

## 배암차즈기 효소처리 추출물의 기능성분 및 항산화 활성

김미진 · 양희선 · 김지영 · 최정숙 · 최애진\*  
농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과

### Antioxidant Activity and Functional Components of *Salvia plebeia* R. Br. Extracted by Enzyme Treatment

Mi Jin Kim, Hee Sun Yang, Ji Yeong Kim, Jeong-sook Choe, and Ae-jin Choi\*

Functional Food & Nutrition Division, National Institute of Agricultural Science (NIAS),  
Rural Development Administration (RDA)

#### Abstract

This study selected the optimal conditions for enzyme treatment that can promote the extraction of functional components from *Salvia plebeia* (SP) and confirmed solubilization characteristics, functional component contents, and applicability evaluation in pilot-scale, antioxidative, and anti-inflammatory activity. The optimal conditions of pectinase, 1%, and 2 h (P) were determined through the enzyme treatment of SP. The water-soluble index and total polyphenol content were the highest in P compared to 100°C reflux condition for 2 h (CON). Component analysis performed using liquid chromatography-mass spectrometry revealed that flavonoid contents were increased 6.6-9.5 times in the P compared to CON. There was no difference in component content when comparing the measurement lab-scale and pilot scale. CON and P indicated cytoprotective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced RAW 264.7 cells. CON and P pre-treatment also reduced the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPS-induced RAW 264.7 cells. Furthermore, P showed higher antioxidant and anti-inflammation activities than CON. These results suggested that P has a higher concentration of bioactive compounds through enzyme treatment than that obtained from CON. Thus, it can be used as a primary material for industrial utilization, such as developing functional food materials using SP.

**Keywords:** *Salvia plebeia* R. Br., enzyme, antioxidant, rosmarinic acid, anti-inflammation

#### 서 론

배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.)는 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 식물로 알려져 있으며, 우리나라 전 지역에 분포하는데 특히 산야, 길가, 개울가에서 자생하는 식물이다(Bae et al., 2007). 곱보배추, 뱀배추, 여지초, 나인초, 설건초 등의 이명을 가지며 한방에서는 전초를 한약으로도 쓰이고 있다(Kang, 2008). 배암차즈기의 효능으로는 기침, 천식, 염증 등에 효과가 있다고 알려져 있으며, 쓴 맛, 떫은 맛, 매운 맛이 강하다는 특징이 있다(Jo et al., 2010). 주요 활성 성분으로는 flavonoid와 phenol성 물질, saponin, 정유성분, 강심배당체, 불포화 sterol 등이 보고되었다(Shin et al.,

2001; Lim et al., 2007). 특히, luteolin-7-O-glucoside, nepetin, rosmarinic acid, caffeic acid, hispidulin, hispidulin-7-O-glucoside 등의 기능 성분이 알려져 있다(Jin et al., 2008). 또한 배암차즈기에 대한 생리활성 연구가 진행되고 있고 그 우수성이 알려지고 있으며 항산화 활성(Lim et al., 2007), 항염증 효과(Bae, 2016), 항알레르기 효과(Kim et al., 2014), 항균작용(Kamatou et al., 2005), 간세포 보호효과(Qu et al., 2009) 등과 관련된 다양한 선행연구 결과가 보고되어 있다.

주로 식품을 생산 및 가공하는데 사용되고 있는 수용화 기술중에서도 효소를 이용한 효소처리 형태가 있으며 이는 식물체의 가수분해 효율을 높일 수 있을 뿐만 아니라 다당류 분해 효소를 활용하면 복잡한 형태의 섬유질과 펙틴의 구조를 좀 더 용이하게 분해시킬 수 있다. 식품에 사용되고 있는 효소 중에서도 식물 세포벽 분해 효소인 pectinase, cellulase, viscozyme 및 전분 분해 효소인  $\alpha$ -amylase를 통해 추출 수율 확대 및 기능성분 용출 증진 효과를 가져올 수 있다고 하였다(Nam et al., 2018). 효소처리를 이용한 선행연구로는 효소가수분해를 통한 청자과래의 환원당 생

\*Corresponding author: Ae-jin Choi, Department of Functional Food & Nutrition Division, Agrofood Resources, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju, Jeonbuk 55365, Korea  
Tel: +82-63-238-3691; Fax: +82-63-238-3842  
E-mail: aejini77@korea.kr  
Received February 20, 2023; revised March 24, 2023; accepted May 15, 2023

산연구(Kim et al., 2015), 토마토 폐기물에 pectinase 처리를 통한 카로티노이드 추출 증진(Strati et al., 2015), 생강 추출물의 기능성분 및 항산화 효과를 증진시키기 위한 발효 및 효소 복합처리연구(Kim et al., 2022) 등이 있다. 반면에, 다양한 효능이 확인되고 있는 기능성 소재 중 하나인 배암차즈기에 효소처리를 적용하여 기능성분 용출의 극대화 연구는 거의 이뤄지지 않은 상태이다. 또한 산업체에서의 활용성을 높이기 위해 배암차즈기의 대량 추출을 통한 제품 적용성 연구도 필요하다.

따라서 본 연구에서는 배암차즈기의 기능성분 추출을 증진시키기 위해 효소처리 기술을 적용한 후 기능성분의 함량을 분석하고, 항산화 및 항염증 활성을 평가하여 기능성식품 소재 개발의 산업화를 위한 기초 자료로 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 배암차즈기는 전북 부안군 동진농장영농조합법인에서 2021년에 구입한 국내산 배암차즈기 열풍 건조 전초 및 열풍 건조 분말을  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 효소는 세포벽 분해 효소 pectinase (Pectinex Ultra SP-L), cellulase (Celluclast 1.5L FG), viscozyme (Viscozyme L)과 전분 분해 효소  $\alpha$ -amylase (Termamyl 2X)를 Novozymes (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)사에서 구입하여 사용하였다. 분석에 사용된 시약은 dinitrosalicylic acid (DNS), Folin-Ciocalteu's reagent, gallic acid, glucose, catechin, sulfuric acid, potassium persulfate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 그 외 시약 및 용매는 분석용 특급시약(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였다.

### 구연산처리 조건

구연산처리 조건 선정을 위하여 배암차즈기 분말 5 g에 구연산 분말(배암차즈기 분말 대비 0.8%, 효소 최적조건 pH 5.5 조절량과 동일)을 혼합한 후 증기 또는 압력 처리하였다. 구연산 증기처리는 구연산 분말을 가정용 찜기에서 온도  $100^{\circ}\text{C}$ , 15 min 동안 처리하였고, 구연산 압력처리는 고압멸균기(Daihan Scientific, Wonju-si, Korea)에서 온도  $100^{\circ}\text{C}$ , 압력 1 bar, 15분 동안 처리하였다. 구연산으로 전처리한 배암차즈기 분말을 효소처리에 사용하였으며 효소처리는 세포벽 분해효소 pectinase (P), cellulase (C), viscozyme (V)를 1:1:1 비율로 혼합한 혼합효소 1종으로 진행하였다. 혼합효소는 1% (기질대비)를 첨가하여  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 처리하였다. 2차 전분분해 효소인 Termamyl (T)를 동일량 첨가하여  $93^{\circ}\text{C}$ 에서 2h 동안 처리하여 구연산 증기 효소처리구(S-PCV)와 구연산 압력 효소처리구(P-PCV)를 제조하였다. 효소의 불활성화를 위해  $100^{\circ}\text{C}$ 에서

10 min 동안 가열하였다. 추출물은  $6,683\times\text{g}$ , 15 min 조건에서 원심분리(2236R, GYROZEN Co., Ltd., Gimpo-si, Korea)를 하였고 여과지(Whatman No. 4, GE Healthcare Co., Buckinghamshire, UK)로 감압여과하였다. 이 상등액을 이용하여 실험에 사용하였다. 대조구로 열수추출 처리구(CON)는 분말 5 g에 20배에 해당하는 증류수를 가한 후  $100^{\circ}\text{C}$ , 2 h 동안 냉각환류추출장치(reflux)를 이용하여 추출물을 제조하였다. 구연산 혼합 열수추출 처리구(C-CON)은 구연산을 혼합한 후 열수추출 처리구(CON)과 동일한 조건으로 제조하였고 구연산 증기 전처리구(S-CON)은 구연산을 넣고 증기 전처리 한 후 열수추출 처리구(CON)과 동일한 조건으로 제조하였다. 구연산 압력 전처리구(P-CON)은 구연산을 혼합하여 압력 전처리 한 후 열수추출 처리구(CON)과 동일한 조건으로 제조하였다.

### 효소처리 종류

효소 종류 선정을 위한 구연산처리는 전처리 조건 선정을 통해 선정된 압력처리 조건으로 진행하였다. 구연산 압력처리된 배암차즈기 미분쇄 분말 5 g에 20배에 해당하는 증류수를 가하였다. 효소는 단일 또는 혼합 처리하였으며 고압멸균기를 사용하였다. 1차 세포벽 분해 효소처리는 pectinase (P), cellulase (C), viscozyme (V), pectinase와 cellulase를 1:1로 혼합 (PC), cellulase와 viscozyme을 1:1로 혼합 (CV), pectinase와 viscozyme을 1:1로 혼합 (PV), pectinase, cellulase, viscozyme을 1:1:1로 혼합 (PCV)하여  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 2 h 동안 진행하였다. 2차 전분분해 효소처리는 T를 배암차즈기 기질의 1% (w/w) 농도로 첨가하여  $93^{\circ}\text{C}$ 에서 2 h 동안 진행하였다. 전분분해효소 처리는 기존의 Nam et al. (2018)의 선행문헌을 변형하여 2시간으로 고정하여 진행하였다. 대조구로 CON은 구연산처리 조건 선정과 동일한 방법으로 제조하여 비교하였고, 다른 대조구(CON-1)은 구연산과 효소를 첨가하지 않고 효소처리와 동일한 방법으로 처리하였다. 구연산은 첨가하고 효소는 첨가하지 않은 대조구(CON-2)도 효소처리와 동일한 방법으로 제조하여 비교하였다.

### 효소처리 시간

효소처리 시간 선정은 효소처리 종류 선정 실험에서 최적으로 선택된 P를 이용하여 진행하였다. 구연산 전처리 후 세포벽분해효소 P를 1% 첨가하여  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 1, 2, 4, 6 h 동안 처리한 다음, 전분분해효소 T를 동일량으로 첨가하여  $93^{\circ}\text{C}$ 에서 2 h 동안 처리하였다. 대조구로 CON은 구연산처리 조건 선정과 동일한 방법으로 제조하여 비교하였다.

### 효소처리 농도

효소처리 농도 선정은 효소처리 시간 선정 실험에서 최적으로 선택된 P 2시간 처리 조건을 이용하여 진행하였다.

구연산 전처리 후 세포벽분해효소 P는 0.2, 0.5, 1, 3% 농도로 첨가하여 50°C에서 2 h 동안 처리한 다음, 전분분해 효소 T를 동일량으로 첨가하여 93°C에서 2 h 동안 처리하였다. 대조구(CON)은 효소처리 시간 선정과 동일한 방법으로 제조하여 비교하였다.

