



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원 저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리와 책임은 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



2017년 2월
석사학위 논문

2017년
2월
산업대학원석사

골드키위 (Actinidia chinensis) 껍질 추출물의 항산화 및 미백기능성 분석
김복희 (Kim Bok-hee)

골드키위 껍질 추출물의 항산화 및 미백기능성 분석

조선대학교 산업기술융합대학원

미용향장학과

김 복 희

2017년 2월
석사학위 논문

골드키위 껍질 추출물의 항산화
및 미백기능성 분석

조선대학교 산업기술융합대학원

미용향장학과

김복희

골드키위 껍질 추출물의 항산화 및 미백기능성 분석

The analysis of whitening functional and
anti-oxidative activities of *Actinidia
chinensis* flesh extract.

조선대학교 산업기술융합대학원

미용향장학과

김복희

골드키위 껍질 추출물의 항산화 및 미백기능성 분석

지도교수 이중현

이 논문을 미용향장학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2016년 10월

조선대학교 산업기술융합대학원

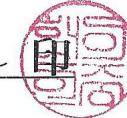
미용향장학과

김복희

김복희의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 金在成 

위원 조선대학교 교수 류은미 

위원 조선대학교 교수 이중현 

2016년 11월

조선대학교 산업기술융합대학원

목 차

List of Figures	iii
List of Abbreviations	iv
Abstract	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
II-1. 재료 및 시약	6
II-2. 분석기기	7
II-3. 세포배양	7
II-4. 추출물제조	7
II-5. 세포독성	7
II-6. 아질산염 소거능	8
II-7. 항산화 활성 측정	8
II-7-a. 전자공여능 확인	8
II-7-b. 총 폴리페놀 함량 측정	9
II-7-c. 총 플라보노이드 함량 측정	10
II-7-d. 유사 SOD 활성 측정	10

II-8. 미백기능성 분석	11
II-8-a. 세포배양	11
II-8-b. Tyrosinase 저해활성 측정	11
II-8-c. Melanin 생합성 저해율 측정	11
III. 결과 및 고찰	12
III-1. 세포독성	12
III-2. 아질산염 소거능	14
III-3. 항산화 활성 측정	16
III-3-a. 전자공여능 확인	16
III-3-b. 총 폴리페놀 함량 측정	18
III-3-c. 총 플라보노이드 함량 측정	20
III-3-d. 유사 SOD 활성 측정	22
III-4. 미백기능성 분석	24
III-4-a. 세포독성	24
III-4-b. Tyrosinase 저해활성 측정	26
III-4-c. Melanin 생합성 저해율 측정	28
IV. 요약 및 제언	30
V. 참고문헌	32

LIST OF FIGURES

Fig. 1. The pathophysiological effects of free radical oxidative stress.	4
Fig. 2. Explanation of <i>A. chinensis</i>	5
Fig. 3. Cytotoxicity of <i>A. chinensis</i> flesh extracts on Raw 264.7 cells.	13
Fig. 4. Effects of <i>A. chinensis</i> flesh extracts on NO production in LPS stimulated Raw 264.7 cells.	15
Fig. 5. Electron donating ability from <i>A. chinensis</i> flesh extracts.	17
Fig. 6. Total phenolic contents of <i>A. chinensis</i> flesh extracts.	19
Fig. 7. The flavonoid contents of <i>A. chinensis</i> flesh extracts.	21
Fig. 8. Superoxide dismutase - like activity of <i>A. chinensis</i> flesh extracts.	23
Fig. 9. Cytotoxicity of <i>A. chinensis</i> flesh extracts on B16F10.	25
Fig. 10. Effect of <i>A. chinensis</i> flesh extracts on cellular tyrosinase activity of B16F10 melanoma cells.	27
Fig. 11. Inhibitory effect of <i>A. chinensis</i> flesh extracts on melaninogenesis of cultured B16F10 melanoma cells.	29

List of Abbreviations

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical	DPPH
Dulbecco's modified eagle's medium	DMEM
Fetal bovine serum	FBS
Penicillin streptomycine	P/S
Dulbecco's phosphate-buffered saline	DPBS
Phosphate-buffered saline	PBS
Lipopolysaccharide	LPS
Dimethyl sulfoxide	DMSO
(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)	MTT
Nitric oxide	NO
Reactive oxygen species	ROS
Butylated hydroxy toluen	BHT
Butylated hydroxy anisole	BHA
Superoxide dismutase	SOD
Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA
Tumor necrosis factor alpha	TNF- α
Interleukin	IL
Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	NF- κ B

Inducible nitric oxide synthase

iNOS

Cyclooxygenase-2

COX-2

Prostaglandi E₂

PGE₂

- v -

ABSTRACT

The analysis of whitening functional and anti-oxidative activities of *Actinidia chinensis* flesh extract.

Bok-Hee, Kim

Advisor : Prof. Jung-Heon, Lee Ph.D.

Department of Beauty Cosmetic Industrial
Technology Convergence Graduate School
of Chosun University

In modern society, the average lifespan of mankind has been lengthened due to the development of medical technology, and efforts are being made to improve the quality of life in order to maintain a healthy life. Accordingly, research on anti-aging has emerged as an issues due to the increased interest in appearance and inhibition of aging.

Skin aging is divided into intrinsic aging, which can occur with age for a long time without any special environmental factors, and photoaging caused by long-term exposure to environmental factors such as sunlight. The main cause of intrinsic aging is the accumulation of damage to the constituents of our body due to the reactive oxygen radicals produced in the metabolism of our body. If these are not effectively removed, a series of inflammatory reactions will occur and cause skin damage. Photoaging is a major cause of skin aging and is responsible for most cosmetic and medical problems that occur on the skin. The wavelength of the sunlight that causes photoaging is the ultraviolet region. Sunlight is mainly caused by ultraviolet ray B, but ultraviolet ray A causes not only ultraviolet ray B but also skin aging and cancer. Therefore, ultraviolet rays A and B must be blocked in

order to prevent photo-aging.

As the intrinsic aging progresses, the thickness of the epidermis becomes thinner and the boundary of the dermis becomes flat, which weakens the adherence, so it can be easily peeled off or pushed against the light trauma.

In addition, the recovery rate is slower than that of younger age, and the skin becomes dry, resulting in fine keratin. Also the ability to synthesize vitamin D in the epidermis is also reduced. As a result, skin diseases such as dry dermatitis, pruritus, infectious skin diseases, skin ulcers, and adverse reactions to drugs occur. Also methods for inhibiting skin aging include calorie restriction, application of antioxidants, use of moisturizers, use of sunscreen agents, use of retinoids, and hormone therapy.

Actinidia chinensis can be used in sprout, stem, fruit, and sap. Recently, the antioxidative activity and phenolic compound content of *A. chinensis* stem and extract and the analysis of immune activity of *A. chinensis* hot water extract have been studied.

It is a *A. chinensis* that has been improved in a natural way by grafting new seeds to green kiwi trees. *A. chinensis* contains 55 calories, 1.4g dietary fiber, 1.3g carbohydrate, folic acid, twice the vitamin C content of orange and 6 times the vitamin E content of apple, and the most abundant folic acid, potassium, calcium, phosphorus Is contained in a large amount. Dietary fiber in *A. chinensis* is about three times that of apple, soluble fiber such as pectin slows the absorption of nutrients such as cholesterol in the blood, and insoluble dietary fiber removes toxins from the body. In addition, *A. chinensis* contains ingredients to prevent black spots and dullness, and contains more pectin in the flesh.

In present study, antioxidant activity of *A. chinensis* flesh extract was analyzed by DPPH radical scavenging activity, total polyphenol content, total flavonoid content and SOD-like activity, and anti-inflammatory activity was analyzed by

confirming reduction rate of nitric oxide production in macrophage cell line 264.7 cells. In addition, tyrosinase and melanogenesis inhibition activity of melanoma cell line B16F10 was analyzed to examine the whitening function of *A. chinensis* flesh extract.

DPPH radical scavenging activity was reduced by 63.0, 73.5, 85.4, 85.06 and 78.9%, respectively, and the total polyphenol contents were 5, 10, 20 and 40 mg/ml. The concentrations of tannic acid were found to be 92.6 ± 7 , 214.3 ± 18.8 , 427.6 ± 9.4 and 556 ± 30.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at the concentration of 5 mg/ml, respectively. The total flavonoid contents were 7.95 ± 0.7 , 16.2 ± 0.3 , 38.95 ± 1.4 and 58.45 ± 2.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ naringin equivalent And SOD-like activity analysis showed 54, 87 and 176% scavenging activity at 10, 20 and 40 mg/ml, respectively.

The results of cytotoxicity tests on Raw 264.7 cells showed a survival rate of 80% at a concentration of 10 mg/ml and thereafter the cell survival rate was decreased in a dose dependent manner. Nitrite scavenging activity of extracts at 1, 5, and 10 mg/ml showed 23.5, 86.2, and 80.1% reduction of LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), respectively. the tests on B16F10 cells showed that there was almost no cytotoxicity up to the concentration of 0.5 - 10 mg/ml and thereafter the cell survival rate was decreased in a concentration dependent manner.

Analysis of tyrosinase inhibitory activity of *A. chinensis* flesh extract showed that the positive control group, arbutin, inhibited 25% at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the extract had a tyrosinase inhibitory effect of 47% at a concentration of 1 mg/ml, and the inhibition of melanin biosynthesis The results showed that 82.3% of the positive control group, arbutin, showed a 82.3% reduction of melanin production, while the inhibition of melanin biosynthesis was 17.3% at 1 mg/ml of *A. chinensis* flesh extract.

