

## 밤 과육, 껍질 및 밤나무 잎 추출물에 대한 항산화 및 항염증 활성 비교

김진윤\* · 김승연\*\* · 권형민\*\* · 김찬현\*\* · 이승진\* · 박승춘\* · 김경화\*\*\*\*

\*경북대학교 수의과대학, \*\*(재) 대구테크노파크, \*\*\*수성대학교 피부건강관리과, \*\*\*\*(주) 모낭

## Comparison of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity on Chestnut, Chestnut Shell and Leaves of *Castanea crenata* Extracts

Jin Yoon Kim\*, Seung Yeon Kim\*\*, Hyoung Min Kwon\*\*, Chan Hyun Kim\*\*, Seung Jin Lee\*,  
Seung Chun Park\* and Kyung Hwa Kim\*\*\*\*

\*Laboratory of Veterinary PK and PD, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University,  
Daegu 702-701, Korea.

\*\*Daegu Technopark, Daegu 706-808, Korea.

\*\*\*Department of Skin and health Care, Susung University, Daegu 706-808, Korea.

\*\*\*\*Monang Int., Daegu 706-808, Korea.

**ABSTRACT:** The present study was carried out to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of three extracts (hot water, 50% ethanol and mixed solvent; water, ethanol, butylene glycol, propylene glycol) of dried chestnut, chestnut shell, chestnut leaves and dried chestnut leaves obtained from *Castanea crenata* tree. When conducted DPPH assay, radical scavenging activity of ethanol extract of chestnut shell was the highest with IC<sub>50</sub> 10.8 µg/mL among four extracts from these parts ( $p < 0.05$ ). In additional results by the xanthine oxidase assay, antioxidant activity showed that water extract of chestnut leaves showed the highest xanthine oxidase inhibitory activity in the tested extracts ( $p < 0.05$ ). Furthermore, extracts of chestnut shell and leaves exhibited no cytotoxicity in RAW 264.7 cells ( $p < 0.05$ ). Also, anti-inflammatory activity by NO assay showed LPS-induced NO was significantly inhibited following treatment with extracts of chestnut shell and leaves of 3 mg/mL ( $p < 0.05$ ). These data suggest that extract of chestnut shell have antioxidant and anti-inflammatory activity including chestnut leaves. Therefore, it is considered that *Castanea crenata* research range and selection of functional material can broaden chestnut shell to other fractions such as chestnut and chestnut leaves.

**Key Words :** Antioxidant, Anti-Inflammatory, *Castanea crenata*, Xanthine Oxidase, Nitric Oxide

### 서 언

밤나무는 참나무과 (Fagaceae) 낙엽교목으로 아시아, 유럽, 북아메리카, 북부아프리카 등지의 온대지역에 13종이 있으며, 그 중 과실생산을 위해 일본밤/한국밤 (*Castanea crenata*) 등이 국내에서 재배되고 있다. 국내 밤 생산량은 1980년 4만톤, 1990년 8만톤, 1997년에는 12만톤으로 증가하다가 밤나무 재배면적의 감소, 밤나무림의 노령화, 수확인력 부족 등으로 2002년에 6만톤으로 감소한 이후, 현재 생산량은 소폭 상승

이다 (Kim *et al.*, 2007).

밤의 이화학적 성분은 수분 65.3%, 조단백질 6.6%, 조지방 0.9%, 조섬유 2.3%, 조회분 1.7% 내로 구성되어 있으며 (Nha and Yang, 1996), 그 외 성분으로, 밤의 과육 부분에서 ferulic acid과 caffeic acid, sinapic acid, *p*-coumaric acid, salicylic acid (Yoon, 1991), 밤의 내피 부분에서 11.0~12.3%의 축합형 탄닌이 보고되어 있다 (Cho, 1993).

밤은 영양이 풍부하여 예로부터 대량식량 및 기호식품으로 널리 이용되고 있으며, 현재 소비 형태는 생과용이 55%, 가공

†Corresponding author: (Phone) +82-53-216-7900 (E-mail) queenka209@hanmail.net

Received 2013 December 18 / 1st Revised 2013 December 26 / 2nd Revised 2014 January 8 / 3rd Revised 2014 January 11 / Accepted 2014 January 11

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

용이 45% 정도 차지한다. 그러나 깎밤이나 밤 통조림으로 가공시 발생하는 대부분의 밤 껍질 (올피)은 특별한 활용없이 대부분 폐기되고 있는 실정이다. 최근 자원순환의 일환으로 부산물 활용에 관심이 높아지면서, 밤의 주요 부산물인 올피에 관하여 물리적 또는 화학적 접근을 통한 소재연구가 활발히 진행 중에 있다. 기능성 소재 연구에 따르면, 올피는 흡착능을 이용하여 폐수의 중금속 생물흡착제 소재로 사용이 가능하며 (Lee *et al.*, 2012), 미백 활성 및 주름개선 효과를 이용한 화장품 소재로의 활용도 가능하다고 보고된 바 있다 (Jang *et al.*, 2011). 또한, 밤나무에 관한 약리활성연구로, 울과 올피의 추출물의 항균 효과 (Cha *et al.*, 1998), 항산화 활성 (Rim *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2001), 항혈전 효과 (Yook *et al.*, 2002), 피부 노화 방지 (Yagi *et al.*, 1986) 등이 보고되고 있다.