**효소처리 대용량추출**

효소처리 대용량추출은 구연산, 효소처리 최적 조건으로 선정된 방법으로 진행하였다. 구연산처리는 배암차즈기 분말 3 kg에 구연산 분말(배암차즈기 분말 대비 0.8%, 24 g)을 혼합한 후 고압멸균기에서 121°C, 15 min, 1 bar 조건으로 처리하였다. 배암차즈기의 대용량 P 1% 처리구(L-P)는 200 L 반응조에 물 57 L를 넣고 예열하여 혼합물 내부 온도가 50°C에 도달하면 구연산처리된 배암차즈기 분말 3 kg을 넣고 혼합하였다. 1차 세포벽 분해 효소처리는 P를 기질 대비 1% (w/w)인 30 g을 투입 후 교반하여 50°C에서 2 h 처리하였다. 2차 전분 분해 효소처리는 T를 기질 대비 1%로 투입 및 교반하여 93°C에서 2 h 처리하였다. 효소 불활성화를 위해 100°C에서 10 min 동안 가열하였다. 각각의 추출액은 추출포(PP 부직포 재질, 60 × 70 cm, 2장)로 압착 여과하였고, 압착 여과된 추출액과 침전물은 각각 수분용해지수(WSI)와 수분흡착지수(WAI) 분석에 사용하였다. 추출과정 중 샘플링된 추출액은 6,683×g, 15 min 조건에서 원심 분리(2236R, GYROZEN Co., Ltd., Gimpo-si, Korea) 한 후 상등액은 여과지(No. 4)로 감압여과 하였다. 이 상등액을 이용하여 기능성분 함량 분석에 사용하였다. 효소처리에 대한 대조구(L-CON)은 구연산을 첨가하지 않고 동일한 분말시료 3 kg에 물 57 L를 넣고 200 L 반응조에서 100°C, 2 h 동안 교반하여 열수추출하였고, 또다른 대조구(L-CP)는 업체 관행 방법을 이용하여 앞과 동일량으로 100°C, 8 h 동안 열수추출하였다. 대조구들은 L-P와 동일한 방법으로 여과한 후 분석에 사용하였고, lab-scale을 기준으로 하여 P와 L-P의 error range를 (%)로 나타냈다.

**수분용해지수**

수분용해지수(water solubility index, WSI)는 배암차즈기 추출물을 여과한 후 상등액을 취하여 알루미늄 접시에 부은 후 침전물 무게를 측정하고, 알루미늄접시를 열풍건조기(ThermoStable OF-305, Daihan sci., Wonju-si, Korea)에서 50°C, 24 h 동안 건조한 뒤 상등액의 고형분 함량을 측정하였으며 산출식은 아래와 같다.

$$WSI (\%) = \frac{[\text{soluble solids (g)} / 5 \text{ mL}] \times \text{supematant total vol. (mL)}}{5 \text{ g}} \times 100$$

**수분흡착지수**

수분흡착지수(water absorption index, WAI)는 배암차즈

기 추출물의 상등액을 분리하고 침전물을 건조하여 그 무게를 측정한 후 다음과 같은 식으로 구하였다.

$$WAI = \frac{\text{weight of precipitate (g)}}{\text{weight of dry solids (g)}}$$

**총 폴리페놀**

총 폴리페놀(total polyphenols, TP) 함량은 Folin-Denis법(Gutfinger, 1981)을 일부 변형하여 비색 정량하였다. 배암차즈기 추출물 시료 0.1 mL에 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 2 mL를 가하여 실온에서 3 min 간 방치하였고, 50% Folin reagent 0.1 mL를 가하고 잘 혼합하여 실온에서 30 min 간 정치한 후 750 nm에서 흡광도 값을 microplate reader (Infinite 200 PRO, TECAN, Austria)를 이용하여 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid (GA)를 표준물질로 사용하여 시료와 동일한 방법으로 시험하고 얻은 표준검량 곡선으로부터 환산하여 정량하였다(gallic acid equivalent, mg GAE/g).

**총 플라보노이드**

총 플라보노이드(total flavonoids, TF) 함량은 추출액 250 µL에 증류수 1 mL와 5% NaNO<sub>2</sub> 75 µL를 넣은 후에 실온에서 5 min 간 방치하였다. 이후 10% AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 150 µL를 첨가하고 6 min 간 방치한 후 1 M NaOH 500 µL를 가하였다. 11 min 후, 510 nm에서 반응액의 흡광도 값을 microplate reader기를 사용하여 측정하였다. 표준물질로는 (+)-catechin hydrate (CE)를 이용하여 검량선을 작성하였고, 총 플라보노이드 함량은 시료 g당 mg으로 나타냈다.

**총당**

총 당(total sugar, TS)은 Dubois et al. (1956)의 phenol sulfuric acid 법을 이용하였고, 감압여과한 상등액을 50배로 희석한 후 사용하였다. 희석하여 얻은 시료 0.5 mL를 넣고 혼합한 후 sulfuric acid 2.5 mL를 가하여 발열시켰다. 이 혼합액을 실온에서 30 min 동안 방치한 후 microplate reader기를 사용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 당 정량은 glucose를 표준물질로 사용하여 표준곡선으로부터 환산하였다.

**환원당**

환원당(reducing sugar, RS)은 Miller (1959)의 DNS 방법에 의해 측정하였다. 감압여과한 상등액을 1-2배로 희석하였고, 희석된 시료 1 mL에 DNS 시약 3 mL를 넣어 혼합한 후 끓는 물에서 5 min 간 증탕한 다음 냉각하여 25 mL volumetric flask에 넣고 증류수로 정용하였다. 흡광도는 550 nm에서 측정하였으며 포도당 함량에 상당하는 값(glucose equivalent, GE, g%)으로 나타냈다.

**LC-MS 이용**

배암차즈기 추출물인 대조구(CON)와 효소처리 P 1% 처

**Table 1. Analytical conditions of UPLC for *Salvia plebeia* extract**

Items	Conditions
Column	CORTECS® UPLC® T3, 2.1 × 150 mm, 1.6 μm
Pre column	CORTECS® UPLC® T3, 2.1 × 5 mm, 1.6 μm
Mobile phase	A: 0.5% formic acid in H <sub>2</sub> O B: 0.5% formic acid in ACN
Detector	210-400 nm (representative wavelength, 350 nm for flavonoids, 320 nm for phenolic acids)
Flow rate	0.30 mL/min
Injection volume	1 μL
Column temperature	30°C
Running time	40 min
Gradient condition	0 min 5% B, 20 min 25% B, 25 min 50% B, 30 min 90% B, 32 min 90% B, 35 min 5% B, 40 min 5% B

리구(P)의 주요 기능성분들을 분석하기 위해 UPLC-DAD-QToF/MS를 사용하여 실험을 진행하였다. 분석조건으로 CORTECS® (UPLC® T3, 2.1 × 150 mm, 1.6 μm) 칼럼과 CORTECS® UPLC® T3, 2.1 × 5 mm, 1.6 μm pre 칼럼을 사용하였다. 또한 액체크로마토그래피 SCIEX ExionLC AD UPLC와 연결된 X500R QTOF-MS (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) 질량분석기를 이용하여 분석하였다. 검출 대역폭은 210-400 nm이며, 페놀산은 320 nm, 플라보노이드는 350 nm를 대역폭으로 선정하였다. 칼럼 오븐온도는 30°C, 유속은 0.3 mL/min이었다. 이동상으로는 용매 A (0.5% formic acid in H<sub>2</sub>O)와 용매 B (0.5% formic acid in ACN)을 사용하였다. 용매 구배조건은 B를 5%로 시작하여 20 min까지 25%, 25 min까지 50%, 30 min까지 90%로 증가시킨 다음 2 min 동안 유지하다가 35 min까지 5%로 다시 감소시키고 40 min까지 유지하였다. 질량분석기를 이용한 질량 패턴분석은 positive ion mode로 진행하였다. 질량 분석조건으로 capillary 전압은 3.5 kV, sampling cone 전압은 40 V로 각각 설정하였다. Ion source 온도는 120°C 및 500°C로 설정하였고, 질량 스캔 범위는 m/z 100-1200으로 설정하였다. 그 외 조건은 Table 1, 2에 나타내었으며, 개별 성분은 Flavonoid Data Base 1.0. (2016)을 참고, 각 성분의 질량 단편이온 패턴 분석 결과와 비교하여 구조 동정하였다. 또한 성분 6종을 정량 분석하기 위해 내부 표준 물질로 nepetin 100 ppm 표준품을 구매하여 시료와 1:1로

희석하여 분석을 진행하였다.

#### 세포배양 및 시료 제조

마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포(macrophage)는 한국세포주은행(KCLB; Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Waltham, MA, USA)와 1% antibiotics (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 배양하였다. 배양차즈기 열수추출물(CON)과 효소처리 P 1% 추출물(P)는 각각 동결건조한 후 phosphate buffered saline (PBS; Gibco)에 용해 시켜 세포실험에 사용하였다.

#### 세포 생존율

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 4 × 10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 접종한 뒤 24 h 배양하였다. 각 시료를 농도별로 전처리하고, 1 h 후 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 100 ng/mL LPS를 첨가하여 24 h 배양하였다. 반응 종료 후 세포 생존율은 Ez-Cytox cell viability assay kit (DAEIL Lab, Seoul, Korea)를 사용하였으며, 제조사의 지침에 따라 측정하였다. 대조군의 흡광도 값을 기준으로 상대적인 세포 생존율을 비교하였다.

#### Reactive oxygen species (ROS)

RAW 264.7 세포를 96 well black plate에 4 × 10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 접종한 뒤 24시간 배양하였다. 각 시료를 농도별로 처리하고 1 h 후 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 24 h 배양하였다. 세포는 PBS (Gibco)로 세척하고 10 μM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma) 용액을 처리하여 10분간 반응시켰다. 반응 종료 후 PBS로 세척한 세포는 형광현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) 및 fluorescence microplate reader (Tecan)로 형광도(Ex: 510 nm, Em: 560 nm)를 측정하였다. 대조군의 형광도 값을 기준으로 상대적인 ROS 생성량을 비교하였다.