Recent studies have shown that antioxidants are being developed from natural sources as side effects of BHT and BHA, which are synthetic antioxidants in the pulmonary system, have been revealed.

As a conclusion, JESPREI Gold *A. chinensis* fruit has excellent antioxidative and anti-Functional antioxidant, it is expected that it will be useful as a material and functional ingredient preparation which can increase the added value as a natural antioxidant in the future.

I. 서론

대기의 약 20%를 차지하는 산소는 호기적 대사를 하고 있는 생물체에 필수 불가결한 요소이다. 하지만 세포로 흡수된 산소의 1 - 4%는 전자 전달과정에서 완전히 환원되지 못하고 free radical로 전이되어 다양한 세포독성을 나타내게 된다.¹⁾ 활성산소는 대부분 불안정하여 전자를 잃거나 얻어서 보다 안정된 상태로 가려는 성질이 있다. 이들은 높은 반응성을 바탕으로 생체 내에서 DNA나 세포막 등에 작용하여 산화적 손상을 일으킨다고 보고되고 있다.^{2,3)} 생체의 산화반응 과정 중에 생성되는 활성산소들은 내부적으로는 염증 (Inflammation), 자가면역질환 (Autoimmune reactions), 허혈 (Ischemia)등에 의해서, 외부적으로는 미생물 (Microbiological organism), 전자기 조사 (Electromagnetic radiation), 기계적이나 화학적인 자극 등에 의해서 유발될 수 있고 체내의 항산화 효소 (Superoxide dimutase, catalase, glutathioneperoxidase)에 의해 제거되나,⁴⁾ 이를 초과한 과량의 활성산소종 (Reactive oxygen species; ROS)은 류마티스 관절염과 같은 퇴행성 질환이나 암, 동맥경화 등의 성인병과 깊은 관련이 있다.⁵⁾ 염증이란 Macrophage나 Mast cell 등의 백혈구에서 생성된 다양한 신호전달물질이 관여하는 일련의 병리적인 과정이며 Cytokine 네트워크와 다양한 염증인자 (Pro-inflammatory mediator)들의 유발 등에 의해서 조절되는 복합적인 과정으로 일어나게 된다. Nuclear factor-kappa B(NF-κB)는 많은 염증성 질환을 일으키는 병인으로 주목받고 있으며 L-arginine 으로부터 생성되는 iNOS (Inducible nitric oxide synthase), COX-2 (Cyclooxygenase-2)와 같은 염증인자를 전사시키는데 있어서 중요한 역할을 한다.⁶⁾ iNOS와 COX-2는 대표적인 염증 매개물인 NO (Nitric oxide) 생성에 관여한다. NO는 급성 및 만성염증 반응에 의해 과량 생성되며 염증반응을 촉진시키는 것으로 알려져있다.⁷⁾ 또한 COX-2는 Arachidonic acid로부터 염증매개 물질인 PGE₂ (Prostaglandin E₂) 생성을 촉매하는 효소로서 iNOS와 마찬가지로 염증반응에 중요한 역할을 한다.⁸⁾ 따라서 NO 생성이나 iNOS, COX-2의 발현 등은 항염증 물질을 찾는데 좋은 지표가 될 수 있을 것으로 사료된다. 실제로 뛰어난 항산화 물질이 NF-κ B의 활성을 억제하고^{9,10)} 세포내의 ROS 생성을 감소시킨다는¹¹⁾ 연구결과가 많이 보고되어있다. 박테리아성 내독소인 LPS (Lipopolysaccharide)는 대식세포에서 iNOS,

COX-2, TNF- α (Tumor necrosis factor- α), 세포내 ROS, 그리고 다양한 IL(Interleukin)들과 식세포의 활성과 연관된 다양한 염증 질환들의 치료에 유용하게 쓰일 수 있다고 간주되고 있으며, 대식 세포주 중에서도 마우스세포인 Raw 264.7 세포는 LPS의 자극에 반응하여 아주 효과적으로 염증 인자들이 생성되기 때문에 유용한 항염증 물질을 찾는 선별 검사에 사용되고 있다.^{12,13)} 최근 연구에 따르면 폐놀계 합성 항산화제인 BHT (Butylated Hydroxytoluene), BHA (Butylatedhydroxyanisole) 등의 부작용들이 밝혀짐에 따라 천연자원으로부터 항산화제를 개발하려는 노력이 많이 이루어지고 있고, 천연 자원에서 얻어진 항산화 물질들이 뛰어난 항염증 작용도 수반하고 있다고 알려진 경우도 많다.¹⁴⁾ 식물의 천연 추출물은 항염증 작용, 자외선 흡수, 피부 보습 작용, Elastase 와 Collagenase 등의 효소 억제, 활성 산소 소거, Tyrosinase 억제, ATP 생성증가, 그리고 경피 흡수를 증가시키는 등의 다양한 기전을 통하여 피부의 기능을 보호 할 수 있는 효과를 나타내기도 하며¹⁵⁾ 특히 피부색소 형성의 주요 원인이 자외선에 의해 발생된 활성산소가 피부색소 형성을 촉진한다는 메커니즘이 밝혀지면서 이를 활성 산소를 소거하는 것이 멜라닌색소 형성 억제에 효과적이라는 연구 보고가 있다.^{16,17)} 이에 따라 항산화 물질은 연속적인 산화과정에 의해 생성되는 멜라닌 색소 형성을 막을 수 있을 뿐 아니라 활성산소 소거를 통해서도 멜라닌 색소 형성을 막을 수 있는 미백 물질로 인식하게 되었다.¹⁸⁾ 특정 약리 작용을 가진 식물은 국내에 500 여 종이 알려져 있으나 대부분이 연구 초기단계에 있는 실정이다.¹⁹⁾

참다래는 다래나무과(Acinidiaceae) 다래나무속(*Actinidia*)에 속하는 다년생 자웅이주의 덩굴성 낙엽과수로서, 전 세계적으로 64종이 알려져 있는데 국내에는 다래(*A. arguta*), 쥐다래(*A. kolomikita*), 개다래(*A. polygama*), 섬다래(*A. rufa*)등 4종이 분포하고 있다. 다래나무속 중 경제성이 있는 품종으로서 *A. delicosa*에는 참다래로 알려진 Hayward 품종이 있고, *A. chinensis*에는 제스프리골드키위로 알려진 Hort16A 품종이 전 세계적으로 상용화되고 있다. 최근에는 국내에서도 다양한 품종들이 개발되어 주로 남해안 일대와 제주도에서 재배되고 있으며 그 생산량은 해마다 증가되고 있다.²⁰⁻²⁴⁾ 참다래의 과육 중에는 단백질 분해효소인 Actinidin이 함유되어 있어 소화촉진 작용을 하며 비타민 C는 오렌지, 딸기, 레몬, 자몽 등의 과실류보다 함유량이 높은 것으로 보고되고 있으며 그 외에 클로로필, 카로티노이드, 폴리페놀, 플라보노이드와 같은 생리활성물질을 다양 함유하고 있다.²⁴⁻³³⁾ 폴리페놀 화합물은 Flavonoid, Anthocyanins, Tannins, Isoflavones, Lignans, Resveratrols 등을 총칭하며, 식물계에 널리 분포되어 있고 과실

및 엽채류에 다량 함유되어 있다.^{34,35)} 폴리페놀 (Polyphenol)에 존재하는 다수의 히드록실기

(-OH)는 여러 화합물과 쉽게 결합하는 특성을 가지고 있어 항산화 효과 및 항암, 항염 효과가 뛰어나다.^{36,37)} 플라보노이드 (flavonoid)는 폴리페놀에 속하는 성분으로, 플라보노이드의 C6-C3-C6를 기본골격으로 가지고 노란색 내지는 담황색을 나타내는 폐놀계 화합물의 총칭으로 자연계에 널리 분포하고 있으며 폴리페놀과 같이 채소류와 식물의 잎, 꽃, 과실, 줄기 및 뿌리 등 거의 모든 부위에 함유되어 있을 뿐 아니라 곡물, 과실류 등에도 다량 함유되어 있다.³⁸⁾ 또한 폴리페놀과 마찬가지로 높은 항산화 효능으로 항바이러스, 항염증, 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있다.³⁹⁻⁴²⁾ 최근 폴리페놀, 플라보노이드가 가지는 다양한 기능성을 확인하고 새로운 원료 자원을 발굴하고자 다양한 식물자원으로부터 폴리페놀 또는 플라보노이드의 함량 분석 및 그 효능에 대한 연구가 진행되고 있다.⁴³⁻⁴⁵⁾

향후 천연자원을 활용한 항염증, 항산화, 미백기능성 제제의 발굴과 더불어 이들 식물유래 천연추출물을 이용한 기능성 천연물 제제에 관한 연구는 더욱 활발해 질 것으로 전망된다. 따라서 본 연구는 항산화, 항염증 및 미백기능성을 가지고 있을 것으로 사료되며 비교적 부작용이 적은 골드키위 (*Actinidia chinensis*) 껍질을 추출하여 LPS 자극 대식세포주에서 NO 생성량 감소를 통해 항염증 효능 분석, DPPH radical 소거능, Super oxide anion radical 소거능 그리고 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석을 통해 추출물의 항산화 효능을 분석하고 Melanoma 세포인 B16F10에서 Tyrosinase 저해 활성 및 Melanin 생성량 억제 효능을 분석하고자 한다.