그러나 대부분의 연구가 기능성 연구 전 선행되어야 할 기초 연구가 미흡하고, 기초연구는 대부분 항산화 활성에 초점이 맞춰진 형태이다. 또한 일부 제한된 부위에 대해서만 연구가 보고되어 있어, 밤나무의 다양한 부위 중 적합한 기능성 소재를 선택하기 위한 비교분석이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 부산물을 포함한 건조 과육 (건울), 올피, 올엽, 건조 올엽 (건올엽)과 3 종류의 추출용매를 이용한 추출물간의 항산화 및 항염증 활성을 비교하였다. 추가적으로 소재의 활용을 위하여 추출물의 세포 독성효과를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 추출

본 연구에서 사용한 건울과 올피, 올엽, 건올엽은 보민영농조합법인 (영천)에서 제공받아서 시험에 이용하였다. 각각 3가지의 방법으로 추출하였으며, 재료와 용매의 비율은 Table 1 과 같다. 추출 방법은 물과 50% 에탄올을 추출용매로 사용하여 100°C에서 2시간동안 추출하였다. 그리고 혼합용매로 물 : 에탄올 : 부틸렌글리콜 : 프로필렌글리콜 (4 : 4 : 1 : 1)을 water bath (Shaking Water Bath MSB-1511D, MonoTech Eng Co., Daegu, Korea)에서 70°C의 물로 중탕하여 8시간 추출하였다. 여과지 (whatman No.2)를 사용하여 추출물을 여과한 후 회전진공농축기 (Rotavapor R-114, BUCHI, Flawil, Switzerland)로 농축하였다. 그 후, 농축된 샘플을 1.7 mL E-tube에 500 µL씩 나눠담고 원심진공농축기 (Cold Vac 50/Modulspin 31, Bucheon, Korea)로 완전 농축을 하였다. 농축된 시료의 무게를 잰 후, 실험에 사용할 5가지 농도 (30, 100, 300, 1000, 3000 µg/mL)를 각 실험에 맞는 용매로 희석하여 준비하였다. 혼합용매추출물의 경우, 완전 건조가 어려웠으므로 1시간 농축 후, 이를 100%로 하여 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3%로 설정하여 시험에 이용하였다.

**Table 1.** Extract rate of various parts of *C. crenata* and solvent.

Part	Solvent**	Rate*
Dried chestnut	Distilled water	1 : 5
	50% ethanol	1 : 5
	Mixed solvent	2 : 5
Chestnut shell	Distilled water	1 : 10
	50% ethanol	1 : 10
	Mixed solvent	2 : 5
Chestnut leaves	Distilled water	1 : 20
	50% ethanol	1 : 20
	Mixed solvent	1 : 20
Dried chestnut leaves	Distilled water	1 : 20
	50% ethanol	1 : 20
	Mixed solvent	1 : 20

\**C. crenata* sample (g): Solvent (mL).

\*\*Used as solvent for *C. crenata* extraction, 50% ethanol; DW (Distilled water) and ethanol (1 : 1), Mixed solvent; DW, ethanol, butylene glycol and propylene glycol (4 : 4 : 1 : 1).

### 2. DPPH radical 소거능 측정

건울과 올피, 올엽, 건올엽추출물의 DPPH radical 소거능을 측정하였다. 4가지 부위의 각각 3가지 추출용매 10 µL을 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, 100 µM)의 200 µL를 더하여 96 well plate에 첨가 후 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 흡광도 측정은 VERSA max microplate reader (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 517 nm에서 측정하였다. 시료의 DPPH radical 소거능 평가는 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH radical 소거능 (\%)} = [(Ab - Aa) / Aa] \times 100$$

Ab: 무처리구의 흡광도

Aa: 시료첨가구의 흡광도

### 3. Xanthine Oxidase 활성 저해능 평가

건울과 올피, 올엽, 건올엽 추출물의 항산화 효과를 측정하기 위해 xanthine oxidase 저해 활성을 측정하였으며, Saghal (2009)와 Lee 등 (2009)의 방법을 변형하여 실시하였다. 큐벳에 10 mM의 PBS 1,760 µL와 0.175 mg/mL로 녹인 xanthine (Sigma, St Louis, MO, USA) 용액 100 µL를 첨가하고, 희석한 시료 100 µL와 10 mM PBS에 녹인 0.15 unit/mL의 xanthine oxidase (Sigma, St Louis, MO, USA) 40 µL를 첨가하여 3분 동안 반응시킨 후 생성된 uric acid 양을 측정하기 위해 spectrophotometer (Kontron Instrument, Zurich, Switzerland)를 이용하여 295 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군은 시료 대신 PBS 100 µL를 첨가하였다. 양성 대조군으로 사용된 ascorbic acid는 빛의 노출을 최소화 하여 농도 별로 희석하여 사용하였

고, 추출물 처리군과 대조군의 흡광도 감소율은 아래와 같이 계산 하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \left[ \frac{\Delta \text{absorbance}(\text{control}) - \Delta \text{absorbance}(\text{sample})}{\Delta \text{absorbance}(\text{control})} \right] \times 100$$