**Table 2. Analytical conditions of LC-MS for *Salvia plebeia* extract**

Items	Conditions
Ion source gas (psi)	50
Curtain gas (psi)	30
Ion source temperature (°C)	500
Declustering potential (V)	80
Collision energy (V)	15±10
Spray voltage (V)	5500
CE spread (V)	10
Ionization mode	Positive
Mass range (m/z)	100-1200

항산화 효소 활성

항산화 효소 지표 효소인 SOD (superoxide dismutase), catalase를 대상으로 활성을 측정하였다. RAW 264.7 세포를 6 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well이 되도록 접종한 뒤 24 h 배양하였다. 각 시료를 농도별로 처리하고 1 h 후 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 첨가하여 24 h 배양하였다. 항산화 효소 활성은 enzyme assay kit (BioVision, San Francisco, CA, USA)를 사용하였으며, 제조사의 지침에 따라 측정하였다. SOD 활성을 평가하기 위해 세포를 lysis buffer (BioVision)로 용해한 후 효소 활성 평가를 위한 시료로 사용하였다. 96 well plate에 20 µL 시료, WST working solution 200 µL, dilution buffer 20 µL, enzyme working solution 20 µL를 넣고 37°C에서 20 min 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. catalase 활성을 평가하기 위해 세포에 assay buffer로 용해한 후 효소 활성 평가를 위한 시료로 사용하였다. 96 well plate에 60 µL 시료, assay buffer 18 µL와 catalase reaction solution 12 µL를 넣고 30 min 반응시킨 후 10 µL stop solution을 넣어 반응을 종료시켰다. 용액에 developer mix 50 µL를 넣고 10 min 동안 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군의 흡광도 값을 기준으로 상대적인 효소 활성을 비교하였다.

Nitric oxide (NO) 농도

RAW 264.7 세포를 96 well plate에  $4 \times 10^4$  cells/well이 되도록 접종한 뒤 24 h 배양하였다. 각 시료를 농도별로 처리하고 1 h 후 100 ng/mL LPS를 첨가하여 24 h 배양하였다. 반응 종료 후 상등액을 수거하여 NO 농도 측정을 위한 시료로 사용하였다. NO 농도는 Griess reagent assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 측정하였으며, 제조사의 지침에 따라 측정하였다. 일산화질소 농도는 kit에 포함된 표준용액으로부터 산출된 표준곡선과 비교하여 결정하였다.

염증성 사이토카인 농도

RAW 264.7 세포를 96 well plate에  $4 \times 10^4$  cells/well이 되도록 접종한 뒤 24 h 배양하였다. 각 시료를 농도별로 처리하고 1시간 후 100 ng/mL LPS를 첨가하여 24 h 배양하였다. 반응 종료 후 상등액을 수거하여 시료로 사용하였으며, 사이토카인 농도는 ELISA assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하였으며, 제조사의 지침에 따라 측정하였다. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 그리고 interleukin-6 (IL-6)의 농도는 kit에 포함된 표준용액으로부터 산출된 표준곡선과 비교하였다.

통계 처리

자료의 통계 분석 처리는 SPSS (Statistical package for the social science, Ver 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 시행하여 평균과 표준편차를 산출하였고, 모든 분석 결과는 3회 반복 측정하여 나타냈다. 각 시료 간 차이를 검증하기 위해 Student's t-test 또는 Duncan's multiple range test를 시행하여 유의수준 5%에서 통계적 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

구연산처리 조건

배암차즈기 추출물의 구연산처리 조건에 따른 수분용해 지수(WSI), 총 폴리페놀(TP) 및 총 플라보노이드(TF) 함량 측정 결과는 Table 3에 나타났다. WSI는 대조구로 열수추출 처리구(CON)이 27.77%, 구연산 혼합 열수추출 처리구(C-CON)이 28.32%였으며 두 대조구 간의 유의적 차이는 없었다. 증기 구연산처리(S-CON) 또는 구연산 압력처리(P-CON)를 가한 열수추출 처리구는 각각 33.12, 35.57%로

Table 3. Water solubilization and functional components content of *Salvia plebeia* extracted by pre-treatment with citric acid

Pre-treatment <sup>1)</sup>	WSI (%) <sup>2)</sup>	TP (mg GAE/g)	TF (mg CE/g)
CON	27.77±1.23 <sup>d3)4)</sup>	48.91±2.71 <sup>c</sup>	37.82±0.20 <sup>b</sup>
C-CON	28.32±0.18 <sup>d</sup>	42.61±1.49 <sup>d</sup>	39.06±1.63 <sup>b</sup>
S-CON	33.12±0.79 <sup>e</sup>	57.07±1.51 <sup>b</sup>	49.28±1.68 <sup>a</sup>
P-CON	35.57±0.31 <sup>b</sup>	58.74±0.92 <sup>ab</sup>	48.10±0.39 <sup>a</sup>
S-PCV	40.38±0.62 <sup>a</sup>	60.27±0.83 <sup>a</sup>	49.29±0.84 <sup>a</sup>
P-PCV	41.05±0.68 <sup>a</sup>	59.85±1.36 <sup>ab</sup>	48.62±1.52 <sup>a</sup>
F-value	189.030 <sup>****5)</sup>	61.238 <sup>***</sup>	47.688 <sup>***</sup>

<sup>1)</sup>CON, 100°C reflux for 2 h; C-CON, addition of citric acid 0.8%, 100°C reflux for 2 h; S-CON, pH 5.5 adjustment (addition of citric acid 0.8%, steam treated, 100°C, 15 min), 100°C reflux for 2 h; P-CON, pH 5.5 adjustment (addition of citric acid 0.8%, pressure treated, autoclave, 121°C, 15 min, 1 bar), 100°C reflux for 2 h; S-PCV, PCV 1%, 2 h → T, termamyl 1%, 2 h; PCV, pectinex + cellulase + viscozyme (1:1:1); pH 5.5 adjustment (addition of citric acid 0.8%, 100°C steam for 15 min); P-PCV, PCV 1%, 2 h → T, termamyl 1%, 2 h; PCV, pectinex + cellulase + viscozyme (1:1:1); pH 5.5 adjustment (addition of citric acid 0.8%, 121°C autoclave for 15 min).

<sup>2)</sup>WSI, water solubility index; TP, total polyphenol; TF, total flavonoid; GAE, gallic acid equivalent; CE, catechin equivalent.

<sup>3)</sup>All values are Mean±SD (n=3).

<sup>4)</sup>Means with different letters within the same column are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

<sup>5)</sup>\*\*\*\*,  $p < 0.001$ .

CON에 비해 유의적으로 증가하였다. 증기 구연산처리(S-PCV) 또는 구연산 압력처리 한 효소처리구(P-PCV)는 각각 40.38, 41.05%로 CON에 비해 약 1.5배 증가하였으며 유의적으로 가장 높은 값을 나타냈다( $p<0.001$ ). Go & Choi (2016)는 3% 농도에서 염산 처리한 쪽잎 열수추출물을 고압멸균기에서 반응시켰을 때 최대 수율을 나타냈으며 이는 가수분해되어 생성물이 증가하였다고 보고했는데 본 연구결과를 뒷받침해주는 것이라 사료된다. 이러한 결과는 배암차즈기에 구연산 전처리를 통하여 1차적으로 산분해를 진행시켰고 효소가 작용할 수 있는 최적의 환경을 극대화하여 수용화 정도가 높게 나타난 것으로 생각된다.

TP는 C-CON이 42.61 mg GAE/g이었으며 이와 비교했을 때 S-CON (57.07 mg GAE/g)이 1.3배, P-CON (58.74 mg GAE/g)이 약 1.4배 많았으며, 동일한 구연산처리를 한 효소처리구인 S-PCV, P-PCV는 약 1.5배 정도 유의적으로 높게 나타냈다( $p<0.001$ ). TF 또한 TP와 유사한 경향이었으며 C-CON이 39.06 mg CE/g이었고, 구연산 증기 구연산처리 또는 압력 구연산처리한 열수추출 처리구와 효소처리구 모두 CON (37.82 mg CE/g)에 비해 그 함량은 약 1.2배 증가하였다( $p<0.001$ ). 다양한 구조를 가진 폴리페놀계 물질들은 한 분자 내에 phenolic hydroxyl (OH)기를 2개 이상의 가진 방향족 화합물을 나타내며, 주성분은 탄닌 및 플라보노이드로 항산화, 항암, 항고혈압 등 다양한 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Yoshizawa et al., 1987). 또한 폴리페놀 불용성 화합물이 식물의 세포벽에 결합되어 있다가 효소에 의한 가수분해로 다당류들과 이온결합 또는 수소결합하여 추출이 용이한 상태변화로 인해 용출되어 함

량이 증가한 것으로 생각된다(Cinar, 2005). 이상의 결과로 볼 때 물리적 처리(증기 또는 압력) 방법에 대한 차이는 없었지만, 화학적 처리(구연산) 및 효소적 처리에 따른 WSI, TP 및 TF 함량이 증가하는 것을 확인하여 압력 구연산처리 후 효소처리를 하는 방법을 최적으로 선정하였다.

#### 효소처리 종류

배암차즈기 추출물의 효소처리 종류에 따른 수용화 특성 및 기능성분 함량 측정 결과는 Table 4에 나타났다. CON은 WSI가 32.63%였고 혼합 효소처리구인 pectinase+cellulase (PC), cellulase+viscozyme (CV), pectinase+viscozyme (PV)는 43.44-44.03% 정도로 나타났으며 유의적으로 가장 높게 나타냈다( $p<0.001$ ). 수분흡착지수는(WAI) 5.52-9.96 g/g의 범위였고 단일 효소처리구인 pectinase (P), cellulase (C), viscozyme (V)와 혼합 효소처리구인 PC, CV, PV, PCV 시료 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. P의 TP함량은 59.55 mg GAE/g으로 가장 높은 함량을 나타냈으며 CON (34.56 mg GAE/g)에 비해 1.7배 증가하였다. Shirsat et al. (2011)은 배암차즈기를 열수추출하여 총 폴리페놀산을 측정된 결과 8.569 mg/g으로 보고하였는데, 이는 본 연구 결과보다 낮은 수치였다. 페놀 화합물의 함량변화는 재배지역, 추출조건(용매, 온도, 시간) 및 기타 환경조건 등을 포함하는 여러 가지 복합적인 요인으로 인해 차이가 생기는 것이라고 추정된다(Makkar, 1999). CON의 TF는 32.32 mg CE/g으로 가장 낮았고 P에서 56.84 mg CE/g으로 유의적으로 가장 높았으며 TP와 비슷한 경향으로 나타나는 것을 확인하였다( $p<0.001$ ). 총당(TS)는 4.91-

**Table 4. Solubilization characteristics and functional components content of *Salvia plebeia* extract depending on type of enzyme treatment**

