

# 세포벽 분해효소 처리에 의한 연잎 추출물의 항산화 및 tyrosinase 저해 활성

최선주<sup>1</sup> · 김소영<sup>1,2</sup> · 이성철<sup>1</sup> · 이진만<sup>1</sup> · 이인숙<sup>3</sup> · 정문영<sup>3</sup> · 양삼만<sup>3</sup> · 채희정<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>호서대학교 식품생물공학과 및 식품기능안전연구센터, <sup>2</sup>내추럴초이스(주), <sup>3</sup>김포시농업기술센터

## Anti-oxidant and Whitening Effects of Cell Lytic Enzyme-treated Lotus Leaf Extract

Sun Ju Choi<sup>1</sup>, Soyoung Kim<sup>1,2</sup>, Sung Chul Lee<sup>1</sup>, Jin Man Lee<sup>1</sup>, In Suk Lee<sup>3</sup>, Moon Yung Jung<sup>3</sup>, Sam Man Yang<sup>3</sup>, and Hee Jeong Chae<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Biotechnology, and Center for Food Function and Safety, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

<sup>2</sup>Natural Choice Co., Ltd, Asan 336-795, Korea

<sup>3</sup>Gimpo Agricultural Technical Center, Gimpo 415-743, Korea

**Abstract** The effects of cell lytic enzyme treatment on total phenolic content, antioxidant and antityrosinase activities of lotus leaf were investigated. The dried lotus leaves were hydrolyzed by cell lytic enzymes such as Promozyyme, Ceremix, Pectinex, Ultraflo, Celluclast, Pentopan, Tunicase, Viscozyme at their optimum pHs (pH 5-8) at 50°C for 4 hrs. Depending on the enzymes used, total phenolic compounds content was measured as 1,079-1,476 µg/mL, and antioxidant activities and whitening activities were increased by 5~10% and 20%, respectively. Among the tested hydrolytic enzymes, Promozyyme (pullulanase) was selected as the most suitable enzyme for the extraction of total polyphenol from lotus leaf. The optimal dosage of Promozyyme were found to be 1-2% (w/w). By Promozyyme treatment, total phenolic compounds content of the lotus extract significantly increased compared to the extraction without enzyme treatment.

**Keywords:** lotus leaf, total polyphenol, cell lytic enzyme, antioxidant, antityrosinase

### 서 론

생활수준의 향상과 평균수명의 연장으로 피부 미용에 대한 관심이 높아지고 있으며, 자외선 노출 증가로 인한 피부의 광노화 증가는 항산화제 및 피부 미백용 기능성 소재에 대한 관심을 더욱 증가시키고 있다.

피부와 관련된 산화적 스트레스의 주 원인인 태양 자외선에 의한 피부 손상은 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)에 의해서 매개되며, 항산화제의 고갈, 지질의 과산화, 단백질의 산화 및 DNA의 산화적 손상 등의 결과를 가져온다 [1-6]. 대표적인 항산화제에는 vitamin C, tocopherol,

flavonoid 등이 있으며, BHT, BHA 등의 합성 항산화제가 있다. 합성 항산화제는 세포대사 및 호흡작용을 방해하며 발암성이 있고 독성이 강하다는 문제점이 보고되고 있어 이를 대체할 만한 천연 항산화제의 개발이 매우 시급하다. 천연 항산화제 중 특히, flavonoid는 지질의 산화, 활성산소 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로써 노화방지 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과가 있다 [7].

멜라닌 (melanin)은 동물, 식물 및 미생물에 널리 존재하는 페놀류의 고분자 물질로 멜라닌 색소의 생합성은 tyrosinase 효소를 비롯하여 여러 효소들에 의하여 조절되고 있으며, 그 중 tyrosinase는 tyrosine을 기질로 하여 L-dopaquinone으로 전환되는 산화 반응을 촉매한다 [8,13,15]. 현재 tyrosinase 활성 억제제를 찾는 연구가 미백제의 개발에 있어서 중요한 부분을 차지하고 있으며, 저해제로서 kojic acid, arbutin 등이 미백제로 사용되고 있으나, 부작용이 보고되면서 안전하

### \*Corresponding author

Tel: +82-41-540-5642, Fax: +82-41-532-5640

e-mail: hjchae@hoseo.edu

면서도 미백활성이 높은 물질의 개발이 요구되고 있다.