#### 4. 세포 독성 평가

건울과 율피, 율엽, 건울엽추출물에 대한 세포독성을 알아보기 위해 Begona 등 (2002)의 방법을 변형하여 세포독성 시험을 하였다. 시험에 이용한 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포주 (KCLB No. 40071)는 한국세포주 은행에서 분양받았다. RAW 세포주는 각각 100 unit/mL-100 µg/mL의 penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma, St Louis, MO, USA)이 들어있는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma, St Louis, MO, USA)을 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 세포독성 시험시, RAW 세포주를 각 well당 1 × 10<sup>4</sup>개가 되도록 180 µL씩 96 well plate에 접종되었고, 배양 전에 농도 별로 희석된 시료를 20 µL씩 접종하였다. 접종 4일 후에 2 mg/mL로 희석된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma, St Louis, MO, USA)용액을 각 well당 50 µL씩 접종하여 4시간 동안 배양한 후, 염색된 세포가 떨어지지 않도록 배지를 제거하였다. 그 후 dimethylsulphoxide를 150 µL씩 가하여 formazan crystal을 녹여 microplate reader (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5. Nitric Oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

NO 측정은 cell의 상층액에서 NO의 양을 Griess reaction (Green *et al.*, 1982)에 기초해 측정하였다. RAW 264.7 cell을 1.5 × 10<sup>5</sup> cells/mL로 접종하고, 여러 농도로 희석한 시료로 전 처리한 후, 1시간 뒤에 lipopolysaccharide (LPS; Sigma, St Louis, MO, USA) 1 µg/mL을 처리하여 24시간 배양하였다. 96 well plate에 세포 배양 상층액 50 µL와 Griess 시약 1% (w/v) sulfanilamide 50 µL를 첨가한 다음 차광하여 10분 동안 실온에서 반응시킨 후, 2.5% (v/v) phosphoric acid에 녹인 0.1% (w/v) N-1-naphthylethylenediamine을 50 µL 혼합하여 10분 동안 차광하여 반응시키고, 30분 이내에 microplate reader (Molecular Device, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 생성량 산출은 nitric oxide standard solution을 이용하여 계산하였다.

#### 6. 통계처리

모든 측정은 3회 반복으로 얻어진 결과로 평균과 표준편차

로 나타내었으며, SAS package (Statistical Analysis Program, version 9.3)를 사용하여 ANOVA 분석 후에 유의성이 인정되면 사후검정으로 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)을 실시하고  $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

## 결과 및 고찰

농자원 기능성 소재의 다양성 확보차원에서 부산물에서 얻어지는 소재는 산업적으로 가격 경쟁력 뿐만 아니라 농가에게 부수적인 수입을 보장하는 중요한 가치이다. 따라서, 본 연구에서는 이러한 점에 착안하여, 부산물로 버려지는 율피과 율엽의 항산화 및 항염증 소재를 확보하고자 축적된 추출기법을 통해 추출물을 획득하고 일련의 실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

#### 1. DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical법은 항산화 활성을 평가하는 방법 중 하나로, DPPH의 환원정도를 기준으로 측정물질의 환원력과 항산화력을 측정한다 (Lee, 2003; Wang, 2003). 건울과, 율피, 율엽, 건울엽 등에 대한 용매별 추출물의 항산화 활성을 비교하기 위하여 DPPH radical에 대한 소거활성을 비교하였으며 양성 대조군으로 항산화 활성이 있는 ascorbic acid를 사용하였다 (Table 2). 추출용매별 DPPH radical 소거활성은 추출물 농도 의존적으로 증가하였으며 ( $p < 0.05$ ), 물추출물, 에탄올추출물, 혼합용매추출물 순으로 나타났다. 물추출물 및 에탄올추출물 (3 mg/mL)에서 72.3 ~ 97.4%의 소거활성이 나타난 반면, 혼합용매추출물에서는 율피 (82.3%)를 제외하고 전체적으로 낮은 소거활성 (27.7 ~ 67.9%)을 보였다. 물추출물과 에탄올추출물 기준으로 부위별 DPPH radical 소거 활성을 비교하였을 때, 율피추출물, 건울추출물, 율엽추출물, 건울엽추출물 순으로 활성이 높았으며, IC<sub>50</sub>은 각각 10.8 ~ 19.8, 48.7 ~ 52.5, 62.4 ~ 63.4, 180 ~ 183 µg/mL 수준이었다. 특히, 율피추출물의 경우, 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid (IC<sub>50</sub>, 23 µg/mL) 보다 낮은 수준으로 나타나, DPPH radical 소거능 활성 수준이 더 높은 것으로 확인되었다. Kim 등 (2007)이 보고한 인삼의 물추출물과 에탄올추출물 (10 mg/mL)의 DPPH radical 소거능 (46%)과 비교했을 때, 부위별 추출물의 DPPH radical 소거활성이 더 높은 것으로 확인되었다. 또한 주류, 음료 등 기능성 식품으로 많이 이용되고 있는 복분자의 미숙과 에탄올추출물 (IC<sub>50</sub>, 24.98 µg/mL) (Kwon *et al.*, 2011)과 비교하여 볼 때, 율피의 에탄올추출물의 IC<sub>50</sub>값은 50% 정도 낮은 수준으로 나타나 뛰어난 항산화제 소재로 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