Treatment <sup>1)</sup>	WSI (%) <sup>2)</sup>	WAI (g/g)	TP (mg GAE/g)	TF (mg CE/g)	TS (%)	RS (%)
CON	32.63±1.12 <sup>d3)4)</sup>	8.07±0.64 <sup>c</sup>	34.56±2.55 <sup>f</sup>	32.32±1.56 <sup>c</sup>	5.47±1.24 <sup>c</sup>	3.46±0.29 <sup>c</sup>
CON-1	29.31±0.88 <sup>c</sup>	9.10±0.82 <sup>b</sup>	39.83±0.50 <sup>d</sup>	37.65±1.38 <sup>d</sup>	4.91±0.66 <sup>c</sup>	5.36±0.29 <sup>b</sup>
CON-2	28.56±0.27 <sup>c</sup>	9.96±0.04 <sup>a</sup>	37.08±1.56 <sup>c</sup>	35.87±0.86 <sup>d</sup>	5.55±0.49 <sup>c</sup>	5.29±0.37 <sup>b</sup>
P	41.68±0.26 <sup>b</sup>	5.53±0.26 <sup>c</sup>	59.55±1.14 <sup>ab</sup>	56.84±1.01 <sup>a</sup>	10.42±0.46 <sup>b</sup>	6.61±0.07 <sup>a</sup>
C	39.20±0.24 <sup>c</sup>	6.05±0.09 <sup>dc</sup>	57.32±0.79 <sup>b</sup>	53.32±1.37 <sup>b</sup>	10.41±0.26 <sup>b</sup>	3.52±0.17 <sup>c</sup>
V	40.95±0.36 <sup>b</sup>	6.06±0.31 <sup>dc</sup>	54.06±0.39 <sup>c</sup>	49.39±0.85 <sup>c</sup>	10.97±0.17 <sup>ab</sup>	6.87±0.37 <sup>a</sup>
PC	43.76±0.06 <sup>a</sup>	5.52±0.31 <sup>c</sup>	58.63±1.28 <sup>ab</sup>	52.93±0.27 <sup>b</sup>	11.45±0.06 <sup>ab</sup>	6.51±0.16 <sup>a</sup>
CV	44.03±0.90 <sup>a</sup>	5.76±0.06 <sup>dc</sup>	57.73±0.05 <sup>ab</sup>	52.33±0.32 <sup>b</sup>	11.70±0.49 <sup>a</sup>	6.60±0.23 <sup>a</sup>
PV	43.44±0.26 <sup>a</sup>	6.00±0.30 <sup>dc</sup>	54.98±0.71 <sup>c</sup>	49.30±0.85 <sup>c</sup>	10.76±0.23 <sup>ab</sup>	6.76±0.20 <sup>a</sup>
PCV	41.05±0.68 <sup>b</sup>	6.38±0.10 <sup>d</sup>	59.85±1.36 <sup>a</sup>	48.62±1.52 <sup>c</sup>	10.99±0.32 <sup>ab</sup>	6.40±0.52 <sup>a</sup>
F-value	292.540 <sup>***5)</sup>	53.313 <sup>***</sup>	190.636 <sup>***</sup>	153.339 <sup>***</sup>	67.552 <sup>***</sup>	59.418 <sup>***</sup>

<sup>1)</sup>CON, 100°C reflux for 2 h; CON-1, Non added citric acid, 50°C autoclave for 2 h → 93°C autoclave for 2 h; CON-2: addition of citric acid 0.8% (pH 5.5 adjustment), 50°C autoclave for 2 h → 93°C autoclave for 2 h; P, Addition of citric acid 0.8%, 121°C autoclave for 15 min → P, pectinase, C, cellulase, V, viscozyme, PC, pectinase + cellulase (1:1), CV, cellulase + viscozyme (1:1), PV, pectinase + viscozyme (1:1); PCV, pectinase + cellulase + viscozyme (1:1:1) 1%, 50°C for 2 h → termamyl 1%, 93°C for 2 h.

<sup>2)</sup>WSI, water solubility index; WAI, water absorption index; TP, total polyphenol; TF, total flavonoid; TS, total sugar; RS, reducing sugar; GAE, gallic acid equivalent; CE, catechin equivalent.

<sup>3)</sup>All values are Mean±SD (n=3).

<sup>4)</sup>Means with different letters within the same column are significantly different from each other at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

<sup>5)</sup>\*\*\*,  $p<0.001$ .

11.70%의 범위였으며 CV가 11.70%로 가장 많은 함량을 보였고, 환원당(RS)는 P (6.61%), V (6.87%), PC (6.51%), CV (6.60%), PV (6.76%), PCV (6.40%)가 가장 높게 나타났다. 짬잎채소 연구에서 75% 에탄올로 추출한 배암차즈기의 총당 함량은 10.78%라고 보고하였으며 이는 본 연구 결과와 유사한 결과였다(Park et al., 2012). 이는 시료를 추출할 때 식물체의 복잡한 내부 및 세포벽 구조(셀룰로오스, 펙틴 등)로 인해 용매만으로는 모든 기능성 화합물들의 유용성분을 용출하기 어렵기 때문에 물리적·화학적 또는 효소처리 등의 처리과정을 통해 좀 더 효과적으로 추출한 것으로 판단된다(Nam et al., 2019). 이러한 결과로 효소처리에 적합한 효소종류로는 TP와 TF 함량이 가장 높은 Pectinex Ultra SP-L (P) 펙틴분해효소로 결정하였다.

효소처리 시간

배암차즈기 추출물의 효소처리 시간에 따른 수용화 특성 및 기능성분 함량 측정 결과는 Table 5에 나타났다. WSI는 CON이 32.63%로 가장 낮았고 P 2 h 처리구에서 41.68%로 CON에 비해 약 1.3배 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다( $p < 0.001$ ). 이러한 결과로 P 2 h 처리시, 고품분의 수용화 및 분해에 더 효과적인 것으로 확인되었다. Kim et al. (2015)는 청과래의 효소가수분해 연구에서 반응 시간에 따른 수율을 조사했는데 반응 6~36 h까지 수율이 증가하다가 48 h에서 감소했다고 보고하여, 본 연구에서도 일정시간 이후인 P 2 h 처리 이후부터는 WSI가 감소하는 것으로 나타나 본 실험결과와 유사한 경향이였다. WAI는 P 2 h 처리구에서 5.53 g/g으로 가장 낮게 나타나 다당류가 가장 많이 분해된 것으로 판단되었다. TP는 34.56-59.55 mg GAE/g 범위였으며 처리시간이 길어질수록 증가하다가 감소하는 경향을 보였는데 P 2 h 처리구에서 59.55 mg GAE/g으로 유의적으로 가장 높은 함량을 나타냈다( $p < 0.001$ ). TF 또한 TP와 유사한 경향이였으며 P 2 h 처리구에서 56.84 mg CE/g으로 가장 높은 함량이였고 2 h 이

후로는 함량값이 감소하는 경향으로 나타났다. 총당은 5.47-10.98%, 환원당은 3.46-9.35% 범위였고 모두 P 6 h 처리구에서 각각 10.98, 9.35% 함량으로 가장 높게 나타났다. 총당은 1, 2, 4 h 처리구간의 유의적인 차이는 없었고 환원당은 처리시간이 길어질수록 그 함량 값도 증가하는 경향으로 나타났다. Yan et al. (1998)은 식물체 세포벽을 분해하는 효소인 polygalacturonase와 글루코시드 결합의 가수분해를 촉매하는 효소인  $\beta$ -glucoside 등의 효소작용을 보고하였다. 이러한 결과는 다양한 식물체 유형에 적절한 효소를 처리했을때 식물체의 가수분해 효율을 증대시킬 수 있는 요소라고 생각된다. 결과적으로 효소처리 최적시간은 TP 및 TF 함량이 가장 높게 나타난 P 2 h 처리로 선정하였다.

효소처리 농도

배암차즈기 추출물의 효소처리 농도에 따른 수용화 특성 및 기능성분 함량 측정 결과는 Table 6에 나타났다. WSI는 P 1% 처리구에서 41.68%로 유의적으로 가장 높았으며, CON (32.63%)에 비해 약 1.3배 증가하였다( $p < 0.001$ ). WAI는 5.53-8.07 g/g 범위였고, P 1% 처리구에서 5.53 g/g으로 가장 낮게 나타났다. WSI는 다당류가 가수분해되어 수용화된 정도를 나타내는 것이며 WAI는 물리적인 효소처리에 의해서도 분해가 덜 일어나고 남은 고품분의 수분 흡수량을 의미하는 것으로 WSI와 WAI의 결과는 서로 역의 상관관계에 있다. TP는 P 1% 처리구가 59.55 mg GAE/g으로 가장 높게 나타났으며 CON (34.56 mg GAE/g)에 비해 약 1.7배 증가한 것을 확인하였다. TF도 TP와 유사한 경향을 보였는데 CON이 32.32 mg CE/g으로 가장 낮았고 P 1% 처리구에서 56.84 mg CE/g으로 유의적으로 가장 높았다( $p < 0.001$ ). 동결건조한 배암차즈기 물 추출물을 연구한 선행연구에서 TF 함량을 38.7 mg/g이라고 하였으며, 본 연구의 P 1% 처리구의 함량값이 더 높게 나타났다(Jeong et al., 2015). 결과적으로 같은 물추출물인데 반해 본 연구의

**Table 5. Solubilization characteristics and functional components content of *Salvia plebeia* extract depending on time of enzyme treatment**

Treatment <sup>1)</sup>	WSI (%) <sup>2)</sup>	WAI (g/g)	TP (mg GAE/g)	TF (mg CE/g)	TS (%)	RS (%)	
CON	32.63±1.12 <sup>c3)4)</sup>	8.07±0.64 <sup>a</sup>	34.56±2.55 <sup>d</sup>	32.32±1.56 <sup>d</sup>	5.47±1.24 <sup>b</sup>	3.46±0.29 <sup>c</sup>	
P	1	39.69±0.33 <sup>b</sup>	5.74±0.03 <sup>b</sup>	56.29±0.56 <sup>b</sup>	52.43±0.26 <sup>b</sup>	10.33±0.31 <sup>a</sup>	7.28±0.08 <sup>c</sup>
	2	41.68±0.26 <sup>a</sup>	5.53±0.26 <sup>b</sup>	59.55±1.14 <sup>a</sup>	56.84±1.01 <sup>a</sup>	10.42±0.46 <sup>d</sup>	6.61±0.07 <sup>d</sup>
	4	39.26±0.31 <sup>b</sup>	6.03±0.05 <sup>b</sup>	54.22±0.43 <sup>bc</sup>	49.33±0.91 <sup>c</sup>	10.47±0.02 <sup>a</sup>	8.41±0.06 <sup>b</sup>
	6	40.03±0.23 <sup>b</sup>	5.96±0.07 <sup>b</sup>	53.73±0.86 <sup>c</sup>	48.71±0.59 <sup>c</sup>	10.98±0.19 <sup>a</sup>	9.35±0.28 <sup>a</sup>
F-value	116.331 <sup>***5)</sup>	32.681 <sup>***</sup>	164.191 <sup>***</sup>	251.449 <sup>***</sup>	41.609 <sup>***</sup>	392.804 <sup>***</sup>	

<sup>1)</sup>CON, 100°C reflux for 2 h; P, addition of citric acid 0.8%, 121°C autoclave for 15 min → P, pectinex 1%, 50°C autoclave for 1, 2, 4, 6 h → T, termamy 1%, 93°C autoclave for 2 h.

<sup>2)</sup>Abbreviations are the same as in Table 4.

<sup>3)</sup>All values are Mean±SD (n=3).

<sup>4)</sup>Means with different letters within the same column are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

<sup>5)</sup>\*\*\*,  $p < 0.001$ .