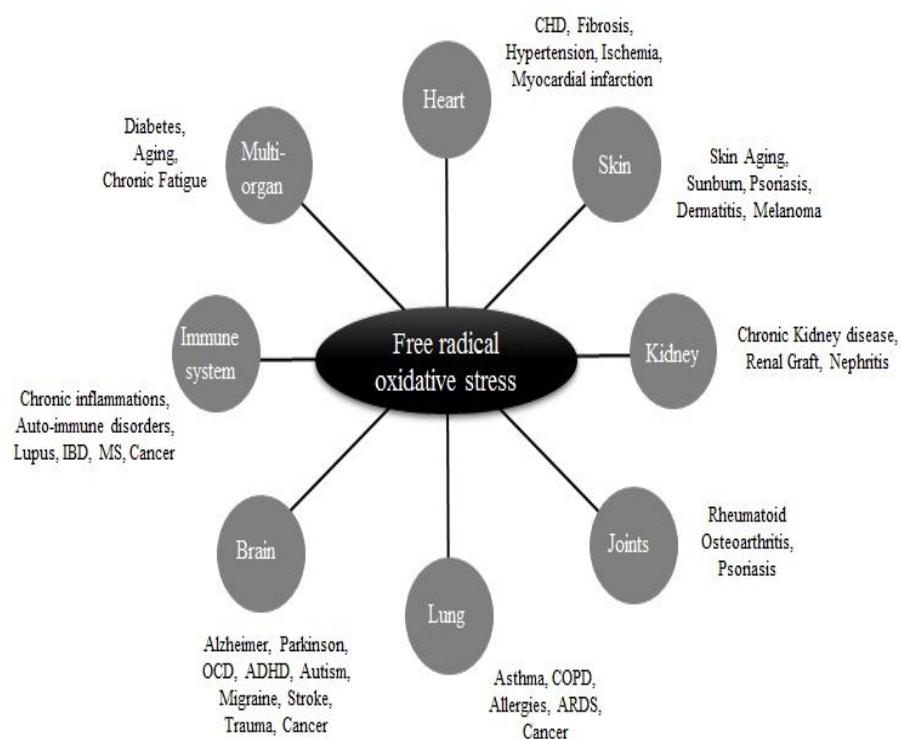


Fig. 1. The pathophysiological effects of free radical oxidative stress.



학명 : *Actinidia chinensis*
원산지 : New Zealand

니아신 0.30 mg	나트륨 3.00 mg	단백질 0.80 g	당질 15.10 g	레티놀 0.00 µg	베타카로틴 46.00 µg
비타민 A 8.00 µgRE	비타민 B1 0.00 mg	비타민 B2 0.02 mg	비타민 B6 0.09 mg	비타민 C 38.00 mg	비타민E 1.00 mg
식이섬유 1.63 g	아연 0.13 mg	엽산 30.00 µg	인 26.00 mg	지질 0.50 g	철분 0.30 mg
칼륨 278.00 mg	칼슘 30.00 mg	콜레스테롤 0.00 mg	회분 0.70 g	영양성분 : 100g 기준	

Fig. 2. Explanation of *A. chinensis*.

II. 재료 및 방법

II-1. 재료 및 시약

본 실험에서 사용한 골드키위 (*Actinidia chinensis*)는 전남 보성군 벌교읍에서 재배되는 키위를 구입하여 사용하였다. 본 연구에 사용된 시약으로 dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin streptomycine, dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) 및 phosphate-buffered saline (PBS)는 welgene biotech (taiwan, china) 사의 제품, MTT (Thiazolyl Blue Tertazolum Bromide), phosphoric acid, sulfanilic acid (minimum 99.00%), N-(1-Naphthyl) ethylene-diamine dihydrochloride, sodium nitrite, folin-denis reagent, sodium carbonate, naringin, diethylene glycol, α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) 및 lipopolysaccharide (LPS)는 sigma-aldrich (yong in, korea) 사의 제품, tannic acid 및 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 junsei (japan) 사의 제품, methanol, ethanol, sodium hydroxide는 duksan biotech (ansan, korea) 사의 제품, 6, 12, 24 및 96 well plate는 spl lifescience (sung nam, 4science) 사의 제품을 사용하였다.

II-2. 분석기기

ELISA reader (Bio Tek Instrument Inc.).

II-3. 세포배양

본 실험에 이용한 세포주는 Melanoma 세포인 B16F10, Macrophage 세포인 Raw 264.7을 Korean cell line bank (KCLB)에서 구입하여 사용하였다. 세포의 배양은 10% FBS과 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

II-4. 추출물 제조

추출 용매로 80% 주정 알코올을 사용하여 건조한 키위 껍질 46.8 g의 5배 무게에 해당하는 234 ml을 넣고 빛을 차단 후 실온에서 3일 간 추출하였다. 1회 여과한 후 최소 온도 (40 - 60°C)에서 농축한 뒤 동결 건조하여 파우더 형태로 사용하였다.

II-5. 세포독성

세포 생존율은 MTT assay를 이용하였으며 이는 세포 내 소기관인 미토콘드리아의 탈수효소에 의해 생성되는 formazan의 흡광도를 측정⁴⁶⁾하는 원리이다. macrophage Raw 264.7 세포주의 배양은 10% FBS과 1% P/S (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하여 사용하였다. 48-well plate에 2 × 10⁵ cells/well으로 Raw 264.7을 접종하

여 24시간 배양하였고 *A. chinensis* 껍질 추출물을 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 및 40 mg/ml의 농도로 처리한 후 20시간 동안 추가 배양하였다. 배양 된 well plate에 5 mg/ml의 농도로 제조한 MTT 시약을 100 µl/well를 첨가하여 4시간 추가 배양 후 DMSO를 1 ml씩 첨가하고 빛을 차단하여 15분간 반응시킨 뒤, ELISA reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3회 반복 수행하여 세포 생존율 평균값을 도출하였다.

II-6. 아질산염 소거능

NO 측정은 Lee 등의 방법에 따라⁴⁷⁾ 세포의 상층액에서의 NO 양을 nitric and nitrate로서 측정을 하였다. nitrate로 환원된 후의 안전한 형태인 Griess reagent를 사용하였으며, 12-well plate에 5×10^4 cells/well의 confluence가 80% 일 때, PBS로 2회 washing 한 후 *A. chinensis* 껍질 추출물을 1, 5, 10 mg/ml의 농도로 처리, 30분 후 LPS를 1 µg/ml을 처리하였다. NO 생성량은 24시간 후에 상층액을 모아 Griess reagent로 10 분간 반응시킨 후에 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. *A. chinensis* 껍질 추출물과 LPS를 처리하지 않은 무첨가군에서 생성된 NO 양을 100%로 하여 시료가 첨가된 경우에 측정된 흡광도를 환산하여 표기하였다.

II-7. 항산화 활성 측정

II-7-a. 전자공여능 확인

전자공여능 측정에 사용된 DPPH는 자체가 매우 안정한 free radical로서 알코올 등의 유기용매에 매우 안정하며 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있어 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있고,⁴⁸⁾ 517 - 520 nm에서 강한 흡수띠를 보이는 보라색 분획물이다. 반응액의 색

이 노란색으로 변화되는 것을 흡광도의 감소로 측정함으로써 radical 소거 활성을 알 수 있다. DPPH radical 소거 활성 실험은 다음과 같이 실행하였다. 96 well plate에 *A. chinensis* 껍질 추출물을 0, 1, 5, 10, 20 및 40 mg/ml의 농도로 하여 희석액을 100 μl씩 분주한 후 여기에 0.5 mM의 DPPH를 100 μl을 넣고 빛을 차단하여 20 분간 반응시켰고 동일한 방법으로 Ascorbic acid는 15.6, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1000 μg/ml의 농도로 처리하였다. ELISA reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정은 3회 반복 수행하여 흡광도의 평균값을 도출하였다. 무첨가군은 시료 용액 대신 순수한 추출 용매인 주정 알코올을 사용하였으며, 전자공여 효과는 시료 첨가군과 무첨가군의 흡광도를 아래식에 따라 백분율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

II-7-b. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 folin-denis법에 따라⁴⁹⁾ *A. chinensis* 껍질 추출물 0.1 g에 Methanol 1 ml을 가하여 70°C에 30분 동안 반응 한 후 100 mg/ml을 희석하여 사용한다. 검액 50 μl에 중류수 650 μl를 넣고 folin-denis reagent 50 μl를 가하여 3분 동안 실온에서 반응시킨다. 이에 10% Na₂CO₃ 포화용액을 100 μl 첨가하고 최종 볼륨을 1 ml로 맞추기 위해 중류수 120 μl를 넣어 잘 혼합시킨다. 37°C 항온수조에 1 시간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험 시료 용액 대신 methanol 액을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 tannic acid 농도를 0 - 500 μg/ml이 되도록 하고 이로부터 총 폐놀함량을 구하였다.