밤 추출물에 대한 항산화 및 항염증 작용

**Table 2.** Effect of extracts from various parts of *C. crenata* on DPPH radical scavenging activity.

Solvent	Concentration (mg/mL)	DPPH radical scavenging activity (%)				
		Ascorbic acid (Control)	Dried chestnut	Chestnut shell	Chestnut leaves	Dried chestnut leaves
Distilled water	0.03	59.3 ± 3.7c	61.1 ± 3.4b	65.6 ± 4.6c	33.7 ± 5.3d	27.2 ± 5.3**e*
	0.1	89.2 ± 4.2b	61.4 ± 4.1b	75.1 ± 4.3b	62.2 ± 3.6c	37.5 ± 4.6d
	0.3	97.2 ± 2.1a	61.9 ± 2.1b	91.6 ± 7.5a	79.9 ± 3.5b	59.1 ± 2.7c
	1	97.4 ± 2.6a	64.6 ± 4.5b	97.7 ± 3.1a	94.1 ± 2.6a	73.7 ± 4.3b
	3	97.4 ± 1.1a	72.2 ± 5.3a	97.4 ± 3.5a	96.1 ± 3.2a	93.7 ± 3.8a
50% ethanol	0.03		61.6 ± 2.4c	71.9 ± 3.9b	36.3 ± 4.6d	25.4 ± 3.7d
	0.1		60.7 ± 4.1c	92.8 ± 5.3a	58.3 ± 5.2c	27.5 ± 6.5d
	0.3		63.2 ± 3.6bc	98.2 ± 5.7a	81 ± 4.8b	65.9 ± 4.3c
	1		69.8 ± 6.4b	98.1 ± 3.4a	92.8 ± 6.3a	81.4 ± 5.1b
	3		82.5 ± 1.3a	98.2 ± 1.6a	99.1 ± 2.1a	95.9 ± 2.2a
Mixed solvent	0.03		18.4 ± 5.1b	18.9 ± 6.7d	7.9 ± 3.6c	8.1 ± 5.6c
	0.1		14.0 ± 4.3b	23.1 ± 2.5d	9.5 ± 6.2c	7.8 ± 7.5c
	0.3		13.2 ± 2.7b	45.8 ± 5.6c	17.1 ± 4.9c	16 ± 4.1bc
	1		13.1 ± 6.1b	63.5 ± 2.4b	39.3 ± 2.1b	25.8 ± 6.4b
	3		27.7 ± 5.6a	82.3 ± 3.9a	67.9 ± 7.5a	51.5 ± 4.8a

\*Mean with difference letter within a column are significantly different by the DMRT ( $p < 0.05$ ).

\*\*Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown.

**Table 3.** Effect of extracts from various parts of *C. crenata* on xanthine oxidase activity.

Solvent	Concentration (mg/mL)	Xanthine oxidase activity (%)				
		Ascorbic acid (control)	Dried chestnut	Chestnut shell	Chestnut leaves	Dried chestnut leaves
Distilled water	0.03	21.3 ± 2.9e	30.1 ± 4.5a	38.8 ± 2.5d	36.9 ± 5.0c	24.3 ± 1.8**b*
	0.1	27.6 ± 3.1d	30.5 ± 3.4a	38.9 ± 2.1cd	43.7 ± 4.2b	25.1 ± 2.1b
	0.3	51.6 ± 2.4c	31.5 ± 3.3a	45.8 ± 4.8bc	47.4 ± 3.3b	41.5 ± 3.5a
	1	86.8 ± 1.9b	31.5 ± 2.9a	48.8 ± 2.9ab	58.0 ± 1.8a	42.3 ± 2.9a
	3	95.5 ± 2.7a	36.1 ± 4.1a	52.7 ± 4.7a	58.7 ± 2.6a	42.8 ± 3.4a
50% ethanol	0.03		22.8 ± 2.7c	33.9 ± 3.9d	11.6 ± 3.9c	20.1 ± 2.7d
	0.1		25.3 ± 3.0c	43.6 ± 4.0c	17.1 ± 4.2c	30.9 ± 4.0c
	0.3		31.6 ± 1.8b	49.1 ± 3.7bc	35.3 ± 2.4b	39.4 ± 3.6b
	1		34.9 ± 4.3b	51.0 ± 2.0ab	38.4 ± 3.4b	44.8 ± 1.9b
	3		43.2 ± 2.5a	56.1 ± 1.9a	84.3 ± 3.0a	54.3 ± 3.6a
Mixed solvent	0.03		4.0 ± 2.4b	8.9 ± 2.8c	14.6 ± 2.7c	18.8 ± 4.3b
	0.1		5.8 ± 3.9b	12.8 ± 4.2bc	23.3 ± 5.1b	20.6 ± 2.8b
	0.3		7.1 ± 4.1ab	11.1 ± 3.7bc	32.7 ± 3.9a	21.1 ± 3.3b
	1		10.3 ± 2.1ab	16.6 ± 5.1ab	36.2 ± 1.6a	33.4 ± 5.1a
	3		13.4 ± 3.6a	31.3 ± 2.3a	40.0 ± 5.3a	39.6 ± 3.9a

\*Mean with difference letter within a column are significantly different by the DMRT ( $p < 0.05$ ).