**Table 6. Solubilization characteristics and functional components content of *Salvia plebeia* depending on concentration of enzyme treatment**

Treatment <sup>1)</sup>	WSI (%) <sup>2)</sup>	WAI (g/g)	TP (mg GAE/g)	TF (mg CE/g)	TS (%)	RS (%)	
CON	32.63±1.12 <sup>d34)</sup>	8.07±0.64 <sup>a</sup>	34.56±2.55 <sup>d</sup>	32.32±1.56 <sup>d</sup>	5.47±1.24 <sup>b</sup>	3.46±0.29 <sup>d</sup>	
P	0.2	37.46±0.37 <sup>c</sup>	5.88±0.08 <sup>b</sup>	57.05±1.86 <sup>ab</sup>	51.75±0.52 <sup>b</sup>	9.54±0.08 <sup>a</sup>	4.76±0.09 <sup>c</sup>
	0.5	38.46±0.25 <sup>c</sup>	5.84±0.12 <sup>b</sup>	54.28±0.68 <sup>bc</sup>	50.66±0.18 <sup>b</sup>	9.94±0.04 <sup>a</sup>	6.61±0.07 <sup>b</sup>
	1	41.68±0.26 <sup>a</sup>	5.53±0.26 <sup>b</sup>	59.55±1.14 <sup>a</sup>	56.84±1.01 <sup>a</sup>	10.42±0.46 <sup>a</sup>	6.61±0.07 <sup>b</sup>
	3	40.42±0.23 <sup>b</sup>	5.95±0.12 <sup>b</sup>	51.35±0.53 <sup>c</sup>	47.67±0.23 <sup>c</sup>	10.67±0.15 <sup>a</sup>	8.89±0.18 <sup>a</sup>
F-value	116.483 <sup>***5)</sup>	31.155 <sup>***</sup>	108.242 <sup>***</sup>	301.174 <sup>***</sup>	38.404 <sup>***</sup>	475.420 <sup>***</sup>	

<sup>1)</sup>CON, 100°C reflux for 2 h; P, addition of citric acid 0.8%, 121°C autoclave for 15 min → P, pectinex 0.2, 0.5, 1, 3%, 50°C autoclave for 2 h → T, termamyl 1%, 93°C autoclave for 2 h.

<sup>2)</sup>Abbreviations are the same as in Table 4.

<sup>3)</sup>All values are Mean±SD (n=3).

<sup>4)</sup>Means with different letters within the same column are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

<sup>5)</sup>\*\*\*,  $p < 0.001$ .

TF 값이 더 높게 측정된 것은 시료의 처리 방법에 의한 것으로 생각되며 효소처리를 통해 플라보노이드 함량이 증대된 것으로 판단된다. Nam et al. (2020)의 연구에서 생강의 열수추출물에 비해 효소처리 추출액이 TP, TF 함량이 높았다고 보고하였는데, 이는 본 연구와 유사한 결과를 나타냈다. 이는 배암차즈기에서도 효소처리 농도를 1% 첨가하여 반응시켰을 때 가장 높은 함량을 보였으며 소재는 다르지만 동일한 효소 및 첨가농도를 사용하였을 때, 기능성분을 수용화시키는 방법으로 효과적임을 확인할 수 있었다. TS는 효소첨가량이 증가할수록 그 값도 증가하는 경향을 나타냈는데 P 3% 처리구가 10.67%로 가장 많은 함량을 나타냈다. RS도 TS와 비슷한 경향으로 나타났고 3.46-8.89% 범위를 보였는데 P 3% 처리구에서 8.89%로 가장 높게 나타났다. Song et al. (2011)은 열처리한 톳의 효소가수분해 연구에서 반응 24 h, 기질농도 1%인 경우 효소량이 증가할수록 환원당 함량도 증가한다고 보고하였는데

본 연구결과와 유사한 경향을 나타냈다. 이는 구연산처리 및 효소에 의해 침투가 용이해진 세포벽에 효소가 깊숙하게 작용하여 반응한 결과라고 생각된다. 효소처리 추출물의 생산 단가 등의 경제적인 면(효소 2만원/100 g)을 고려하여 적정 효소처리 농도는 TP 및 TF 함량값이 더 높게 나타난 P 1% 처리구(P)로 선정하였다.

#### LC-MS

배암차즈기 추출물 CON과 P 처리구의 LC-QToF/MS 분석으로부터 얻은 chromatogram과 fragmentation ion pattern을 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. Flavonoid Data Base 1.0. (2016)을 토대로 최종 6종의 성분을 동정하였으며, 5종의 플라보노이드와 1종의 페놀산 성분으로 규명하였다. 구조 동정된 화합물은 순서대로 6-hydroxyluteolin 7-O-glucoside, luteolin 5-O-glucoside (galuteolin), luteolin 7-O-glucoside (cynaroside), nepetin 7-O-glucoside (nepitrin),

**Table 7. Mass fragmentation ions of 6 kinds of compounds in *Salvia plebeia* extract**

Peak	Compound names	Formula	Rt (min) <sup>1)</sup>	MW <sup>2)</sup>	Fragment ions [M+H] <sup>+</sup>
1	6-Hydroxyluteolin 7-O-glucoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	15.45	464	303.0502 [M+H-Glucoside] <sup>+</sup> , 465.1032 [M+H] <sup>+</sup>
2	Luteolin 5-O-glucoside (galuteolin)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	17.60	448	287.0549 [M+H-Glucoside] <sup>+</sup> , 449.1078 [M+H] <sup>+</sup>
3	Luteolin 7-O-glucoside (cynaroside)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	17.78	448	287.0551 [M+H-Glucoside] <sup>+</sup> , 449.1083 [M+H] <sup>+</sup>
4	Nepetin 7-O-glucoside (nepitrin)	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	18.84	478	317.0652 [M+H-Glucoside] <sup>+</sup> , 479.1179 [M+H] <sup>+</sup>
5	Hispidulin 7-O-glucoside (Homoplantagin)	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	21.00	462	301.0700 [M+H-Glucoside] <sup>+</sup> , 463.1224 [M+H] <sup>+</sup>
6	Rosmarinic acid	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	21.50	360	117.0333 [Caffeic acid+H-2H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup> , 145.0283 [Caffeic acid+H-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 163.0386 [Caffeic acid+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 343.0814 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> , 361.0921 [M+H] <sup>+</sup>

<sup>1)</sup>Rt, retention time

<sup>2)</sup>MW, molecular weight



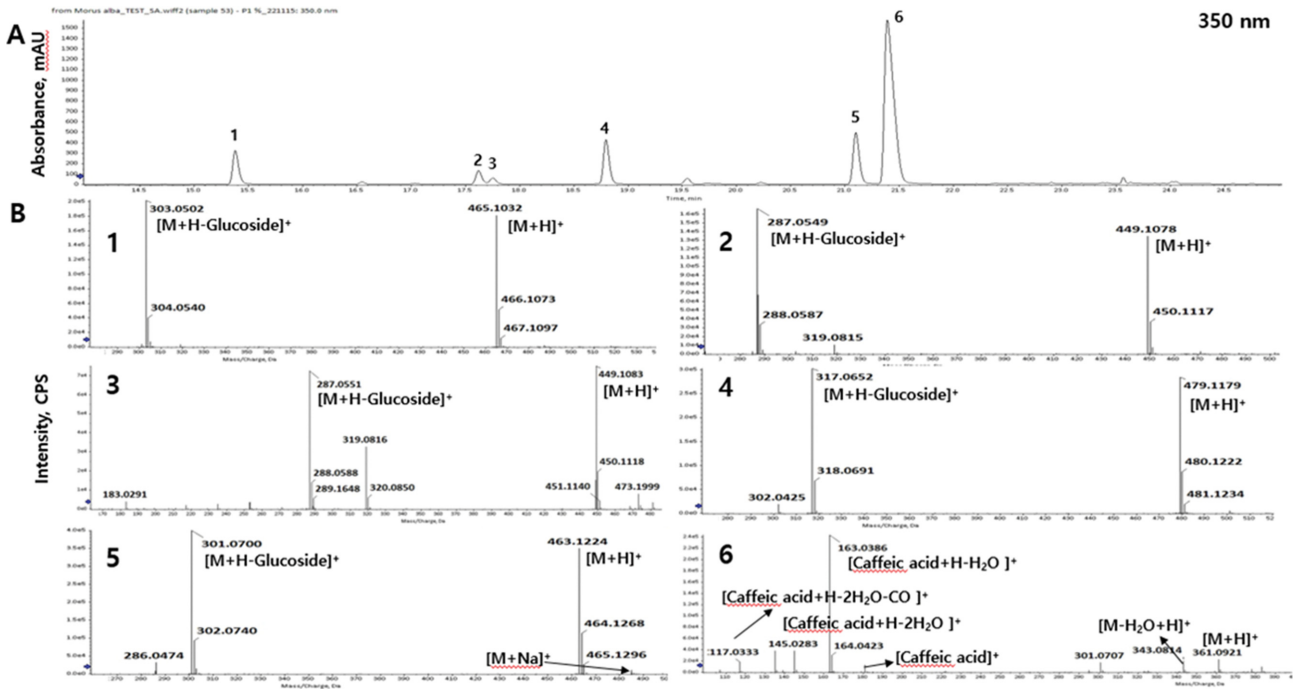


Fig. 1. (A) LC Chromatogram and (B) positive ion mode MS spectra of 1-6 compound from *Salvia plebeia* extract. 1, 6-hydroxyluteolin 7-O-glucoside; 2, luteolin 5-O-glucoside; 3, luteolin 7-O-glucoside; 4, nepetin 7-O-glucoside; 5, hispidulin 7-O-glucoside; 6, rosmarinic acid; A, P, addition of citric acid 0.8%, 121°C autoclave for 15 min → P, pectinex 1%, 50°C autoclave for 2 h → T, termamyl 1%, 93°C autoclave for 2 h LC chromatogram; B, Positive ion mode MS spectra of 1 to 6 components.