II-7-c. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법⁵⁰⁾에 따라, *A. chinensis* 껌질 추출물 0.1 g에 Methanol을 1 mL 가하여 70°C에 30분 동안 추출한 후 100 mg/ml을 만들어 희석하여 사용하였다. 검액 100 μl에 1 ml Diethylene glycol을 첨가하고 1 N NaOH 100 μl를 넣어 잘 혼합시켜 37°C 항온수조에 1시간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험 시료 용액 대신 methanol 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 naringin 농도를 0 - 300 μg/ml이 되도록 하여 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

II-7-d. Superoxide anion radical 소거능 확인

SOD 유사 활성 측정은 Marklund 등의 방법에 따라⁵¹⁾ 각 시료액 0.2 mL에 Tris - HCl 완충용액 (50 mM tris, 10 mM EDTA, pH 8.5) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL을 가하고 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시킨 후 ELISA reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. *A. chinensis* 껌질 추출물을 0, 1, 5, 10, 20 및 40 mg/ml의 농도로 희석하여 실험하였다. SOD 유사활성은 시료 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 차이를 아래의 계산식에 따라 백분율로 나타내었다.

$$\text{SOD-like activity (\%)} = (1 - \frac{\text{Sample Abs.}}{\text{Control Abs.}}) \times 100$$

II-8. 미백 기능성 분석

II-8-a. 세포 배양

본 실험에 이용한 세포주는 Melanoma B16F10 을 KCLB에서 구입하여 사용하였다. 세포의 배양은 10% FBS과 1% P/S (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

II-8-b. Tyrosinase 저해 활성 측정

B16F10 세포를 배양하여 6-well plate에 1×10^5 cells/well로 접종한 후, 5% CO₂, 37°C를 유지하면서 48 시간 배양하였다. 배양 후 각 well을 PBS로 세척하고, 1% Triton X-100을 함유한 PBS 200 μL에 혼탁시켰다. 혼탁시킨 세포를 13,000 rpm에서 10분 간 원심분리한 후 얇은 펠렛을 활성 측정 효소액으로 사용하였다. tyrosinase 저해 활성을 측정하기 위하여 96-well plate에 효소액 100 μL를 넣고, 기질인 L-DOPA (2 mg/mL) 100 μL를 첨가한 후 37°C를 유지하면서 1 시간 동안 반응을 진행시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

II-8-b. Melanin 생합성 저해율 측정

B16F10 세포를 배양하여 6-well plate에 1×10^5 cells/well로 접종한 후, 5% CO₂, 37°C를 유지하면서 48 시간 배양하였다. 배양 후 각 well을 PBS로 세척하고, 1% Triton X-100을 함유한 PBS 200 μL에 혼탁시켰다. 혼탁시킨 세포를 13,000 rpm에서 10분 간 원심분리한 후 얇은 펠렛에 1 N NaOH 150 μL를 첨가하고 55°C에서 1 시간 용해하였으며, ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

III-1. 세포독성

Macrophage Raw 264.7 세포주에서 *A. chinensis* 껍질 추출물의 세포독성 확인을 위해 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 및 40 mg/ml의 농도별로 *A. chinensis* 껍질 추출물을 처리한 후 24 시간 배양하였다. 결과적으로 *A. chinensis* 껍질 추출물을 0.5, 1, 2.5 및 5 mg/ml 처리 시 100% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 10 mg/ml 처리 시 80%의 세포 생존율을 나타내었으며, 이후 농도의존적으로 세포 생존율이 낮아짐을 확인하였다(Fig. 3). Raw 264.7 세포에서 쥐똥나무잎 물 추출물과 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과 0.2 mg/ml 이하의 농도에서 모두 99% 이상 생존율을 보인데⁵⁴⁾ 비해 *A. chinensis* 추출물 5 mg/ml 농도 이하 처리 시 세포독성은 거의 없음을 알 수 있었다. 본 연구에서는 세포 생존율이 80% 이상을 기록하는 *A. chinensis* 껍질 추출물 10 mg/ml 농도 이하를 최대 농도로 적용하였다.

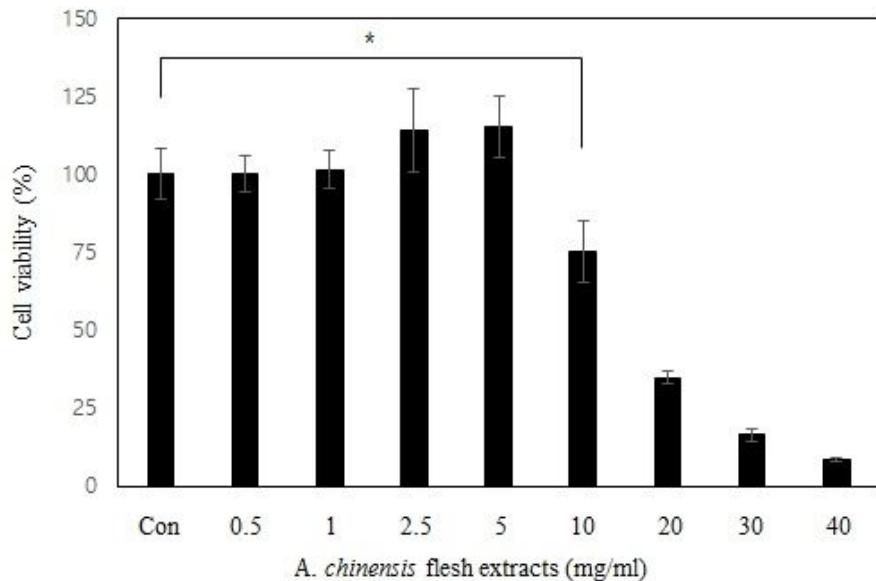


Fig. 3. Cytotoxicity of *A. chinensis* flesh extracts on Raw 264.7 cells.
The cellular toxicity of *A. chinensis* flesh extracts on Raw 264.7 (2×10^5 cells). The cells were seeded on 48-well plates and incubated for 24 h. The cells were treated with 0, 1, 5, 10, 20 and 40 mg/ml concentrations of *A. chinensis* flesh extracts. After further incubation for 20 h, cell viability was determined using the MTT assay. Value is expressed as mean \pm SD of at least three independent experiments. * p < 0.05, compared with other concentrations.

III-2. 아질산염 소거능

아질산염 소거능 또한 시료의 항산화 효능과 연관된 실험법으로, 라디칼류 중 하나인 nitrite는 Griess reagent와 반응하여 보라색 아조염을 형성한다. 이는 nitrite의 농도에 따라 비례하므로 시료의 nitrite의 제거능을 비색법에 의해 측정⁵⁵⁾할 수 있는데, *A. chinensis* 껌질 추출물의 아질산염 소거능을 평가한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 이전 연구에 따르면 잘피 에탄올 추출물의 경우 50 µg/ml 이상의 농도로 추출물을 처리하였을 때 LPS 처리군보다 50% 이상 분비량 감소⁵⁶⁾를 나타냈으며, 대조군 대비 73 - 84% 수준으로 감소⁵⁷⁾되었다고 보고된 바 있다. 본 실험에서는 *A. chinensis* 껌질 추출물의 농도를 1, 5, 10 mg/ml로 처리하였을 때 LPS (1 µg/ml) 처리군에 비해 아질산염 소거능은 각각 23.5, 86.2, 80.1%로 나타났으며 최소 1 mg/ml 농도에서 23.5% LPS 분비량 감소를 보였으나 비교 논문들의 실험상 농도보다 고농도 이므로 농도를 낮추어 실험진행을 하는 것이 필요하다고 사료된다.

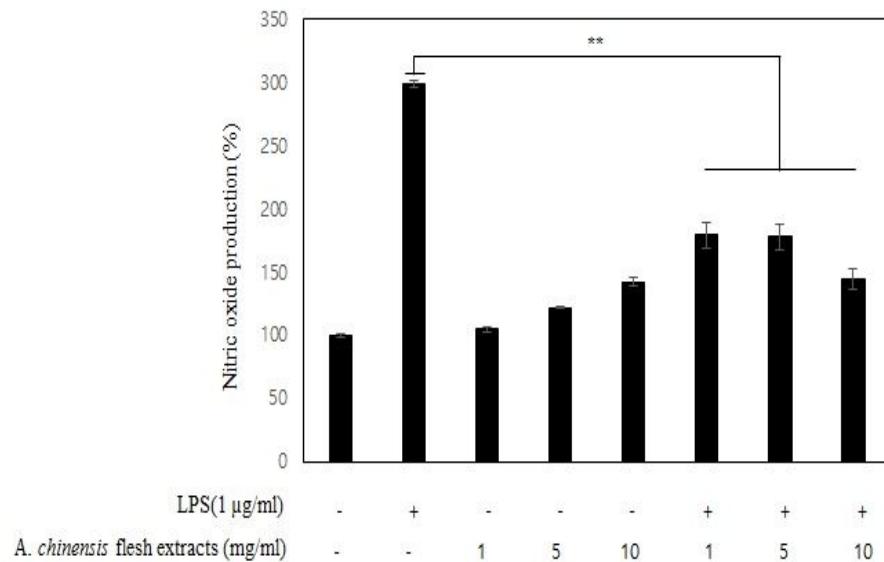


Fig. 4. Effect of *A. chinensis* flesh Extracts on NO production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were stimulated with 1 μ g/ml of LPS. NO production from these cells was significantly decreased in dose-dependent manner up to 5 mg/ml. Various concentration of *A. chinensis* flesh extracts were produce NO production in dose-dependent manner. Values are expressed as the mean \pm SD. ** $p < 0.01$ as compared with the LPS-induced cells by LPS.

III-3. 항산화 활성 측정

III-3-a. 전자공여능 확인

A. chinensis 껌질 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위하여 DPPH radical 소거 활성을 각각의 농도 별로 실험을 진행하였다. 양성 대조군으로 사용한 Ascorbic acid 는 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5 및 1 mg/ml 농도에서 44.9, 76.8, 89.3, 89.6, 89.7 및 89.1%의 소거능을 나타냈다 (Fig. 5). 이전에 진행된 연구에 따르면 키위 잎과 과육의 에탄올 추출물에서 과육부위 보다는 잎 부분에서 더 좋은 활성을 보이며 첨가물의 첨가 농도가 높아 질수록 더 높은 소거능을 나타냈고 1000 µg/ml의 농도에서 60 - 87% 의 소거능이 보고된 바 있다.⁵⁸⁾ 본 실험에서 *A. chinensis* 껌질 추출물의 DPPH radical 소거 활성은 1, 5, 10, 20 및 40 mg/ml 의 농도로 처리하였을 때 각각 63.0, 73.5, 85.4, 85.06 및 78.9%의 소거능을 보였다 (Fig. 5). DPPH radical 소거능을 비교 분석한 결과, *A. chinensis* 껌질 추출물이 10 mg/ml 농도 이상에서 양성대조군인 Ascorbic acid 의 소거능과 유사한 소거활성을 나타냄을 확인하였다.