\*\*Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown.

**Table 4.** IC<sub>50</sub> of various parts of *C. crenata* on DPPH radical scavenging activity and xanthine oxidase activity.

Part	Solvent	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	
		DPPH radical scavenging activity	Xanthine oxidase activity
	Ascorbic acid	23 ± 0.54	226 ± 6.42*
Dried chestnut	Distilled water	52.5 ± 0.36	2660 ± 50.9
	50% ethanol	48.7 ± 1.24	2070 ± 3.1
	Mixed solvent	6740 ± 5.5	15430 ± 7.5
Chestnut shell	Distilled water	19.8 ± 0.14	590 ± 1.3
	50% ethanol	10.8 ± 0.07	492 ± 1.4
	Mixed solvent	407 ± 5.64	5660 ± 7.2
Chestnut leaves	Distilled water	62.4 ± 1.25	339 ± 2.4
	50% ethanol	63.4 ± 5.36	855 ± 1.8
	Mixed solvent	1440 ± 3.2	2220 ± 3.2
Dried chestnut leaves	Distilled water	183 ± 1.6	1440 ± 2.9
	50% ethanol	180 ± 3.8	990 ± 1.1
	Mixed solvent	2630 ± 4.8	2750 ± 3.7

\*Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown.

### 2. Xanthine Oxidase 활성 저해능 평가

항산화 활성을 측정하기 하기 위해 추가적으로 xanthine oxidase을 활성 저해능을 평가하였다 (Cho *et al.*, 1993). Table 3과 같이, 견을과 율피, 율엽, 견율엽추출물은 농도의존적으로 xanthine oxidase 활성을 억제하였으며 DPPH radical 소거능 결과와 유사한 경향을 보였다 ( $p < 0.05$ ). 물추출물과 에탄올추출물 기준으로 부위별 xanthine oxidase 억제 활성을 비교하였을 때, 율피추출물, 율엽추출물에서 억제 활성이 높았으며, IC<sub>50</sub> 값은 각각 590과 492, 339와 855 μg/mL 수준이었다. 특히, 율엽의 물추출물의 경우, 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid (IC<sub>50</sub>, 236 μg/mL)과 유사한 수준으로 나타났으며, 이는 구실잣밤나무잎 (*Castanopsis cuspidata*)의 물추출물과 에탄올추출물의 IC<sub>50</sub>값이 1000 μg/mL 이상, 371.31 μg/mL인 것과 비교시, 각각 유사하거나 더 높은 억제 수준이었다 (Kim *et al.*, 2011). xanthine oxidase가 산화적 스트레스를 유발하는 키 효소임을 감안한다면, 율피추출물 뿐만 아니라 율엽추출물 또한 뛰어난 항산화 소재로 이용이 가능할 것으로 판단된다.

### 3. 세포 독성 평가

견을과 율피, 율엽, 견율엽추출물의 정상세포 보호 및 독성의 정도를 확인하기 위해 murine macrophage인 RAW 264.7 세포주 모델을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다 (Fig. 1). 견을과 율피, 율엽, 견율엽의 물추출물 투여군은 세포 독성이 있는 LPS 투여군 (양성대조군)에 비해 세포생존율이 유의적으로 증가하였으며, 견을을 제외한 나머지 물추출물 0.1 ~ 10 mg/mL의 농도 투여시 무처리군 (음성대조군)의 세포

생존율과 동일하게 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 또한, 견을의 에탄올 추출물에서도 동일한 결과를 확인하였으나, 율엽과 율피의 에탄올추출물의 경우 각각 1 ~ 3, 3 ~ 10 mg/mL 농도에서만 세포 생존율이 90% 이상으로 나타났다. 반면, 혼합용매추출물은 다른 용매의 추출물과 비교했을 때, 낮은 세포 생존율을 보였으며 이는 혼합용매추출물 내 부틸렌글리콜과 프로필렌글리콜 자체에 의한 세포독성 효과로 판단된다.

### 4. Nitric Oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

NO는 혈액 응고, 혈압조절 및 암세포 억제 등의 기능이 있으나, 과량 존재하게 되면 인체에 유해한 영향을 미치게 되어 세포의 손상뿐 아니라 염증을 야기하기도 한다 (Lowenstein *et al.*, 1994; Bak *et al.*, 2011). 본 연구에서 항염증 활성능을 비교하기 위하여 NO 유도물질인 LPS 처리 후 견을, 율피 그리고 율엽추출물을 농도별 (0.03 ~ 3 mg/mL)로 처리하여 LPS에 의한 NO 생성 억제량을 측정하였다 (Fig. 2). 모든 부위에서 얻어진 각각의 모든 추출물은 LPS에 의한 NO 생성을 유의수준으로 억제하였다 ( $p < 0.05$ ). 물추출물에서 견을과 율피는 최고 농도 (3 mg/mL)에서 43, 83%로 높은 수준으로 나타난 것에 비해, 율엽의 경우, 농도의존적 감소가 뚜렷하였고 3 mg/mL에서 89%의 높은 억제를 나타내었다. 에탄올추출물 최고농도에서 견을이 92%로 억제 수준이 가장 높았으며, 율피가 83%, 율엽과 견율엽은 44 ~ 74%로 비교적 높은 억제수준을 나타냈다. 반면, 혼합추출물에서도 NO 억제 수준이 평균 50%으로 비교적 높은 수준으로 관찰되었는데, 이는 각 부위별 추출물의 고유활성 작용에 의한 것보다 세포독성에 의한 위양성 효과로 판단된다. 추출물은 추출용매와 추출물의 농도