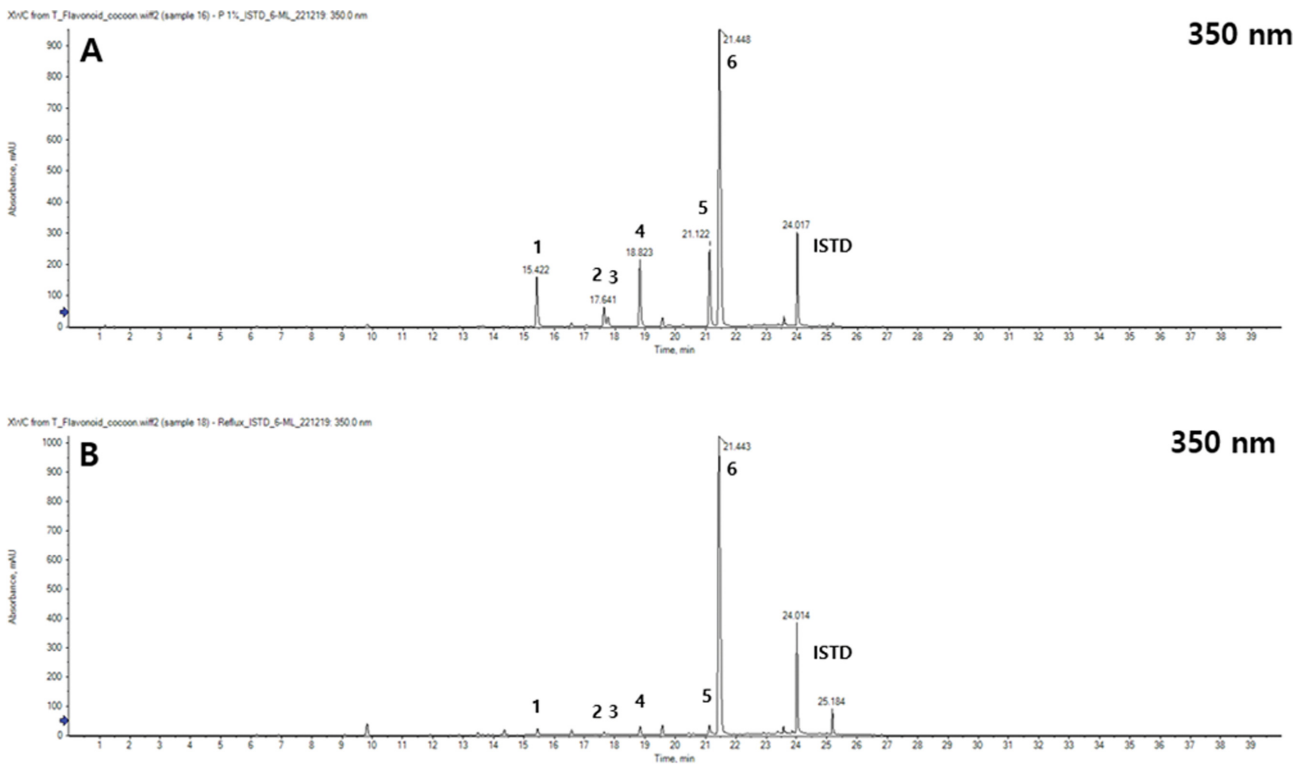


Fig. 2. Comparison of LC chromatograms of (A) P, (B) CON from *Salvia plebeia* extract. 1, 6-hydroxyluteolin 7-O-glucoside; 2, luteolin 5-O-glucoside; 3, luteolin 7-O-glucoside; 4, nepetin 7-O-glucoside; 5, hispidulin 7-O-glucoside; 6, rosmarinic acid; ISTD, internal standard, nepetin; P, addition of citric acid 0.8%, 121°C autoclave for 15 min → P, pectinex 1%, 50°C autoclave for 2 h → T, termamyl 1%, 93°C autoclave for 2 h; CON, 100°C reflux for 2 h.

**Table 8. Quantitative analysis and functional components content in *Salvia plebeia* extract (mg/100 g)**

Compound names	CON <sup>1)</sup>	P	F-value
6-Hydroxyluteolin 7-O-glucoside	6.29±0.03	49.38±1.25	15.305 <sup>***2)3)</sup>
Luteolin 5-O-glucoside (galuteolin)	2.97±0.02	19.72±0.33	14.285 <sup>***</sup>
Luteolin 7-O-glucoside (cynaroside)	1.59±0.01	10.88±0.12	4.571 <sup>***</sup>
Nepetin 7-O-glucoside (nepitrin)	7.72±0.02	63.91±0.49	13.250 <sup>***</sup>
Hispidulin 7-O-glucoside (Homoplantagin)	8.29±0.04	79.06±0.26	10.906 <sup>***</sup>
Rosmarinic acid	618.20±1.85	672.91±0.81	3.819 <sup>***</sup>

<sup>1)</sup>Abbreviations are the same as in Table 4.

<sup>2)</sup>All values are Mean±SD (n=3).

<sup>3)</sup>\*\*\*,  $p < 0.001$ .

**Table 9. Solubilization characteristics and functional components content of *Salvia plebeia* extract by pilot scale**

Treatment <sup>1)</sup>	WSI (%) <sup>2)</sup>	WAI (g/g)	TP (mg GAE/g)	TF (mg CE/g)	TS (%)	RS (%)
L-CON	33.83±0.11 <sup>b3)4)</sup>	3.85±0.02 <sup>b</sup>	72.71±0.82 <sup>b</sup>	53.34±0.37 <sup>b</sup>	7.69±0.05 <sup>b</sup>	3.18±0.01 <sup>b</sup>
L-P	52.89±0.12 <sup>a</sup>	2.33±0.10 <sup>c</sup>	85.58±1.42 <sup>a</sup>	68.78±0.56 <sup>a</sup>	13.65±0.24 <sup>a</sup>	5.11±0.01 <sup>a</sup>
L-CP	32.58±0.06 <sup>c</sup>	4.66±0.03 <sup>a</sup>	58.28±0.62 <sup>c</sup>	47.39±0.33 <sup>c</sup>	7.10±0.02 <sup>c</sup>	3.06±0.03 <sup>c</sup>
F-value	39547.414 <sup>***5)</sup>	1206.329 <sup>***</sup>	547.117 <sup>***</sup>	1949.603 <sup>***</sup>	2609.874 <sup>***</sup>	9488.998 <sup>***</sup>

<sup>1)</sup>L-CON, 100°C for 2 h; L-P, Addition of citric acid 0.8%, 121°C autoclave for 15 min; P, pectinex; pectinex 1%, 50°C autoclave for 2 h → T, termamyl; termamyl 1%, 93°C autoclave for 2 h; L-CP, 100°C for 8 h.

<sup>2)</sup>Abbreviations are the same as in Table 4.

<sup>3)</sup>All values are Mean±SD (n=3).

<sup>4)</sup>Means with different letters within the same column are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

<sup>5)</sup>\*\*\*,  $p < 0.001$ .

hispidulin 7-O-glucoside (homoplantagin), rosmarinic acid 임을 확인하였다(Table 7). 또한 CON과 P 처리구의 크로마토그램을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 성분 6종을 정량 분석하기 위해 내부 표준물질로 nepetin을 샘플에 넣고 함께 분석하였는데 24 min대에 나타난 peak는 nepetin을 의미한다. 정량 분석 결과는 Table 8에 나타냈으며 6-hydroxyluteolin 7-O-glucoside, luteolin 5-O-glucoside (galuteolin), luteolin 7-O-glucoside (cynaroside), nepetin 7-O-glucoside (nepitrin), hispidulin 7-O-glucoside (homoplantagin) 5종의 플라보노이드 성분 및 rosmarinic acid 1종의 페놀산 성분 모두 CON보다 P 처리구에서 높은 함량을 나타내었다. 특히 플라보노이드 성분들은 CON 대비 P 처리구가 6.6-9.5배까지 증진되는 효과를 확인하였다. Kil et al. (2020)은 열수추출한 배암차즈기를 성분분석한 결과 rosmarinic acid가 전체 peak면적의 70%를 차지하고 있으며 가장 많은 양을 함유한다고 보고하였는데, 본 연구에서도 6가지 기능성분들 중에서 rosmarinic acid의 함량분포가 가장 많은 것으로 나타나고 있어 본 연구의 분석결과를 뒷받침해주었다. 효소처리를 함으로써 CON에 대비하여 5종류의 플라보노이드는 약 7.7배 증가하는 것으로 나타나 결과값이 높아진 것으로 사료된다.

#### 효소처리 대용량추출

배암차즈기 효소처리 대용량 추출물의 수용화 특성 및 기능성분 함량 측정 결과는 Table 9에 나타냈다. WSI는

대용량 대조구 L-CON (33.83%)에 비해 대용량 P 1% 처리구(L-P)가 52.89%로 약 1.6배 증가하였으며 유의적으로 가장 높았고, WAI는 L-P에서 2.33 g/g으로 가장 낮게 나타났다( $p < 0.001$ ). TP 및 TF는 L-P 처리구에서 각각 85.58 mg GAE/g, 68.78 mg CE/g이었으며 유의적으로 가장 높았고 L-CON은 각각 72.71 mg GAE/g, 53.34 mg CE/g으로 이에 비해 약 1.2, 1.3배 증가하였는데 효소처리를 함으로써 항산화 성분 함량 용출에 효과적임을 확인할 수 있었다. Shin et al. (2020)의 연구에 의하면 배암차즈기 열수추출물의 TP와 TF 함량은 각각 99.10 mg/g, 48.71 mg/g으로 나타나 본 연구결과와 L-P 처리구와 유사한 값을 확인하였다. 총당은 업체 관행 처리구(L-CP) 7.10%, L-CON 7.69%, L-P 13.65%의 순이었으며 L-P가 L-CON에 비해 약 1.8배 유의적으로 더 높게 나타났다( $p < 0.001$ ). Jeong et al. (2014)는 열풍건조한 배암차즈기 열수추출물의 총당 함량이 7.19%라고 보고하였으며 본 연구의 효소처리한 L-P의 값이 더 높게 나타났다. 이는 효소작용에 의한 당류의 분해로 단당류가 증가하여 총당 함량이 증대된 것으로 생각된다. 환원당은 L-P 처리구가 5.11%로 가장 높았는데 효소처리를 통한 효소적 분해가 진행되었고 이로 인해 포도당, 과당 등의 단당류와 이당류의 당분해가 많이 일어나 배암차즈기의 환원당 함량이 증가한 것으로 추정된다(Lee et al., 2012). 최종 선정된 P 처리구의 처리방법이 대용량으로 적용되었을 때도 기능성분 함량이 증가하는 경향으로 확인되어 산업체에서도 대용량 처리의 적용 및 활용할 수 있을 것으로

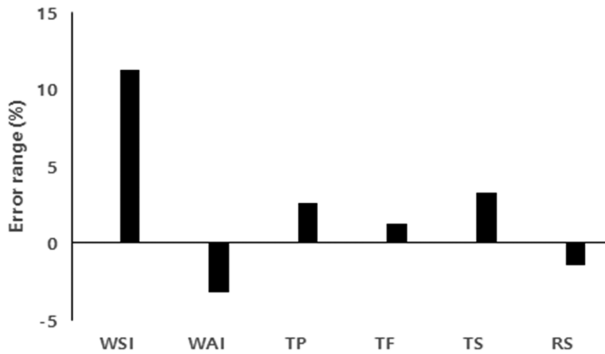


Fig. 3. Comparison of error range depending on different extraction capacity of *Salvia plebeia* extract. Abbreviations are the same as in Table 4. Express error range (L-P) in preparation for lab-scale (P) standards.