연 (蓮, *Nelumbo nucifera Gaertner*)은 수련과의 여러해살이 수생 식물로서 연잎에서 분리된 생리활성 성분으로는 nelumboside, nuciferine, coclaurine 등의 alkaloid류, gallic acid와 methyl gallate 등의 aromatic acid류 및 quercetin, isoquercitrin, hyperoside, rutin, kaempferol 등의 flavonoid류가 있다 [9-11]. 현재까지 연잎의 기능성과 관련된 연구는 연잎 분말 첨가에 따른 두부, 식빵, 어묵 등의 품질특성에 관련된 연구 [16,19,20]가 있으며, 또한 비만과 고지혈증에 관한 연구 [21,22]가 보고되고 있으나, 화장품 효능 평가에 대한 연구 [23]는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 연잎을 이용한 항산화 및 미백 기능을 보유한 향장소재 개발을 위한 연구의 일환으로 세포벽 분해효소를 이용하여 연잎을 가수분해함으로써 유효성분의 추출율을 증대시키고자 하였다. 즉 다량의 페놀 화합물이 함유되어 있는 연잎으로부터 항산화물질을 추출하는 일반적인 열수추출 방법 대신 효소처리 방법을 검토하였다. 또한 효소처리에 의한 연잎 추출물의 항산화 활성 및 tyrosinase 저해활성의 변화를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 기기

본 연구에 사용된 연잎은 김포에서 재배된 연으로 김포 시농업기술센터로부터 제공받아 사용하였다. 효소 활성 분석용 tyrosinase는 Fluka사 (Japan)의 제품을 사용하였고, L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA)와 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)은 Sigma사 (MO, USA)의 제품을 이용하였다. 그 밖의 사용한 시약은 모두 일급시약을 사용하였다.

연잎의 가수분해를 위해 NOVO Nordisk A/S사 (Denmark)의 Pentopan, Ceremix, Viscozyme, Ultraflo, Pectinex, Celluclast, Promozyme와 Diawakasei사 (Japan)의 Tunicase 효소를 사용하였다.

### 효소처리 방법

건조된 연잎을 0.15 mm의 크기로 분쇄하여 중량 대비 20배수의 증류수에 현탁하였고, 0.1 N HCl 또는 0.1 N NaOH를 사용하여 pH 5~8로 조정된 후, 세포벽분해 효소인 Pentopan, Ceremix, Viscozyme, Ultraflo, Pectinex, Celluclast, Tunicase, Promozyme 효소를 각각 연잎 건조 중량 대비 2% (w/w)의 농도로 첨가하였다. 각 시료를 항온 수조에 넣고 50°C에서 4시간동안 효소 처리하여 여과지 Whatman No. 41로 여과한 상등액을 분석용 시료로 사용하였다.

### 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis assay법 [14]으로 측정

하였다. 시료 희석액 0.1 mL에 folin-ciocalteu reagent 50  $\mu$ L를 첨가하여 혼합한 후 4분간 실온에서 반응시킨 다음, 20% sodium carbonate anhydrous 포화용액 1.5 mL를 첨가하여 2분간 반응시키고 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 chlorogenic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였다. 실험결과는 3회 반복 측정 후 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다.

### DPPH법을 이용한 자유 라디칼 (free radical) 소거능 측정

연잎에 대한 자유 라디칼 소거능 측정은 메탄올에 0.4 mM의 농도로 용해한 DPPH 용액 160  $\mu$ L와 시료 40  $\mu$ L를 첨가하여 암소 (dark site)에서 30분간 방치한 다음 microplate reader (VERSAmax, Molecular Device, CA, USA)를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다 [17]. DPPH 라디칼 소거능은 시료 첨가구 ( $A_{\text{Experiment}}$ ), 무첨가구 ( $A_{\text{Control}}$ ) 및 DPPH를 첨가하지 않은 공시험 ( $A_{\text{Blank}}$ )의 흡광도값을 이용하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = 1 - \left[ \frac{(A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}})}{(A_{\text{Control}})} \right] \times 100$$

### Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성은 L-tyrosine으로부터 멜라닌 생성 과정에 tyrosinase 효소 작용에 의해 생성되는 DOPA 생성물을 측정하는 방법으로 측정하였다 [18]. Tyrosinase 저해활성은 0.5 M 인산완충용액 (pH 6.5) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 dopachrome을 475 nm에서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 연잎 추출물의 DPPH 자유 라디칼 소거능

초본식물의 추출물을 제조하는데 있어서 다양한 효소처리에 의한 추출 방법을 이용하여 유효성분의 추출을 향상시킬 수 있다. 예를 들어 황기 추출물의 경우 Viscozyme과 Pectinex 병합처리군, Viscozyme과 Celluclast 병합처리군과 개별 효소 처리군에서 비처리군에 비해 2~3배의 높은 항산화 활성을 보였다고 보고된 바 있다 [12]. 본 연구에서는 연잎 추출물 조제 시 세포벽 분해효소를 사용하여 폴리페놀과 같은 항산화 물질의 추출을 증대효과를 알아보려고 하였다.

생체막에 있어 활성산소 또는 지질 과산화라디칼에 의해 개시된 지질 과산화 반응은 자동산화 과정을 경유한 연쇄 반응으로, 항산화제는 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에

수소 donor (주개)로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 이 때, 수소 주개로 작용하는 항산화제의 활성은 라디칼인 DPPH와의 반응을 통하여 알아볼 수 있다.

총 8종 (Tunicase, Pentopan, Ceremix, Viscozyme, Ultraflo, Pectinex, Celluclast, Promozyme)의 효소를 이용하여 처리한 연잎 추출물을 2%의 농도로 조제하여 항산화 효과를 측정하였다. 양성대조군으로는 항산화 효과가 알려진 DL- $\alpha$ -tocopherol (vitamin E)를 이용하였으며 50  $\mu$ g/mL의 저농도에서 95% 이상의 높은 항산화 활성을 보였다. Fig. 1은 8종의 효소로 각각 처리하여 조제한 연잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 비교한 것이다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 사용한 분해효소 중 Viscozyme을 제외한 모든 효소 처리군에서 비처리군에 비해 높은 항산화 활성을 나타내었고, 그 중 Promozyme과 Ceremix로 효소 처리한 연잎 추출물이 높은 활성을 나타내었다. 연잎 추출물에서는 효소처리의 효과가 앞서 보고한 황기추출물의 경우 [12]보다 낮은 것으로 나타났다.

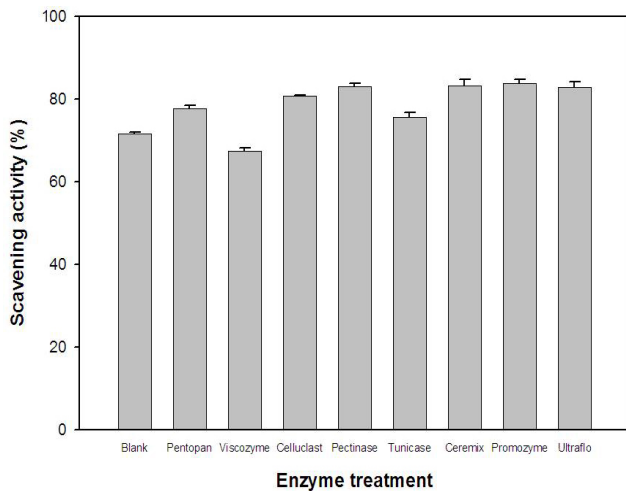


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of lotus leaf extract treated by various cell lytic enzymes.