밤 추출물에 대한 항산화 및 항염증 작용

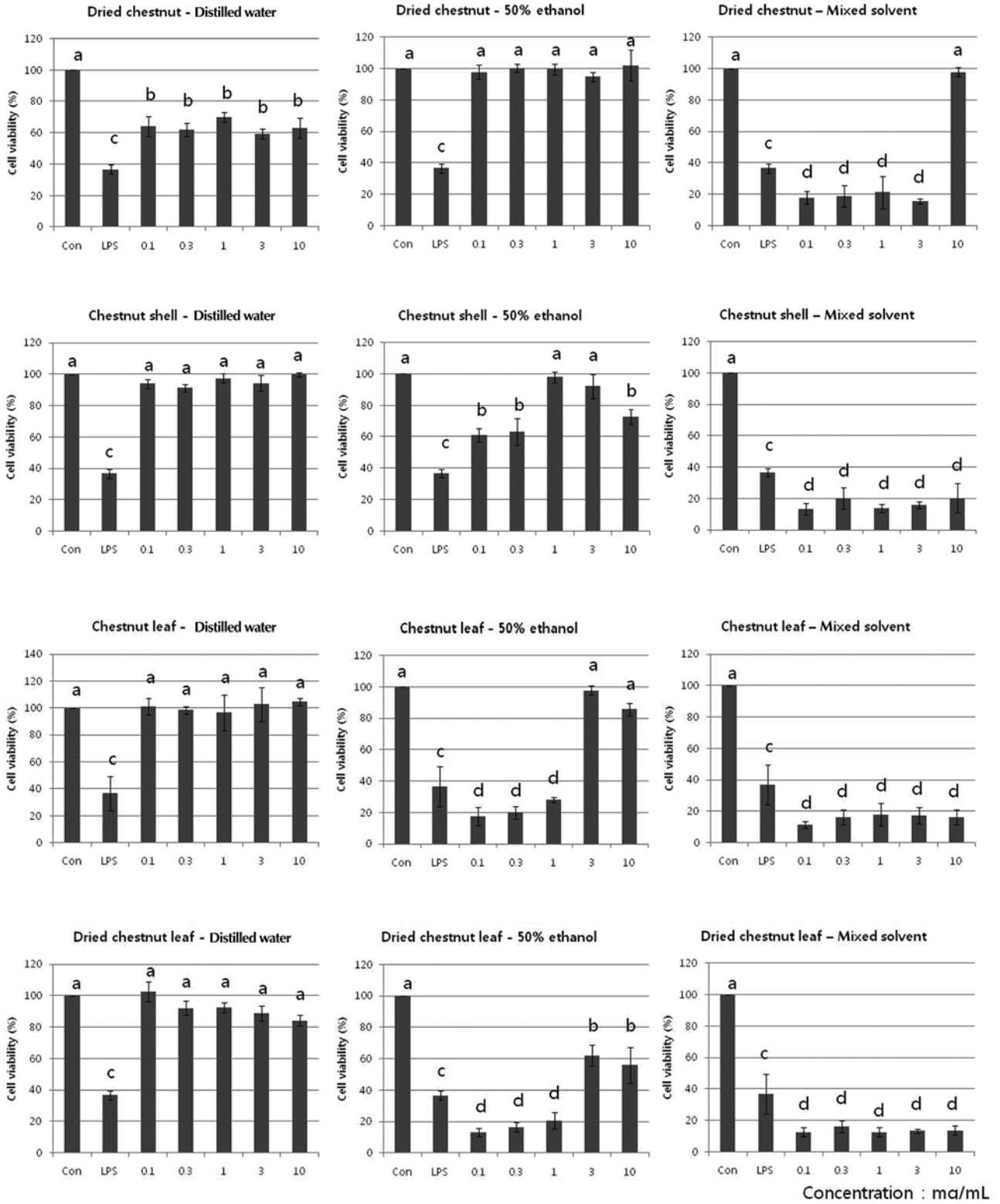


Fig. 1. Effect of extracts from various parts of *C. crenata* on MTT assay. Data were expressed as the means  $\pm$  SD from three independent experiments. Mean with difference letter (a-d) within a column are significantly different by the DMRT ( $p < 0.05$ ).