판단된다. 이를 뒷받침하기 위해 효소처리의 최적으로 선정된 P 처리구를 lab-scale과 pilot scale에서 연구된 범위의 P와 L-P 처리구간 처리 용량에 대한 차이를 비교하여 Fig. 3에 나타냈다. 대용량 추출 용량에 대해 P와 L-P 처리구의 차이점을 나타냈는데, 이는 lab-scale에서 사용하는 교반기와 pilot scale에서 사용하는 대용량 반응조의 크기, 교반기의 표면적에 닿는 power, speed 등에 의한 차이인 것으로 생각된다(Marques et al., 2010). 또한 시료를 효소처리 했을 때 용량 차이에 따라 효소활성의 최적 반응시간까지 도달하는데 서로 다른 시간적 영향도 있을 것으로 판단된다(Tufvesson et al., 2010). 이상의 결과로 효소처리를 진행하기 전 구연산처리 과정을 통해 배암차즈기의 세포벽 성분을 기능성분이 용출되고 효소작용이 용이하도록 1단계에서 산분해 한 다음, 다음 과정인 효소처리 단계를 통하여 다당류를 분해하여 기능성분의 수용화를 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

대식세포 생존율에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 CON과 P 처리구의 세포 내 항산화 및 항염증 활성을 평가하기 위한 농도를 설정하기 위해 RAW 264.7 세포의 증식에 미치는 CON과 P 처리구의 세포 생존율을 확인하였다. 다양한 농도(0-800 µg/mL)의 CON과 P가 처리된 조건에서 24시간 동안 반응한 RAW 264.7 세포 생존율의 결과는 Fig. 4와 같다. 대조군의 세포 생존율 100%와 비교하였을 때, CON과 P 처리구는 800 µg/mL 농도까지 대조군과 유사한 수준으로 생존율이 유지되었으며, 그룹 간 유의적인 차이는 없었다. 이에 대식세포 내 항산화 및 항염증 활성을 평가하기 위한 CON과 P 처리구의 최고 농도는 800 µg/mL로 선정하였다. 또한 선행연구들을 토대로 RAW 264.7 세포에 염증성 자극원으로는 1 µg/mL LPS를(Kim et al., 2021), 산화적 스트레스 자극원으로는 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를(Kwon et al., 2019) 각각 처리하여 배암차즈기 추출물의 활성을 평가하고자 하였다.

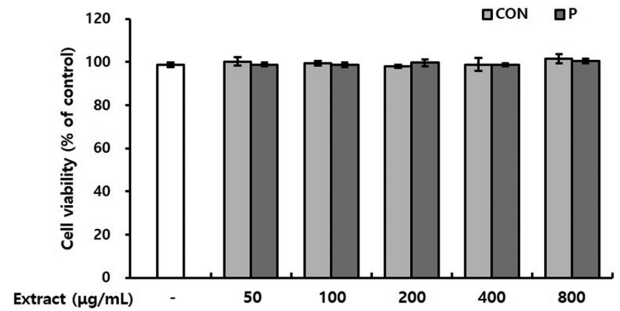
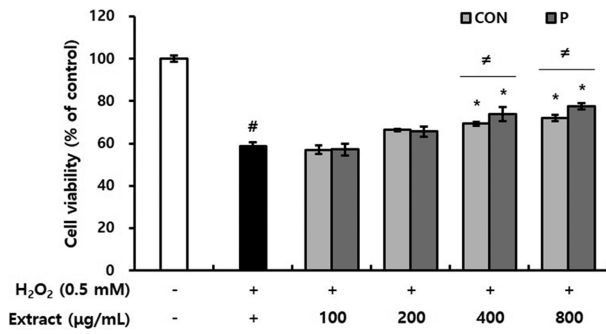


Fig. 4. Effects of CON and P on viability of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with CON and P at various concentrations for 24 h. Cell viability was tested using EZ-cytox cell viability assay. Data are presented as the mean±SD of three independent experiments. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

산화 자극에 대한 대식세포 보호 활성

과량의 활성산소종(ROS; reactive oxygen species) 생산으로 유도되는 산화적 스트레스는 세포를 손상시키고 조직에 비가역적인 변화를 유도하는데, 반응성이 큰 ROS 중 하나인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>도 다양한 세포와 조직의 손상 및 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다(Simon et al., 2000). 이에 본 연구에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 RAW 264.7 세포에 산화적 스트레스를 유도한 후 CON과 P 처리구의 세포 보호 활성을 평가하고자 하였다. CON과 P 처리구를 1 h 전처리하고 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 24 h 후 세포 생존율을 확인한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군은 대조군과 비교하여 세포 생존율이 59%로 감소하였으나 CON과 P 처리구를 전처리한 실험군에서는 세포 생존율이 증가하였다. 특히, 800 µg/mL의 농도로 RAW 264.7 세포에 전처리했을 때, CON은 71%로, P 처리구는 77%로 크게 생존율이 증가하여 CON과 P 처리구가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 세포 손상을 억제할 수 있다고 판단되었다. Meng et al. (2022)의 연구에서 배암차즈기의 주요 플라보노이드 배당체인 dihydrohomoplantagin과 homoplantagin이 산화 저밀도지단백질(ox-LDL)에 의해 유도된 제대정맥 내피세포의 산화적 손상 및 사멸을 억제하는 것으로 보고하였다. 또한 Kim et al. (2023)은 배암차즈기 에탄올 추출물 및 배암차즈기 주요 화합물인 rosmarinic acid가 dexamethasone에 의해 유도된 근육모세포의 산화적 손상을 억제한다고 보고하였다. 이상의 결과들로 보아, CON과 P 처리구의 대식세포 보호 활성은 배암차즈기에 함유된 플라보노이드 및 페놀산에 의한 활성으로 판단되었다. 또한 CON과 P 처리구의 활성을 비교하였을 때, 400 µg/mL 이상의 농도로 전처리 시 P 처리구가 CON보다 유의적으로 높은 대식세포 보호 활성을 나타냈다(Fig. 5). 이는 배암차즈기를 효소 처리했을 때 플라보노이드 및 페놀산 함량이 증가한 결과와 일치하는 것으로, 효소 처리로 기능성분의 용출이 증대된 배암차즈기 효소처리구는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스로부터 대식세포



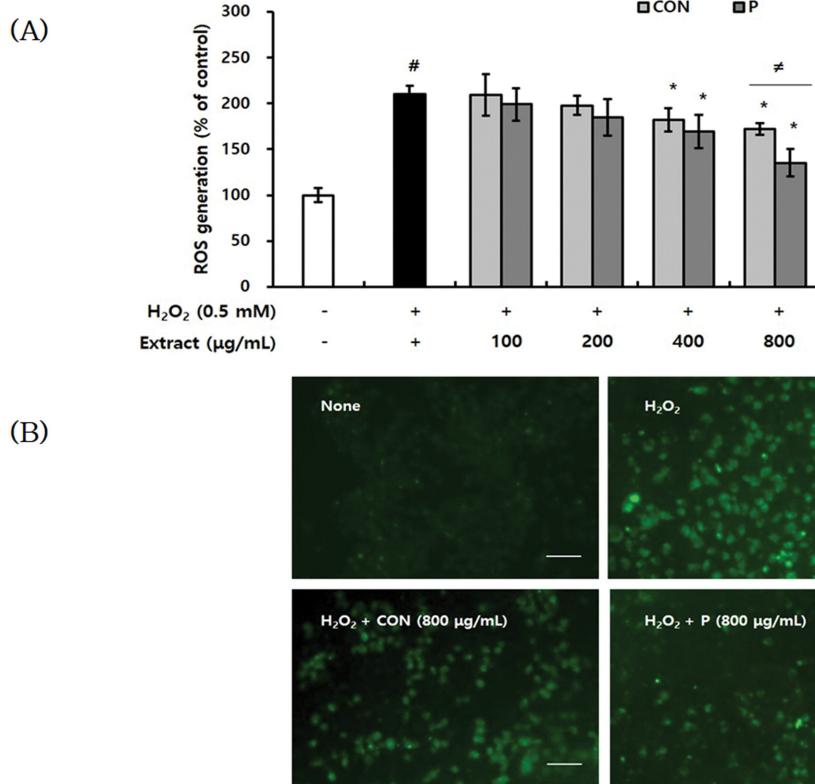
**Fig. 5.** Effect of CON and P against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated cytotoxicity in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h after pre-treatment with or without CON and P for 1 h. Cell viability was tested using EZ-cytox cell viability assay. Data are presented as the mean±SD of three independent experiments. <sup>#</sup>*P*<0.05 compared with the control (none) group, <sup>\*</sup>*P*<0.05 compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated group, <sup>†</sup>*P*<0.05 compared with CON and P of same parts. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

보호 효과를 높일 수 있었다. 다양한 연구에서 천연물 소재로부터 플라보노이드, 폴리페놀 및 페놀산 등 지표성분의 추출 수율을 높이기 위해 유기용매를 사용하고 있으며,

용매 혼합 사용은 100% 물보다 기능성분 추출에 유용하다고 알려져 있다(Kim & Kim, 2019; Sultana et al., 2009). 배암차즈기의 주요 화합물로 알려진 nepetin, luteolin, homoplantagin 및 rosmarinic acid 등은 용매 종류 및 비율에 따라 추출 함량이 달라질 뿐 아니라(Li et al., 2014), 기능성에도 영향을 미친다(Ngo et al., 2018; Zengin et al., 2019). 본 연구에서 효소 처리로 배암차즈기의 기능성분 용출이 증대되어 산화적 스트레스로부터 대식세포 보호 효과를 높였으나, 효소 처리 또한 추출용매가 100% 물인 것을 감안하면 활성을 나타내는 CON과 P 처리구의 농도(400 µg/mL 이상)가 다소 높을 수 있다고 판단되었다. 그러나 유기용매의 잔존 위험성과 소비자 거부감이 큰 유기용매 추출법보다 안전한 효소 처리법은 배암차즈기의 기능성분 용출 및 기능성을 증대시킬 수 있는 효과적인 전처리 방법이라고 생각되었다.

#### 대식세포 내 활성산소 억제 활성

CON과 P 처리구의 대식세포 보호 활성이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리로 증가한 ROS 소거 활성과 관련하는지 평가하였다. CON과 P 처리구를 1 h 전처리하고 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 24



**Fig. 6.** Effect of CON and P against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated ROS generation in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h after pre-treatment with or without CON and P for 1 h. After staining with DCF-DA fluorescent dye. (A) DCF fluorescence intensity was measured using a fluorescence microplate reader. Data are presented as the mean±SD of three independent experiments. <sup>#</sup>*P*<0.05 compared with the control (none) group, <sup>\*</sup>*P*<0.05 compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated group, <sup>†</sup>*P*<0.05 compared with CON and P of same parts. (B) The morphological images were obtained by a fluorescence microscope (magnification 200×, scale bar 50 µm). These images are representative of at least three independent experiments. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

시간 후 DCFH-DA probe를 이용하여 세포 내 ROS 생성 정도를 확인하였다. 그 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군에서는 대조군과 비교하여 210%로 ROS 생성이 증가하였다. 그러나 CON과 P 처리구를 전처리하였을 때, 400 µg/mL 이상의 농도에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군과 비교하여 ROS 생성이 유의적으로 감소하였다. 특히, 800 µg/mL 농도로 전처리하였을 때, CON은 172%, P 처리구는 135%로 ROS 생성이 감소하였으며, P 처리구가 CON보다 유의적으로 높은 활성을 나타냈다(Fig. 6A). 또한 형광현미경 관찰 결과에서도 ROS 생성을 나타내는 초록 형광의 세기가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군에서는 강하게 나타났으나 CON과 P 처리구를 800 µg/mL 농도로 전처리한 세포에서는 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6B). Chang et al. (2015)은 높은 폴리페놀 및 플라보노이드를 함유한 배암차즈기 물추출물이 *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP)로 자극된 간세포에서 과발현된 ROS를 억제하여 세포 생존율을 증가시킬 수 있었다고 보고하였다. 이상의 결과들로 보아, 폴리페놀 및 플라보노이드를 다량 함유하는 CON과 P 처리구는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 자극으로 증가한 과량의 ROS를 감소시킬 수 있었으며, 이로 인해 대식세포의 생존율이 증가했을 것으로 판단되었다. 또한 CON보다 P 처리구의 세포 내 ROS 소거 활성이 더 크게 나타난 것은 효소처리로 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드의 용출 및 함량이 증가한 결과들과 일치한다고 판단되었다.