**연잎 추출물의 tyrosinase 저해능**

Tyrosinases는 melanin 합성에 관여하는 효소로 체내의 L-tyrosine에서 DOPA를 생성하게 되고 연속된 효소적 산화를 일으킨다. 본 연구에서는 연잎 추출물이 멜라닌 색소의 중요한 단계를 촉매하는 효소인 tyrosinase 활성의 저해 정도를 각각의 효소처리에 따라 조제한 연잎 추출물에 대하여 저해활성을 비교하였다 (Fig. 2). 8종 (Tunicase, Pentopan, Ceremix, Viscozyme, Ultraflo, Pectinex, Celluclast, Promozyme)의 효소로 가수분해 처리한 연잎 추출물의 tyrosinase 저해활성을 분석한 결과, 효소처리하지 않은 연잎 추출물 (비처리군)에서 25%의 tyrosinase 저해효과를 보인 반면 Ultraflo, Pentopan, Celluclast, Pectinase, Ceremix, Promozyme 효소 처리한 연잎 추출물에서 50-55%의

tyrosinase 활성 저해 효과를 나타냈으며, 전체적으로 효소 추출한 연잎 추출물에서 비처리군보다 높은 tyrosinase 활성 저해 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 식물 (세이지 또는 로즈마리)의 잎에서 추출된 페놀화합물 성분이 효소활성을 저해한다는 결과와 유사한 결과이다 [24].

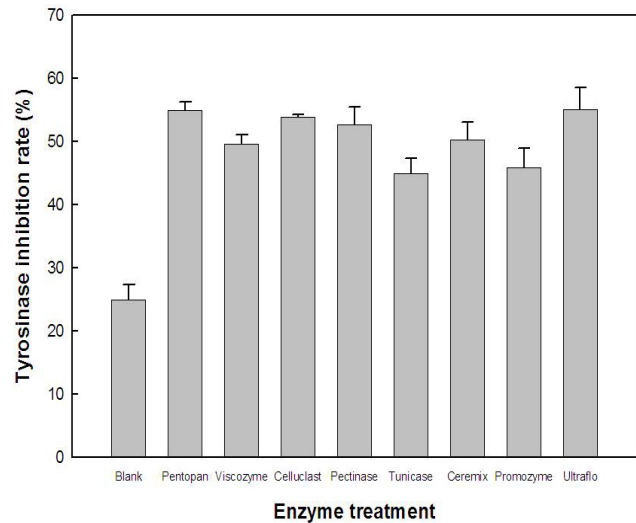
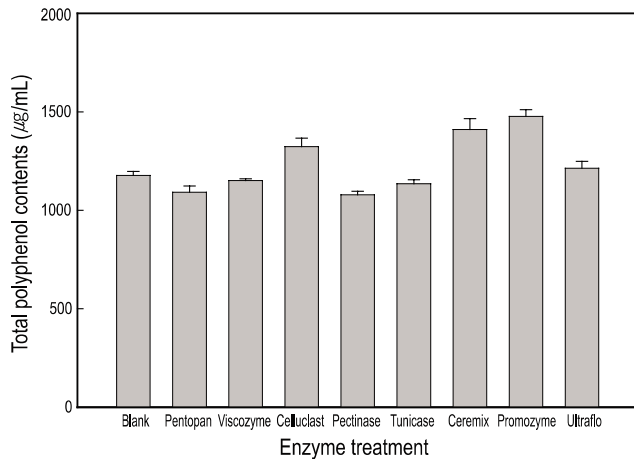


Fig. 2. Tyrosinase inhibition activity of lotus leaf extract treated by various cell lytic enzyme.