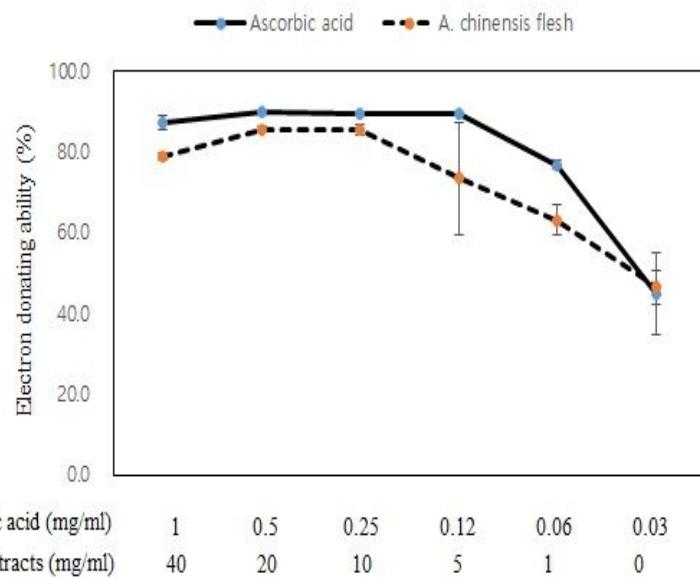


Fig. 5. Electron donationg ability from *A. chinensis* flesh extracts. Free radical scavenging capacity (%) of ascorbic acid and *A. chinensis* flesh extracts by the DPPH method. At the concentration of 10 mg/ml, expressed as 85.4% of electron donating ability. as well the pattern is similar to 1 mg/ml of ascorbic acid.

III-3-b. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 folin-denis법에 따라 추출물 0.1 g에 methanol 10 ml을 가하여 70°C에 30분 동안 반응 한 후 1 mg/ml로 희석하여 사용한다. 검액 50 μl에 중류수 650 μl를 넣고 folin-denis reagent 50 μl를 가하여 3분 동안 실온에서 반응시킨다. 이에 10% Na₂CO₃ 포화용액을 100 μl 첨가하고 최종 볼륨을 1 ml로 맞추기 위해 중류수 120 μl를 넣어 잘 혼합시킨다. 37°C 항온수조에 1시간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험 시료 용액 대신 methanol 액을 동일하게 처리하였으며, 표준 곡선은 tannic acid 농도를 0 - 500 μg/ml이 되도록 하여 이로부터 총 폐놀 함량을 구하였다.

A. chinensis 껌질 추출물의 농도별 총 폐놀 함량은 Fig. 6에 나타나있다. *A. chinensis* 껌질 추출물 5 mg/ml 농도에서 총 폐놀 함량은 92.6 μg/mg tannic acid equivalent 이었으며, 추출물의 농도가 증가함에 따라 총 폐놀 함량도 비례적으로 증가하여, 5, 10, 20 및 40 mg/ml 농도에서 총 폐놀 함량이 각각 92.6 ± 7.0, 214.3 ± 18.8, 427.6 ± 9.4 및 556 ± 30.6 μg/ml tannic acid equivalent로 나타났으며 기존에 연구되어진 감 껌질의 총 폴리페놀 함량분석 결과 20.89 ± 0.69 mg/g이 함유⁵⁹⁾되어 있는 것과 비교하여 *A. chinensis* 껌질 추출물의 총 폐놀 함량이 우수함을 확인하였다.

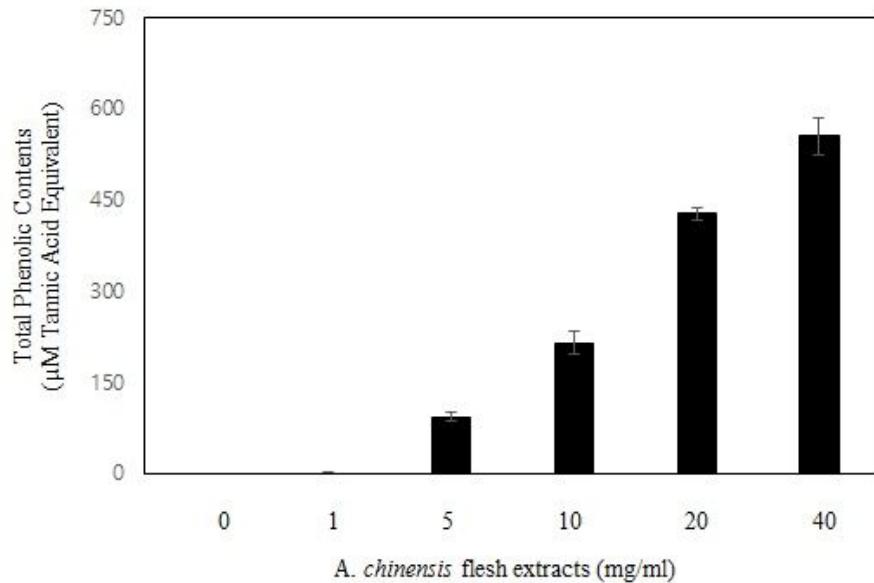


Fig. 6. Total phenolic content of *A. chinensis* flesh extracts. Total polyphenolic compounds of the different concentrations of *A. chinensis* flesh extracts. concentration of extracts were 1, 5, 10, 20 and 40 mg/ml. Results were expressed as tannin acid equivalent.. The polyphenolic content has been enhanced by concentration.

III-3-c. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법에 따라, 추출물 0.1 g에 methanol 을 10 ml 가하여 70°C에 30분 동안 추출한 후 1 mg/ml을 만들어 사용하였다. 검액 100 µl에 1 ml Diethylene glycol을 첨가하고 1 N NaOH 100 µl를 넣어 잘 혼합시켜 37°C 항온수조에 1시간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 420 nm에 흡광도를 측정하였다. 공시험 시료 용액 대신 methanol 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 naringin 농도를 0 - 300 µg/ml이 되도록 하여 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

A. chinensis 껍질 추출물의 농도별 총 플라보노이드 함량은 Fig. 7에 나타나 있다. *A. chinensis* 껍질 추출물 5 mg/ml 농도의 총 플라보노이드 함량은 7.95 µg/mg naringin equivalent 이었으며, 추출물의 농도가 증가함에 따라 플라보노이드 함량도 비례적으로 증가하여 1, 5, 10, 20 및 40 mg/ml 농도에서 각각 1.45 ± 2.1 , 7.95 ± 0.7 , 16.2 ± 0.3 , 38.95 ± 1.4 및 58.45 ± 2.8 µg/ml naringin equivalent로 나타났다. 이전에 보고 된 연구결과에 따르면 청미래덩굴 뿌리의 물 추출물의 경우 1.25 ± 1.31 mg/g을 포함⁶⁰⁾, 영귤과 진귤등의 감귤 과피의 80% 메탄올 추출물은 각각 30.3과 25.5 mg/g 을 포함⁶¹⁾하는 것과 비교하여 *A. chinensis* 껍질 추출물은 청미래덩굴 뿌리의 물 추출물 보다 같은 농도에서 7배 정도 더 높은 플라보노이드 함량을 보였으며, *A. chinensis* 껍질 추출물은 농도가 증가할수록 naringin equivalents의 mg/ml이 증가하는 경향이 나타났다.

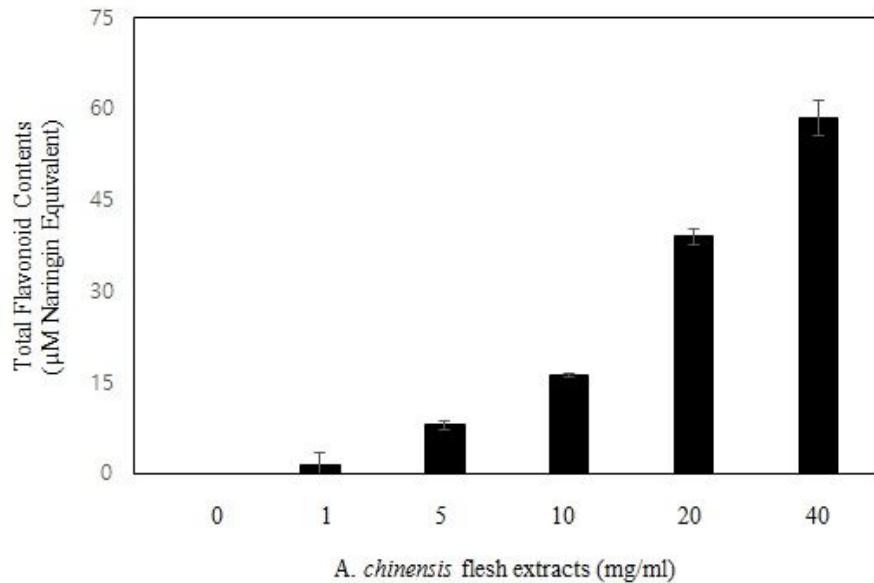


Fig. 7. The flavonoid contents of *A. chinensis* flesh extracts. Total flavonoid compounds of the different concentrations of *A. chinensis* flesh extracts. the concentration of the extract were 1, 5, 10, 20 and 40 mg/ml. Results were expressed as naringin equivalent. The flavonoid content has been enhanced by concentration.