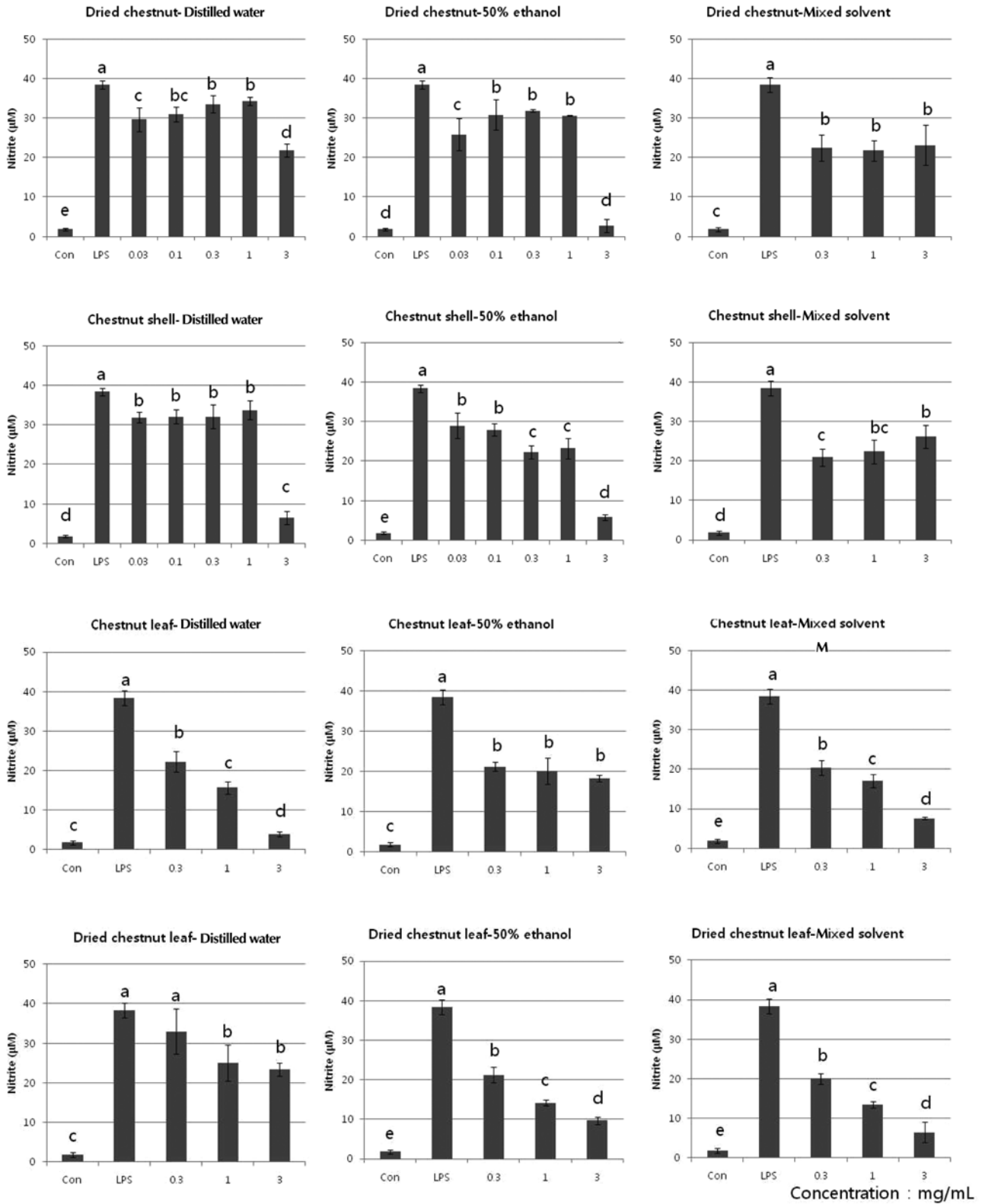


Fig. 2. Effect of extracts from various parts of *C. crenata* on nitric oxide assay. Data were expressed as the means  $\pm$  SD from three independent experiments. Mean with difference letter (a-d) within a column are significantly different by the DMRT ( $p < 0.05$ ).