**효소처리에 따른 연잎 추출물의 총 폴리페놀 함량**

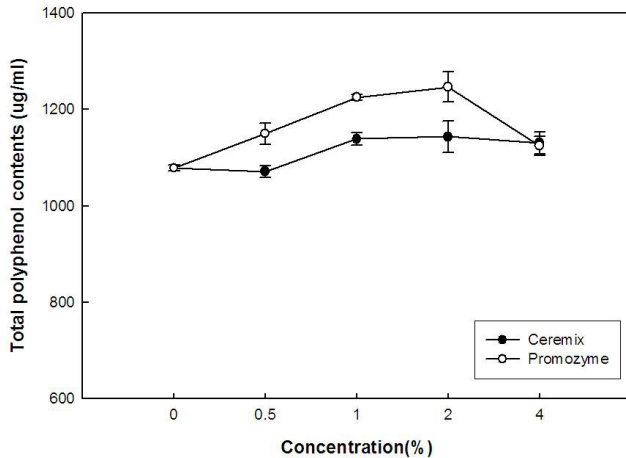
페놀성 화합물은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사 산물 중의 하나로서 -OH기를 갖고 있어 수소를 공여하기 쉽고, 단백질 등 거대 분자들과 결합하는 성질이 있어 항산화, 항균 활성 등과 밀접한 관계가 있다 [11]. 연잎에는 gallic acid, quercetin, rutin, kaempferol 등의 다수의 페놀화합물이 함유되어 있어 높은 항산화능을 보이는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 황기의 유효성분인 clycosin과 formononetin의 추출 함량을 높이기 위하여 효소를 사용한 결과 [12] 효소비처리군에 비해 Viscozyme, Pectinex, Celluclast 효소 처리군에서 4~5배 정도 함량이 증가하였다. 건조된 연잎을 증류수에 현탁한 후 Pentopan, Ceremix, Viscozyme, Ultraflo, Pectinex, Celluclast, Tunicase, Promozyme 효소를 연잎의 건조 중량 대비로 2% 농도로 첨가한 후 50°C에서 연잎 추출물을 조제하였다. 효소처리 연잎추출물의 총 폴리페놀 함량을 표준용액 chlorogenic acid로부터 작성한 검정곡선을 이용하여 정량한 결과는 Fig. 3과 같다.

사용한 분해효소 중 Ceremix, Celluclast, Promozyme 처리한 경우, 연잎 추출물의 총 폴리페놀 함량이 각각 1,409.9  $\mu$ g/mL, 1,323.7  $\mu$ g/mL, 1,476.6  $\mu$ g/mL로서 효소 비처리군 (1,024  $\mu$ g/mL)에 비해 12~25.5% 가량 더 높게 나타났으며 Promozyme로 처리한 군에서 가장 높은 폴리페놀 함량 (1,476.6  $\mu$ g/mL)을 나타냄을 알 수 있었다. 그 다음으로는 Ceremix가 높은 폴리페놀 함량 증대 효과를 나타냈다.



**Fig. 3.** Effect of cell lytic enzyme treatments on total polyphenol contents.

또한 총 폴리페놀 추출을 증대효과가 높은 2종 효소 (Promozyme과 Ceremix)의 농도를 달리하여 실험한 결과 (Fig. 4) 1~2%의 농도로 효소처리하였을 경우 농도의존적으로 총 폴리페놀 함량이 증대되었다. 2종의 효소 중 Promozyme이 Ceremix보다 총 폴리페놀 추출을 증대효과가 더 높은 것으로 나타나 (Fig. 3과 Fig. 4) Promozyme이 총 폴리페놀 추출 증대를 위한 효소로 선별되었다.



**Fig. 4.** Effect of enzyme concentration on total polyphenol contents.

이상의 결과들은 세포벽분해 효소 처리에 의해 연잎 추출물의 항산화 효과가 증진 될 수 있으며 유효성분인 총 폴리페놀의 추출 효율을 높일 수 있어서 향후 화장품 소재의 개발 과정에 응용할 수 있는 결과라고 판단된다.

## 감 사

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업진흥원의 지역혁

신인력양성사업 및 김포시농업기술센터 연구과제로 수행된 결과이며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 11월 26일, 게재승인 : 2009년 12월 22일