III-3-d. Superoxide anion radical 소거능 확인

항산화 효소 중 하나인 SOD는 생체에 매우 유해한 Superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$)과 반응하여 Hydrogen peroxide (H_2O_2)를 생성하는 효소로, 산소를 소비하는 모든 생물종에 존재하여 생체 내에서 활성산소 장애에 대한 방어 작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제⁶²⁾이다. 또한 산소 분자가 환원되어 생기는 superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^- \cdot 2\text{O}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow 2\cdot\text{O}_2^-$)을 제거하는 첫 번째 방어 메커니즘에 관여하는 중요한 효소($2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$)이며, 가장 독성이 강한 hydroxy radical의 생성을 예방하는 작용을 하여 현재 항염증 소재나 피부 노화 방지를 위한 미용 소재로 화장품 등의 첨가제로서 사용되고 있다.⁶³⁾ 이러한 피부 노화 방지와 밀접한 관련이 있는 SOD 유사 활성을 측정한 결과 Fig. 8과 같이 나타내었다. *A. chinensis* 껍질 추출물의 경우 10, 20, 40 mg/ml 의 농도에서 각각 54 ± 0.4 , 87 ± 0.1 , $176 \pm 10.7\%$ 의 소거능을 나타내었다. 전체적으로 SOD 유사활성을 농도에 의존하는 경향을 보여주었고, 이러한 결과는 *A. chinensis* 껍질 추출물이 피부노화 방지를 위한 천연소재로 이용가능성이 있는 것으로 사료된다.

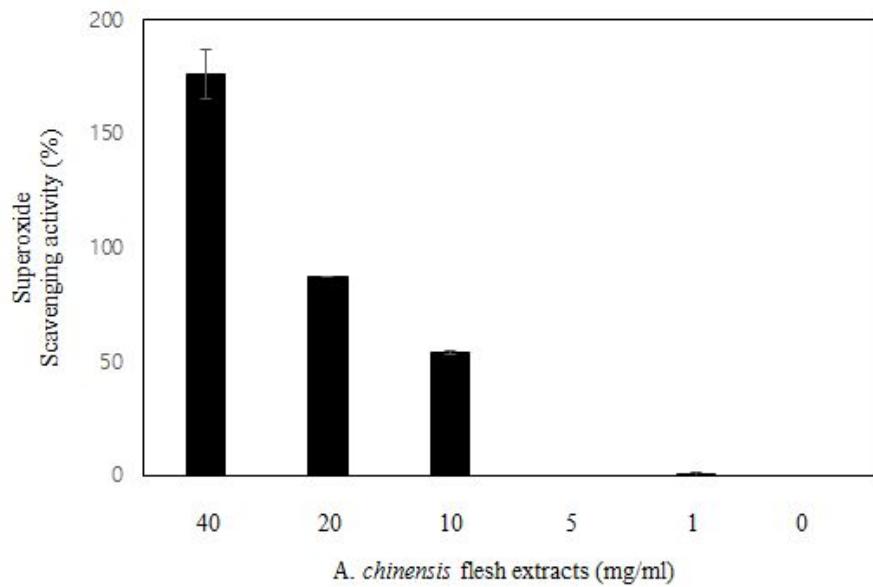


Fig. 8. Superoxide dismutase - like activity of *A. chinensis* flesh extracts. SOD levels depends on the concentration of the *A. chinensis* flesh extract. At the concentration of 10 mg/ml, expressed as 54% of scavenging activity. Data results were expressed as % inhibition of the scavenging activity.

III-4. 미백 기능성 분석

III-4-a. 세포독성

Melanoma B16F10 세포주에서 *A. chinensis* 껍질 추출물의 세포독성 확인을 위해 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 및 40 mg/ml의 농도별로 *A. chinensis* 껍질 추출물을 처리한 후 24 시간 배양하였다. 결과적으로 *A. chinensis* 껍질 추출물 0.5, 1, 2.5, 5 및 10 mg/ml 처리 시 100% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 10 mg/ml 농도에서 독성이 없음을 나타내었으며 이후 농도의존적으로 세포 생존율이 낮아짐을 확인하였다 (Fig. 9). 이전에 보고된 연구에 따라 유근피 추출물 처리 농도 (100 - 500 mg/ml) 범위 내에서 Raw 264.7 대식세포의 생존율에는 유의적인 변화가 관찰되지 않았고⁶⁴⁾, 나무딸기류 과일추출물의 경우에도 2.5 mg/ml 이하의 농도에서는 세포독성이 없는 것⁶⁵⁾으로 미루어보아 10 mg/ml까지의 농도가 고농도 임에도 불구하고 세포생존율에는 영향을 미치지 않는다고 사료된다. 본 연구에서는 세포 생존율이 80% 이상을 기록하는 *A. chinensis* 껍질 추출물 1 mg/ml 농도를 최대 농도로 적용하였다.

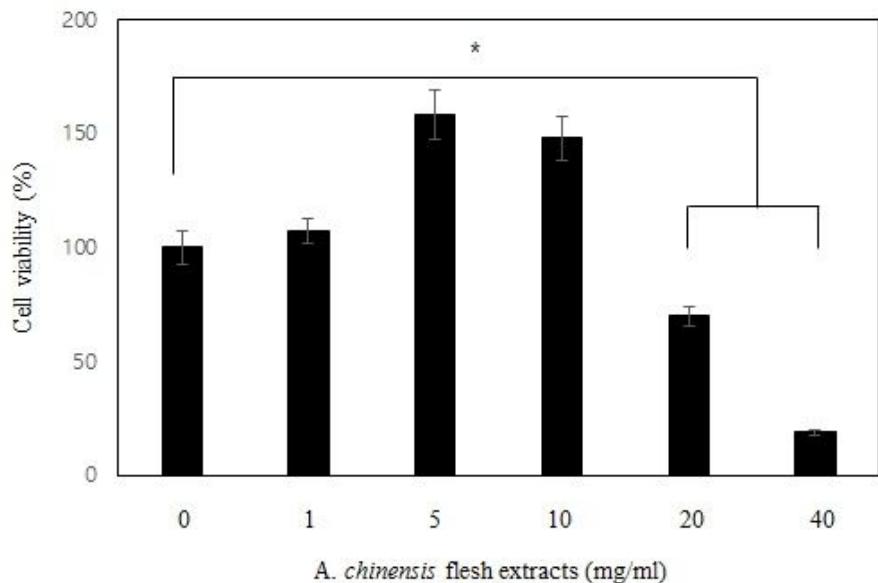


Fig. 9. Cytotoxicity of *A. chinensis* flesh extracts on B16F10. The cellular toxicity of *A. chinensis* flesh extracts on B16F10 (1×10^5 cells). the cells were seeded on 24-well plates and incubated for 24 h. The cells were treated with 0, 1, 5, 10, 20 and 40 mg/ml concentrations of *A. chinensis* flesh extracts. After further incubation for 20 h, cell viability was determined using the MTT assay. Value is expressed as mean \pm SD of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, compared with other concentrations.

III-4-b. Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase의 활성을 효과적으로 억제할 수 있는 물질은 피부의 melanin 생성을 억제할 수 있기 때문에 피부미백을 목적으로 하는 기능성 화장품의 첨가제로 이용⁶⁶⁾할 수 있다. *A. chinensis* 껌질 추출물이 B16F10 세포 내의 tyrosinase 활성도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포독성이 없는 1, 5, 10 mg/ml 농도로 처리한 후 확인하였다. tyrosinase 효소는 melanin 합성 과정에서 속도 결정 단계인 초기 반응에 관여하는 효소이며, melanin 합성의 주요한 조절적 단계를 나타내는 효소로 tyrosin을 DOPA로 전환하는 DOPAquinone으로 산화하는 DOPAOxidase 활성을 가지고 있다.⁶⁷⁾

A. chinensis 껌질 추출물의 tyrosinase 활성이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였으며, 양성대조군인 arbutin의 경우 1 µg/ml에서 25%의 저해 활성을 보였고 *A. chinensis* 껌질 추출물의 경우 1 mg/ml 의 농도 47%의 tyrosinase 저해 효과를 나타내었다 (Fig. 10). 정 등^{68,69)}의 논문 따르면 오매 및 복분자가 각각 81%, 63%의 활성을 나타내었다는 연구결과 비교하여 다소 낮은 활성이지만 오가피 22%, 두충 17%의 활성을 나타내었다는 연구결과와 비교하였을 때 *A. chinensis* 껌질 추출물의 tyrosinase 저해활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

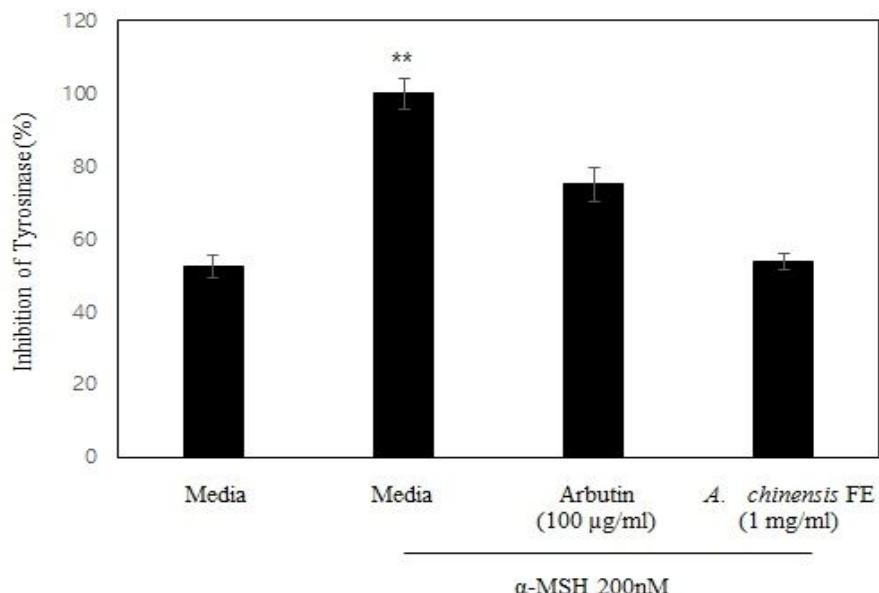


Fig. 10. Effect of *A. chinensis* flesh extracts on cellular tyrosinase activity of B16F10 melanoma cells. B16F10 cells were treated with *A. chinensis* flesh extracts 1, 5, 10 mg/ml for 2 days, harvested, and tyrosinase extracted from the treated cells. The cellular tyrosinase was then incubated with 40 µl of L-dopa (2 mg/ml) 100 µl at 37°C for 1 h and the contents measured at 475 nm. Each value is expressed as mean ± SD of at least three independent experiments. ** $p < 0.01$, compared with arbutin (100 µg/ml) and *A. chinensis* flesh extracts (1 mg/ml).

