칠성시장에서 구입하여 사용하였다. Radish를 50% ethanol(4℃)에서 3일간 추출하였다. 추출물은 감압농축하고, ethyl acetate를 첨가, 분배하여 상층(지용성)과 하층(수용성)으로 나누고, filtration후, 다시 감압농축하여 사용하였다.

Bovine Achilles Tendon은 언양 도살장에서 기증 받아 냉동보관 하였다가 사용하였다.

그 외, NBT, DPPH, Xanthine, Xanthine oxidase, H₂O₂등의 시약들은 Sigma(미국) 제품을 사용하였다.

DPPH 저해효과

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazal(DPPH)에 의한 free radical 저해효과는 Ill Min(2000)의 방법으로 측정하였다. 50% ethanol에 녹인 0.35mM DPPH 1ml 에 sample 1mg을 첨가하여 반응시킨 후, 517nm에서 흡광도 변화를 관찰하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = (1-A/B) \times 100$$

A : absorbance of sample
B : absorbance of control

SOD 활성측정

SOD Activity는 McCord(1969)의 방법으로 측정하였다

효소측정을 위한 반응액 (5mM xanthine 0.2ml, 1mM NBT 0.1ml, 0.1mM EDTA를 포함하는 50mM phosphate buffer 2ml)은 매번 조제하여 사용하였다. 위 반응액에 sample(5mg)을 넣고 5분간 반응시킨 후, Xanthine oxidase을 첨가하여 550nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = (1-A/B) \times 100$$

A : absorbance of sample
B : absorbance of control

Catalase 활성측정

McHale(1987)의 방법으로 측정하였다.

반응액은 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 1ml, 3% H₂O₂ 1ml, sample 1mg으로 이루어져 있다. CAT활성은 240nm에서 흡광도의 감소로 측정하였으며, 1unit는 1분에 1umol의 H₂O₂를 분해시키는 양으로 계산하였다.

콜라겐 추출

1M NaCl/ 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5, 4℃)에 Bovine Achilles Tendon을 잘게 썰어 넣어 4℃에서 4시간 동안 추출하였다. 추출물은 원심분리하여 상등액에 NaCl을 최종농도가 20%가 되도록 첨가하여 12시간 동안 재추출하여 상등액의 비콜라겐 부분을 제거하고 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5, 4℃)에서 투석하여 사용하였다.

Lysyl oxidase 추출

0.15M NaCl/ 0.1M Na₂HPO₄ buffer(pH7.8)에 Bovine Achilles Tendon을 잘게 썰어 넣고 균질화 한후, 추출물을 원심분리하여 6M Urea/ 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5, 4℃)에 pellet

을 넣고 4°C, 12시간 동안 추출하였다. 추출물은 다시 원심분리하여 상등액을 50mM Tris-Hcl buffer(pH 7.5, 4°C)에서 투석하여 사용하였다.

콜라겐 내의 pyridinoline 함량변화

콜라겐은 37°C에서 2시간 동안 perincubation한 후 실험에 사용하였다.

반응액(collagen 10mg, lysyl oxidase 5mg, 50mM Tris-Hcl buffer 2ml, sample 5mg)을 37°C에서 3일간 배양한 후, 6N HCl 5ml을 첨가하여 110°C, 7시간 동안 가수분해하고, 감압농축한 후, 5ml H₂O로 녹여내어 사용하였다. 이 시료용액은 Woessner(1961)법에 의해 Hydroxyproline양을 측정하고 collagen 값으로 환산하였다.

$$\text{collagen}(\mu\text{g}) = 1/0.11 \times \text{Hyp}(\mu\text{g})$$

collagen 중의 Hyp비율은 평균 110잔기/1000잔기이므로 이와 같이 계산하였고, Fujimoto(1978) 등에 의한 방법으로 pyridinoline 양을 측정하여 비교하였다.

결과 및 고찰

수용성추출물이 지용성 추출물보다 DPPH 저해율과 Catalase 활성에서 높은 결과를 보인 반면, SOD Activity에서는 지용성 추출물이 좀 더 높은 활성을 보였다. (Table 1, Fig. 1)

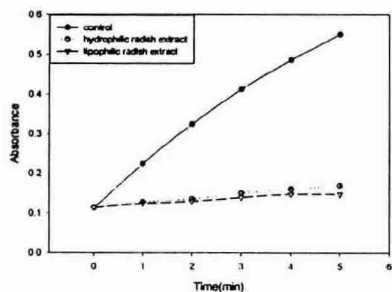


Fig. 1. Superoxide Dismutase Activity.
Reduction of NBT by infused O₂⁻ and inhibition by radish

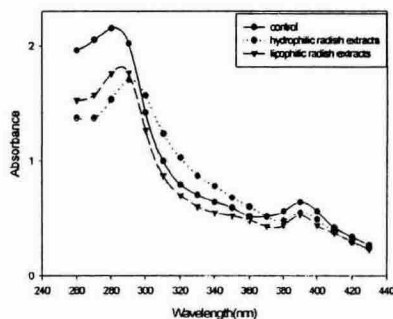


Fig. 2. Excitation and absorbance of pyridinoline.
The sample had pooled absorbance 395nm and 295nm.

Bovine Achilles Tendon의 콜라겐 함량은 21.45 μg 이었으며, control에 비하여 radish 추출물을 첨가한 반응액에서 pyridinoline 함량이 적었으나, 수용성과 지용성 추출물을 비교해 봤을 때, 큰 차이는 보이지 않았다. (Fig. 2)

정확한 pyridinoline 함량의 측정엔 현재 연구 중에 있다.

Table 1. Effect of DPPH Inhibition, SOD and Catalase Activity

Sample		DPPH Inhibition (%)	SOD Activity (%)	Catalase Activity (units/mg)
radish	hydrophilic extracts	81.0	81.3	175
	lipophilic extracts	50.0	92.3	45

요 약

Radish추출물을 수용성과 지용성으로 나누어 추출하여 DPPH 저해율, SOD 활성율, Catalase 활성, collagen 함량변화를 측정 한 결과, DPPH 저해율과 Catalase 활성은 수용성 추출물(81.0%, 175units/mg)에서 높게 나타났고, SOD 활성율에서는 지용성 추출물(92.3%)이 높게 나타났다.

콜라겐(21.45 μ g)내의 pyridinoline의 함량은 control에 비해 수용성과 지용성 추출물을 첨가한 반응액에서 적었으며, 두 추출물을 비교해 봤을 때 큰 차이는 보이지 않았다.

참고문헌

1. Ill Min Chung, Kwang Ho Kim, Joung Kuk Aaahn and Jin Oohk Lee, "Varietal Variation in Antioxidative Activity of Rice Grain by DPPH and TBA Method" (2000), Kor. J. Crop sci. 45(4), 261-266
2. Evelyn A. Havir and Neli A. McHale, " Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves"(1987) Plant physiol. 84, 450-455
3. Joe M. McCord and Irwin Fridovich "Superoxide Dismutase"(1969) J.Biological chemistry, 244(22), 6049-6055
4. 김미향, 비타민 C가 가용성 콜라겐 성숙과정에서 Pyridinoline 생성 효소계에 미치는 영향(1998), J.Korean Soc. Food Sci. Nutr 27(2) 305-312
5. Daisauro Fujimoto and Takahiko Moriguchi "Pyridinoline, a Non-Reducible Crosslink of collagen."(1978) J.Biochem. 83, 863-867
6. J. F. Woessner, "The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of this Imino Acid"(1961) Archives of biochemistry and Biophysics, 93, 440-447