에 따라 항산화, 항염증 특성이 다양하게 나타난다 (Kim *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2010). 본 연구를 통해, 율피의 물추출물과 에탄올추출물 및 율엽의 물추출물에서 항산화, 항염증의 활성이 높은 것으로 확인되었다. 이는 기존에 율피를 이용한 생리 활성 연구결과와 일치하며 (Rim *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2001), 더욱이 건율 및 율엽추출물 또한 항산화 및 항염증 활성을 연구한 것으로 기존에 율피에만 집중되어 있던 기능성 연구의 범위를 넘어서 건율 및 폐기 부산물인 율엽까지 확장이 가능할 것으로 생각된다. 또한, 밤나무의 부위별 및 추출용매별로 다양한 수준의 활성이 나타나고 있으므로 기능성 소재개발을 위한 적절한 부위 및 추출용매선택, 최적용량 설정시 추가 응용이 가능할 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서는 기능성 소재를 확보하고자 건율과 율피, 율엽, 건율엽의 용매별 (물, 50% 에탄올, 혼합용매) 추출물에 대한 생리활성 시험을 실시한 결과, 항산화 및 항염증 활성을 확인하였다. 이중, 율피와 율엽 물추출물은 세포독성이 낮고 항산화 활성과 NO 생성 억제 활성이 높은 수준으로 확인되어 기능성 소재 후보로 이용이 가능하며, 향후 추가적인 연구를 통해 항산화 및 항염증 영역에서 산업적 응용이 가능할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 논문은 중소기업청 창업성장 기술개발사업(과제번호: S2013155) 및 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJPJ009007)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Bak JP, Son JH, Kim YM, Jung JH, Leem KH, Lee EY and Kim EH. (2011). Suppression of the inflammatory response in macrophages by Paeoniae Radix Rubra. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:373-379.
- Begona CA, Laszlo G.B, Silvia M, Joan B, Carles CM, Josep JC, Josep LT, Neus A, Sara B and Marta C. (2002). Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly(ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T cell leukemia tumor cells. Journal of Biological Chemistry. 277:46408-46414.
- Cha BC, Lee HW and Choi MY. (1998). Antioxidative and antimicrobial effect of nut species. Korean Journal of Pharmacognosy. 29:28-34.
- Cho YJ, Chun SS and Choi C. (1993). Inhibitory effect of condensed tannins isolated from Korean green tea against xanthine oxidase. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 22:418-422.
- Denizot F and Rita L. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. Journal of Immunological Methods. 89:271-277.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS and Tannenbaum SR. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Analytical Biochemistry. 126:131-138.
- Jang MJ, Cheon SJ, Kim HY, Kwoen DJ, Kim HY, Kim SH and Lee JT. (2011). The anti-wrinkle and whitening effect of extracts of *Castanea crenata* inner shell. Journal of Life Science. 21:734-738.
- Kim JS, Joo RW, Kim CS, Choi SI, Kim KD, Kang HM, Choi JW, Lee SY, Ji DH, Kim SS, Oh CJ, Oh DS, Kim DO and Park JH. (2007). Income analysis of chestnut and pyogo 2006. Korea Forest Research Institute. Seoul, Korea. p.14.
- Kim JY, Yoon WJ, Yim EY, Park SY, Kim YJ and Song GP. (2011). Antioxidative and antimicrobial activities of *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* extracts. Korean Journal of Plant Resources. 24:200-207.
- Kim MO, Kim JS, Sa YJ, Jeong HJ, Chun WJ, Kwon YS, Kim TY, Choi HS, Yu CY and Kim MJ. (2010). Screening extraction solvent condition of fermented *Rhus verniciflua* stem bark by antioxidant activities. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 18:217-223.
- Kim YC, Cho CW, Rhee YK, Yoo KM and Rho JH. (2007). Antioxidant activity of ginseng extracts prepared by enzyme and heat treatment. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 36:1482-1485.
- Kwon EJ, Kim YC, Kwon MS, Kim CS, Kang WW, Lee JB and Chung SK. (2001). Antioxidative activity of solvent fraction and isolation of antioxidative compound from chestnut husk. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 30:726-731.
- Kwon JW, Lee HK, Park HJ, Kwon TO, Choi HR and Song JY. (2011). Screening of biological activities to different ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:325-333.
- Nha YA and Yang CH. (1996). Changes of constituent components in chestnut during storage. Korean Journal of Food Science and Technology. 28:1164-1170.
- Lee HJ. (2003). DPPH radical scavenging effect and in vitro lipid peroxidation inhibition by *Portulaca oleracea*. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering. 18:165-169.
- Lee HY, Lim JE, Lee SS and O YS. (2012). Lead bioabsorption by chestnut shell and oak sawdust in aqueous solution using thermodynamic equilibrium model. Journal of the Environment. 9:15-26.
- Lee YS, Ahn DS, Joo EY and Kim NW. (2009). Antioxidative activities of *Syneilesis palmata* extracts. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 38:1471-1477.
- Lowenstrein CJ, Dinerman JL and Snyder SH. (1994). Nitric oxide: A physiologic messenger. Annals of Internal Medicine. 120:227-237.
- Rhim TJ and Lim SC. (2005). The hepatotprotective and antioxidative effects of onion(*Allium cepa*) extracts in rat hepatocyte primary culture. Korean Journal of Plant Resources. 18:52-60.
- Rim YS, Park YM, Park MS, Kim KY, Kim MJ and Choi YH. (2000). Screening of antioxidants and antimicrobial



- activity in native plants. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 8:342-350.
- Saghal G, Ramanathan S, Sasidharan S, Mordi MN, Ismail S and Mansor SM.** (2009). In vitro antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of methanolic *Swietenia mahagoni* seed extracts. Molecules. 14:4476-4485.
- Wang LF.** (2003). A theoretical investigation on DPPH radical-Scavenging mechanism of edaravone. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 13:3789-3792.
- Yagi A, Kanbara T and Morinobu N.** (1986). The effect of tyrosinase inhibition for Aloe. Planta Medica. 3981:517-519.
- Yook GJ, Lee HJ and Kim MK.** (2002). Effect of chestnut and acone on lipid metabolism, antioxidative capacity and antithrombotic capacity in rats. Korean Journal of Nutrition. 35:171-182.
- Yoon KY.** (1991). Polyphenol compounds and biochemical characteristics of polyphenol oxidase in chinese chestnut. Kyungpook National University Graduate School. 9:51-59.
- Yoon TS, Cheon MS, Kim SJ, Lee AY, Moon BC, Chun JM, Choo BK and Kim HK.** (2010). Evalutaion of solvent extraction on the anti-inflammatory efficacy of *Glycyrrhiza uralensis*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 18:28-33.