III-4-c. Melanin 생합성 저해율 측정

Melanin은 세포 내의 소기관인 ribosome에서 tyrosinase라는 효소의 생합성에서 합성되기 시작한다. 이 효소의 작용으로 아미노산의 일종인 tyrosine에서 몇 단계의 합성을 거쳐, 기저층의 melanin 세포 melanoma site라는 흑색소포 표면에 침착하여 검고 갈색의 작은 melanin 입자가 만들어진다.⁶⁸⁾

A. chinensis 껌질 추출물의 농도별 melanin 생성량 측정 결과 양성대조군인 arbutin 100 µg/ml 처리시 82.3%로 나타났고, melanin 생성량이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였으며, 1 mg/ml 농도에서 melanin 생합성 17.3%의 저해 효과를 나타내었다 (Fig. 11).

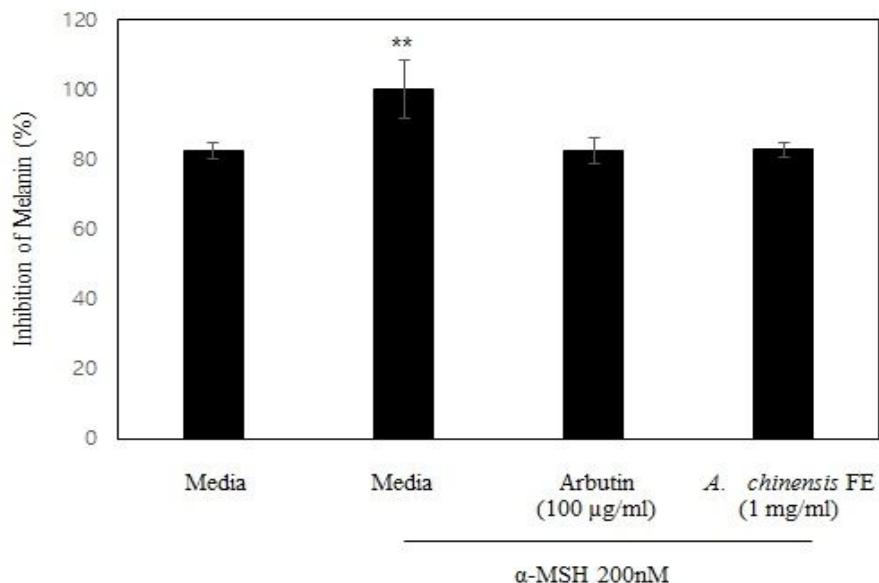


Fig. 11. Inhibitory effect of *A. chinensis* flesh extracts on melanogenesis of cultured B16F10 melanoma cells. B16F10 cells were treated with *A. chinensis* flesh extracts 1, 5, 10 mg/ml for 2 days, and then harvested, pelleted, and the melanin contents assayed, as described in Materials and Methods. the contents measured at 490 nm. Each value is expressed as mean \pm SD of at least three independent experiments. ** $p < 0.01$, compared with arbutin (100 µg/ml) and *A. chinensis* flesh extracts (1 mg/ml).

IV. 요약 및 제언

본 연구는 이전에 보고된 연구에서 Actinidin 및 비타민 C, 클로로필, 카로티노이드, 폴리페놀, 플라보노이드와 같은 생리활성물질을 다른 과실류와 비교하여 다량 함유하고 있으며 높은 항산화 효능, 항바이러스, 항염증, 항암 효과가 있는 것으로 알려진 제스프리 골드키위의 과피를 활용하여 항산화 효능 및 항염증, 미백 기능성을 분석하여 향후 식물유래 천연 추출물을 이용한 기능성 제제로써의 가능성을 분석 하고자 실험적 연구를 수행하였고 제스프리 골드키위 껍질에 산화적 스트레스와 염증반응에 탁월한 효능이 있음이 연구되었다. 본 연구에서는 제스프리 골드키위 껍질을 60°C 오븐에 48시간 건조시킨 후 80% 주정 알코올로 추출하여 이들의 항산화능을 DPPH 라디칼 소거능, 총 폐놀 함량, 총 플라보노이드 함량, SOD 유사활성을 측정함으로써 부산물의 천연 항산화 소재로써의 활용 가능성을 검증하였고 Macrophage Raw 264.7 세포주에서 아질산염 소거능을 통해 항염증 활성을 확인하였으며 melanoma 세포인 B16F10에서 tyrosinase 저해 활성 및 melanin 생합성을 저해 활성을 분석하였다. DPPH 라디칼 소거능은 1, 5, 10, 20 및 40 mg/ml의 농도로 처리하였을 때 각각 63.0, 73.5, 85.4, 85.06 및 78.9%의 소거능을 보였으며 총 폴리페놀 함량의 경우 5, 10, 20 및 40 mg/ml 농도에서 각각 92.6 ± 7 , 214.3 ± 18.8 , 427.6 ± 9.4 및 556 ± 30.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tannic acid equivalent로 나타났고 총 플라보노이드 함량의 경우 5, 10, 20 및 40 mg/ml 농도에서 각각 7.95 ± 0.7 , 16.2 ± 0.3 , 38.95 ± 1.4 및 58.45 ± 2.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ naringin equivalent로 나타났다. 그리고 SOD 유사활성 분석 결과 10, 20, 40 mg/ml 농도에서 각각 54, 87, 176%의 소거능을 보였다. Raw 264.7 세포에서 세포독성 실험 결과 10 mg/ml 농도에서 80%의 생존율을 가지며 이후 농도 의존적으로 세포 생존율이 낮아짐을 확인하였고 아질산염 소거능 분석 결과 추출물을 1, 5, 10 mg/ml로 처리하였을 때 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리군에 비해 각각 23.5, 86.2, 80.1%의 소거능을 나타냈다. B16F10 세포에서 세포독성 실험 결과 0.5 – 10 mg/ml 농도까지 세포독성이 거의 없었고 이후 농도의존적으로 세포 생존율이 낮아짐을 확인하였다. *A. chinensis* 껍질 추출물의 tyrosinase 저해활성 분석 결과 양성대조군인 arbutin의 경우 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 25%의 저해 활성을 보였고 추출물의 경우 1 mg/ml의 농도 47%의 tyrosinase 저해 효과를 나타내었고 melanin 생합성 저해율 측정 결과 양성대조군인 arbutin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리시 82.3%로 나타났고, *A.*

chinensis 껌질 추출물의 경우 melanin 생성량이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였으며, 1 mg/ml 농도에서 melanin 생합성 17.3%의 저해 효과를 확인 하였다. 최근 연구에 따르면 폐놀계 합성 항산화제인 BHT, BHA 등의 부작용 들이 밝혀짐에 따라 천연 자원으로부터 항산화제를 개발하려는 노력이 많이 이루어지고 있는데, 본 연구 결과 제스프리 골드키위 껌질은 우수한 항산화 및 항염 활성, 미백 기능성을 가지고 있으므로 향후 천연 항산화제로써 부가가치를 올릴수 있는 소재 및 기능성 성분 제제로써 도움이 될 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. 김경애 외, 쇠양의 항산화 및 항염증 효과 Korean J. Oriental Physiology & Pathology, 23(6):1320~1331, 2009.
2. Aniya, Y., Naito, A. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. Biochem Pharmacol 45(1):37-42, 1993.
3. 백설 외, 감송향의 *in vitro* 항산화 및 항염증 효과 Korean J. Oriental Physiology & Pathology, 23(4):853~859, 2009.
4. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol, 186: 1-85, 1990.
5. Shahidi, F. Antioxidants in food and food antioxidants. Nahrung 44(3):158-163, 2000.
6. Feng GJ 외, Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAPkinase. JImmunol. 1999 ; 163(12) : 6403-12.
7. Ohshima 외, Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. Mutat Res 305(2):253-264, 1994.
8. Posadas 외, Co-regulation between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time course of murine inflammation. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 361: 98-106.
9. Lo, A.H 외, Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappa B in mouse macrophages. Carcinogenesis, 23(6):983-991, 2002.
10. Bai 외, beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in