## REFERENCES

1. Fantone, J. C. and P. A. Ward (1982) Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction. *Ann. J. Path.* 107: 395-418.
2. Davies, K. J. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radical. *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9901.
3. Foote, C. S. (1976) *Photosensitized Oxidation and Singlet Oxygen: Consequenc Es in Biological Systems*. Ed. W. A. Pryor. 2, 85, Academic Press, New York.
4. Park, S. N. (1997) Skin aging and antioxidant. *J. Soc. Cosmet. Sci.* 23: 75-132.
5. Park, S. N. (2003) Protective effect of isoflavone, genistein from soybeen on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 510-518.
6. Park, S. N. (2003) Antioxidative properties of baicalain component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I). *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 14: 657-665.
7. Kim, E. C., S. Y. Ahn, E. S. Hong, G. H. Li, E. K. Kim, and K. H. Row (2005) Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect. *J. Korean. Ind. Eng. Chem.* 16: 348-353.
8. Aroca, P., K. Urabe, K. Kobayashi, K. Taskamoto, and V. J. Hearing (1993) Melanin biosynthesis patterns of following bormonal stimulation. *J. Biol. Chem.* 268: 25650-25655.
9. Furukawa, H. (1966) On the alkaloids of *Nelumbo nucifera* Gaertn, alkaloids of loti embryo. *Yakugaku Zasshi.* 86: 75-77.
10. Cho, E. J., T. Yokozawa, D. Y. Rhyu, S. C. Kim, N. Shibahara, and J. C. Park (2003) Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine* 10: 544-551.
11. Kashiwada, Y., A. Aoshima, Y. Ikeshiro, Y. P. Chen, H. Furukawa, M. Itoigawa, T. Fujioka, K. Mihashi, L. M. Cosentino, S. L. Morris-Natschke, and K. H. Lee (2005) Anti-HIV benzyloquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera* and structure-activity correlations with related alkaloids. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 443-448.
12. Kim, M. J., K. P. Lim, T. K. Jung, and K. S. Yoon

- (2007) Anti-aging effects of *Astragalus membranaceus* root extract. *J. Soc. Cosmet. Sci.* 33: 33-40.
13. Iozumi, K., G. E. Hoganson, R. Pemella, M. A. Everett, and B. B. Fuller (1993) Role of tyrosinase as the dererminant of pigmentation in culcured human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 100: 806-811.
  14. Folin, A. D. and W. Denis (1915) A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.* 22: 305-308.
  15. Jimenez-Cervantes, C., F. solano, T. Hobayashi, K. Urabe, V. J. Hearing, J. Lozano, and C. Garcia-Borron (1994) Anew enzymatic function in the melanogenic pathway. *J. Biol. Chem.* 269: 17993-18001.
  16. Park, B. H., H. S. Cho, E. R. Jeon, S. D. Kim, and K. M. Koh (2009) Original Articles: Quality characteristics of doybean curd prepared with lotus leaf powder. *Korean J. Food Culture* 24: 315-320.
  17. Heo, J. C., J. Y. Park, S. M. An, J. M. Lee, C. Y. Yun, H. M. Shin, T. K. Kwon, and S. H. Lee (2006) Anti-oxidant and anti-tumor activities of crude extracts by *gastrodia elata* blume. *Korean. J. Food Preserv.* 13: 83-87.
  18. Jeong, M. J., G. S. Lee, and H. J. Chae (2004) *In vitro* biological activity assay of ethanol extract of radish. *Korean J. Soc.* 47: 67-71.
  19. Park, S. H., K. H. Chang, G. I. Byun, and W. W. Kang (2009) Quality characteristics of bread made with flour partly substituted by lotus Leaf fowder. *Korean. J. Food Preserv.* 16: 47-52.
  20. Shin, Y. J. (2007) Quality characteristics of fish paste containing lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf powder. *Korean. J. Food Cookery Sci.* 23: 947-953.
  21. Lee, E. H. and S. M. Kang (2009) Effects of diet food containing jerusalem artichoke's Inulin, lotus leaf, and herb on weight and body fat of obesity university students. *J. Appl, Biol. Chem.* 52: 8-14.
  22. Kim, S. B., S. B. Rho, D. Y. Rhyu, and D. W. Kim (2005) Effect of *Nelumbo nucifera* leaves on hyperlipidemic and atherosclerotic bio F1B hamster. *Korean. J. Pharmacogn.* 36: 229-234.
  23. Chang, M. S., H. M. Kim, W. M. Yang, D. R. Kim, E. H. Park, E. B. Ko, M. J. Choi, H. Y. Kim, J. H. Oh, K. J. Shim, J. W. Yoon, and S. K. Park (2007) Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* on tyrosinase activity and melanogenesis in clone M-3 melanocyte cells. *Korean J. Herbology.* 22: 87-94.
  24. Cuvelier, M. E., H. Richahae, and C. Berset (1996) Antioxidative activity of phenolic composition of pilot plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 73: 645-652.