- lipopolysaccharide stimulated macrophages by suppressing redox-based NF- κ B activation. *Exp Mol Med*, 37(4):323–334, 2005.
11. Kamata 외, Multiple redox regulation of the cellular signaling system linked to AP-1 and NF κ B: effects of N-acetylcysteine and H₂O₂ on the receptor tyrosine kinases, the MAP kinase cascade, and I κ B kinases. *Ann N Y Acad Sci* 973:419–422, 2002.
12. Hinz 외, Cyclooxygenase-2—10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 300(2):367–375, 2002.
13. 이효승 외, 마우스 대식세포에서 혈갈(血竭)의 항산화 및 항염증 효과. *大韓本草學會誌* 23(2):179–192, 2008.
14. Shahidi, F. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung* 44(3):158–163, 2000.
15. 한영숙 외, 천연식물추출물의 항산화력과 미백작의 상관관계 연구. *대한피부미교육 학술지 제1권 제1호*.
16. Thbin D 외, The superoxide anion may mediate short but not long term effects of ultraviolet radiation on melanogenesis. *Exp Dermatol* 3:99–105, 1994.
17. EK Bernadette 외, Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid(vitamin C) and α -tocopherol(vitamin E). *J Am Acad Dermatol* 38:45–48, 1998.
18. 장혜인 외, Inhibitory effect of 4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone on Melanogenesis Kor. J. Aesthet. Cosmetol., Vol. 10 No. 4, 921–928, November 2012.
19. 문관심, 약초의 성분과 이용 일월서각, 1999.
20. Ferguson AR. Kiwifruit cultivars: Breeding and selection. *Acta Hort* 498: 43–51. 1999.
21. Kim CH 외, Selection of a large fruit line "Hwabuk 94" of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Kor J Hort Sci Technol* 17: 668. 1999.
22. Kim CH 외, A new kiwifruit cultivar, "Jecy Gold" with yellow flesh. *Kor J Breed Sci*, 39: 258–259. 2007.

23. Kim SC 외, New kiwifruit cultivar, 'Halla Gold' early harvesting with yellow flesh. Kor J Hort Sci Technol, 26: 72. 2008.
24. Kim CH 외, A new mini kiwifruit cultivar, "Green King". Kor J Breed Sci, 40 : 461–465. 2008.
25. Jeong CH 외, Chemical components and antioxidant activity of Korean gold kiwifruit. J Korean Soc Food Sci Nutr, 36:859–865. 2007.
26. Montefiori M 외, Pigments in the fruit of red-fleshed kiwifruit (*Actinidia chinensis* and *A. deliciosa*). J Agric Food Chem 53: 9526–9530. 2005.
27. Motohashi N 외, Cancer prevention and therapy with kiwi-fruit in Chinese folklore medicine: a study of kiwifruit extracts. J Ethnopharmacol 81: 357–364. 2002.
28. Manolopoulou H 외, A study of respiratory and physico-chemical changes of four kiwifruit cultivars during cool storage. Food Chem, 63: 529–534. 1998.
29. Rho JH 외, The effect of bulking agent on quality of kiwifruit powder in the process of domestic kiwifruit tenderizer. Korean J Food Sci Technol, 34: 805–810. 2002.
30. Rush EC 외, Kiwifruit promotes laxation in the elderly. Asia Pac J Clin Nutr, 11:164–168. 2002.
31. Park YS 외, In vitro studies polyphenols, antioxidant and other dietary indices in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Int J Food Sci Nutr 57: 107–122. 2006.
32. Sugiyama S 외, Enzymatic properties, substrate specificities and pH-activity profiles of two kiwifruits protease. J Nutr Sci Vitaminol, 43: 581–589. 1997.
33. Tavarini S 외, Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. Food Chem, 107: 282–288. 2008.
34. Urquiaga I 외, Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biol. Res. 33: 55–64. 2000.
35. Dai J 외, Plant phenolics: Extraction, analysis, and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15: 7313–7352. 2010.
36. Lu Y 외, Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from

- apple pomace. *Food Chem.* 68: 81–85. 2000.
37. Cha JY 외, Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of Cudrania tricuspidata. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 1310–1315. 1999.
38. Hetog MGL 외, Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juice. *J. Agr. Food Chem.* 41: 1242–1246. 1993.
39. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2: 1231–1246. 2010.
40. Heim KE 외, Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure –activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13: 572–584. 2002.
41. Williams RJ 외, Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? *Free Radic. Bio. Med.* 36: 838–849. 2004.
42. Sohn HY 외, Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of aerial part of *Saxifraga stolonifera*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 36: 195–200. 2008.
43. Ryu MJ 외, Antioxidative activities and antifungal effect against *Malassezia furfur* in the extracts from 6 spp. medicinal plants. *J. Korean Soc. Cosm.* 120–128. 2010.
44. Kim JY 외, Anti-oxidant property and inhibition of melanin synthesis of eight plant extracts *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 38: 414–419. 2010.
45. Lee SO 외, Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 233–240. 2005.
46. Hee Kee Kim 외, Effects of Naturally Occurring Flavonoids on Nitric Oxide Production in the Macrophage Cell Line RAW 264.7 and Their Structure –Activity Relationships *Biochemical Pharmacology*, Vol. 58, pp. 759 – 765, 1999.
47. Seung-Jae Lee, Purification and characterization of a nitric oxide inhibitory peptide from *Ruditapes philippinarum* *Food and Chemical Toxicology* 50 1660–1666. 2012.
48. MARSDEN S. BLOIS, Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical *Nature* 181, 1199 – 1200. 1958.
49. AOAC, 1990.

50. Mariá I, Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina Journal of Ethnopharmacology 71 109 - 114. 2000.
51. STEFAN L. MARKLUND, Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight Proc. Natl Acad. Sci. USA Vol. 79, pp. 7634-7638, 1982.
52. Mariá MARTÍNEZ-ESPARZA 외, Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-B in B16/F10 mouse melanoma cells Eur. J. Biochem. 255, 1392146. 1998.
53. Junichi Hosoi 외, Regulation of Melanin Synthesis of B16 Mouse Melanoma Cells by 1a,25Dihydroxyvitamin D3 and Retinoic Acid. CANCER RESEARCH 45,1474-1478, 1985.
54. Kim YS 외, Anti-Inflammatory Effects of Extracts from Ligustrum ovalifolium H. Leaves on RAW264.7 Macrophages J Korean Soc Food Sci Nutr 한국식품양과학회지 41(9), 1205 - 1210. 2012.
55. Seok-Yeong Yu, Antioxidant Effects and Nitrite Scavenging Ability of Extract from Acanthopanax cortex Shoot Korean J. Food & Nutr. Vol. 25. No. 4, 793-799. 2012.
56. Min ji Kim 외, Anti-inflammatory Effect of Zostera marina Ethanolic Extract on LPSinduced RAW264.7 Cells and Mouse Model Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 30(4): 182-190. 2015.
57. Yuna Lee 외, Anti-inflammatory Activity of Perilla frutescens Britton Seed in RAW 264.7 Macrophages and an Ulcerative Colitis Mouse Model KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 46, No. 1, pp. 61-67. 2014.
58. 주덕용, AntioxidativeActivitiesandTyrosinaseInhibitionActivityand of Methanol and Ethanol Extractsfrom KiwiFruits. (Actinidiedeliciosa) 2011.
59. In Hwa Jeon 외, Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Water-soluble Extracts from Different Parts of Kojongsi Persimmon (*Diospyros kaki* L.) KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 46, No. 4, pp. 505-510. 2014.
60. 김경곤 외, 청미래덩굴 잎 및 뿌리 추출물의 항산화, α -Glucosidase 억제 및

- 항염증 활성비교 Journal of Nutrition and Health (J Nutr Health) 46(4): 315 - 323. 2013.
61. 황준호 외, 감귤 과피의 폐놀성 화합물 함량과 항산화 활성 J Korean Soc Food Sci Nutr 한국식품영양과학회지 42(2), 153 - 160. 2013.
62. Kim, Ye-Jin 외, Antioxidant and Inhibitory Effects of Korean Panax ginseng Extract on Pro-inflammatory Mediators in LPS-stimulated RAW264.7 Macrophages. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition Volume 41, Issue 10, pp. 1371 - 1377. 2012.
63. Lee, Jin-Young 외, Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Fractions from Pruni persicae Flos. The Korea Journal of Herbology. Volume 21, Issue 5, pp.55 - 63. 2012.
64. Da Hye Kwon 외, Immunomodulatory Activity of Water Extract of Ulmus macrocarpa in Macrophages Journal of Life Science Vol.26. No. 1. 50-5. 2016.
65. Hana Jung 외, Antioxidant and Anti-Proliferative Activities of Rubus Fruits in Korea J Korean Soc Food Sci Nutr 한국식품영양과학회지 41(12), 1649 - 1655. 2012.
66. Min-jung Kim 외, Inhibition of Melanogenesis and Anti-UV properties Reynoutria elliptica , Kor. J. Aesthet. Cosmetol., Vol. 10 No. 4, 961-968, 2012.
67. Han-Hyuk Ki 외, Antimelanogenic Effect of Purpurogallin in Murine Melanoma Cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 한국식품영양과학회지 44(12), 1905 - 1911. 2015.
68. Sung-Won Jung 외, Screening of Tyrosinase Inhibitor from Plants. Korean J. FOOD SCI. TECHNOL Vol. 27, No. 6, pp. 891-896. 1995.
69. Soo-Yeon Lee 외, Inhibitory Efficacy of Dioscoreae Rhizoma on MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase, PKA and ERK Expression in Melanoma Cells (B16F10) 大韓本草學會誌 제30권 제4호 Kor. J. Herbol. 30(4) : 95-100. 2015.
70. Gwan Sub Sim 외, Inhibitory Effects on Melanin Production in B16 Melanoma Cells of Sedum sarmentosum. 약학회지 제 52권 제 3호 165-171. 2008.