대식세포 내 항산화 효소 활성

생체는 ROS에 방어하기 위해 비효소적 또는 효소적 항산화 메커니즘을 가지는데, 효소적 작용은 ROS가 세포 내 물질에 손상을 주기 전에 ROS를 제거하는 직접적인 항산화 방어작용이다. 대표적인 항산화 효소인 SOD (superoxide dismutase)는 ROS의 하나인 superoxide anion radical을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 변환시킨다. 또한 SOD에 의해 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하는 가장 효과적인 항산화 효소는 catalase로 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 한다(Kim & Ham, 2003). 본 연구에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리로 유발된 산화적 스트레스에 대한 CON과 P 처리구의 대식세포 사멸 억제 및 ROS 소거 활성이 항산화 효소인 SOD와 catalase의 활성과 관련하는지 확인하였다. CON과 P 처리구를 1 h 전처리하고 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 24 h 후 단백질을 추출하여 항산화 효소 활성을 평가하였다. 그 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군에서는 대조군과 비교하여 SOD 활성은 55%, catalase 활성은 68%로 감소하였다. 그러나 CON과 P 처리구를 전처리했을 때, SOD 및 catalase 활성이 증가하였다. SOD 활성은 400 µg/mL 이상의 농도에서, catalase 활성은 800 µg/mL 이상의 농도에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군과 비교하여 유의적으로 활성이 증가하였다. 특히, 800 µg/mL 농도로 전처리하여 catalase 활성 변화를 확인하였을 때, CON이 81%, P 처리구가 86%로 증가하였으며, P 처리구가 CON

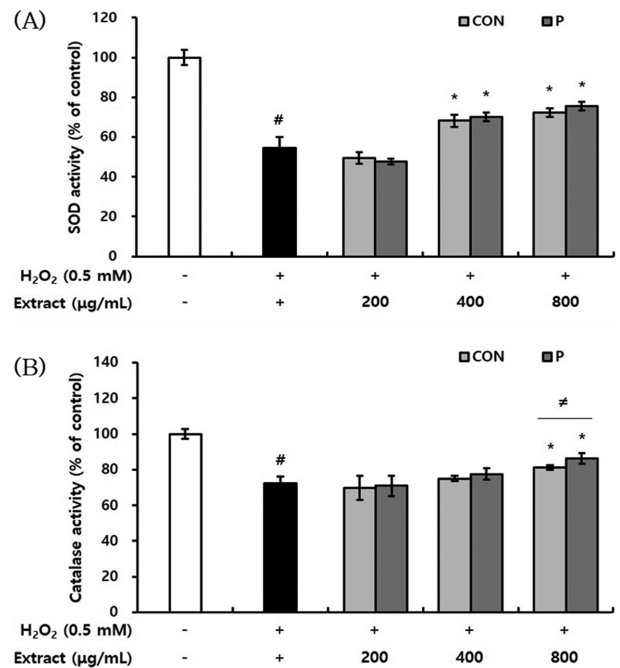
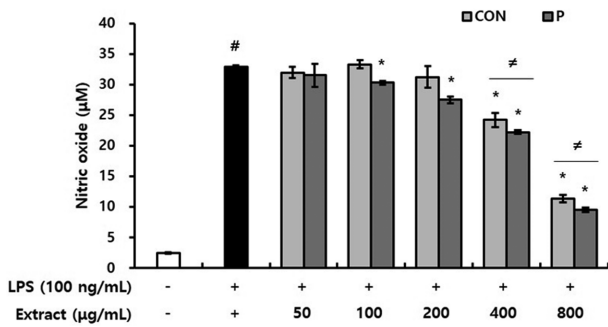


Fig. 7. Effect of CON and P on activity of antioxidant enzymes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h after pre-treatment with or without CON and P for 1 h. SOD (A) and catalase (B) activity was assessed by enzyme assay kit. Data are presented as the mean±SD of three independent experiments. #P<0.05 compared with the control (none) group, \*P<0.05 compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated group, †P<0.05 compared with CON and P of same parts. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

보다 유의적으로 높은 활성을 나타냈다(Fig. 7). Kim et al. (2014)의 연구에서 배암차즈기 메탄올 추출물이 SOD 유사 활성 및 항산화 활성을 나타낸 것을 주요 화합물인 rosmarinic acid, homoplantagin, luteolin에 의한 것이라고 보고하였으며, Qu et al. (2009)의 연구에서는 배암차즈기의 주요 화합물인 homoplantagin이 항산화 효소의 활성을 증가시켜 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스로부터 간세포의 손상을 억제하였다고 보고하였다. 이상의 결과들로 보아, 산화적 스트레스에 대한 CON과 P 처리구의 대식세포 보호 효과는 배암차즈기가 함유하는 플라보노이드, 페놀산 등의 기능성분이 SOD, catalase와 같은 항산화 효소의 활성을 높임으로써 ROS를 소거하고, 최종적으로는 대식세포의 사멸을 억제한다고 생각된다. SOD 활성에서는 두 시료 간 유의적인 차이를 확인할 수 없었지만, catalase 활성 결과에서 CON보다 P 처리구의 항산화 효소 활성이 더 크게 나타난 것은 효소 처리로 기능성분의 용출 및 함량이 증가한 결과와 일치한다고 판단되었다.

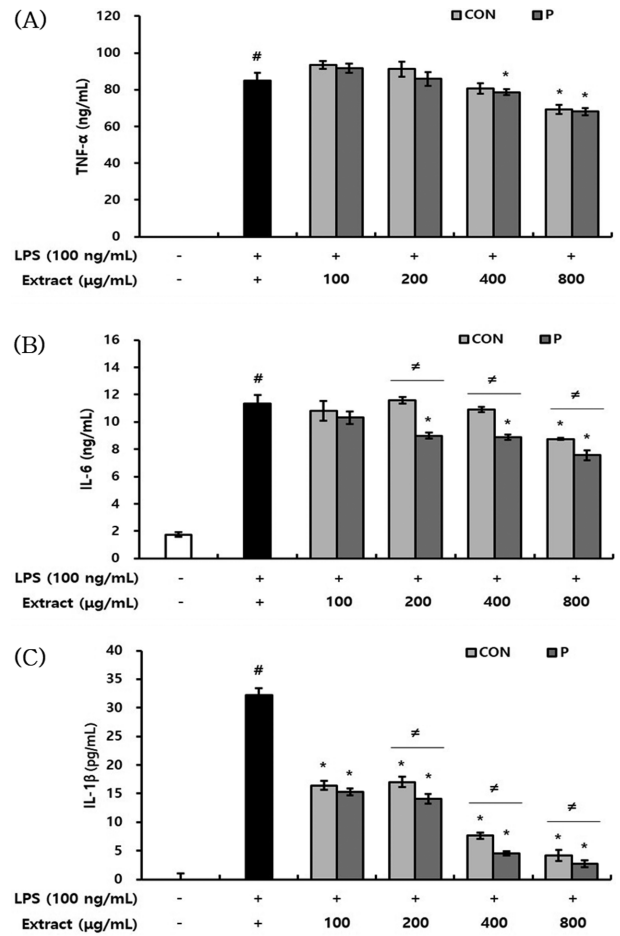
NO 및 염증성 사이토카인 생성 억제 활성

Lipopolisaccharide (LPS)는 대표적인 염증 매개 물질이며, 대식세포의 과도한 활성을 유발하여 NO 및 염증성 사



**Fig. 8.** Effects of CON and P on production of NO in LPS-treated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 100 ng/mL LPS for 24 h after pre-treated with or without CON and P for 1 h. The concentration of NO in the culture medium was detected by the Griess reaction. Data are presented as the mean±SD of three independent experiments. <sup>#</sup>*P*<0.05 compared with the control (none) group, \**P*<0.05 compared with the LPS treated group, <sup>#</sup>*P*<0.05 compared with CON and P of same parts. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

이토카인의 생성을 증가시킨다. 이렇게 과발현된 NO 및 염증성 사이토카인은 염증반응 악화시켜 DNA 손상 및 돌연변이를 일으키고 다양한 질병을 유발한다고 알려져 있다 (Yoon et al., 2009). CON과 P 처리구가 대식세포에서 LPS 자극에 의한 NO 및 염증성 사이토카인의 생성을 억제할 수 있는지 평가하였다. 그 결과, LPS 단독 처리군에서는 대조군과 비교하여 13배 이상의 NO가 생성되었다. 그러나 CON과 P 처리구를 전처리했을 때, CON은 400 µg/mL 이상의 농도에서, P 처리구는 100 µg/mL 이상의 농도에서 유의적으로 NO의 생성이 감소하였다. 특히, 800 µg/mL 농도로 전처리했을 때, LPS 단독 처리군과 비교하여 CON은 2.9배, P는 3.4배 NO 생성을 감소시켰다. CON과 P 처리구의 NO 생성 억제 활성을 비교하였을 때, 400 µg/mL 이상의 농도로 전처리 시 P 처리구가 CON보다 유의적으로 높은 활성을 나타냈다(Fig. 8). 또한 LPS 단독 처리군은 대조군과 비교하여 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-6의 생성이 현저히 증가하였다. 그러나 CON과 P 처리구를 전처리했을 때, 염증성 사이토카인의 생성이 감소하여 NO 생성 억제 활성과 유사한 결과를 보였다. 특히, CON과 P 처리구는 IL-1β의 생성을 가장 효과적으로 억제하였다. 즉, CON과 P 처리구를 800 µg/mL 농도로 전처리했을 때, LPS 단독 처리군과 비교하여 CON은 7.7배, P 처리구는 11.7배 IL-1β 생성을 감소시켰다. CON과 P 처리구의 염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 비교하였을 때, TNF-α의 생성 억제 활성에는 두 시료 간 유의적인 차이를 확인할 수 없었지만, IL-6와 IL-1β의 생성 억제 활성에서는 200 µg/mL 이상의 농도로 전처리 시 P 처리구가 CON보다 유의적으로 높은 활성을 나타냈다(Fig. 9). LPS로 염증을 유도한 대식세포에서 Jeong et al. (2012)은 배암차즈기 물 추출물이 NO와 prostaglandin E2 (PGE2)의



**Fig. 9.** Effects of CON and P on production of pro-inflammatory cytokines in LPS-treated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 100 ng/mL LPS for 24 h after pre-treated with or without CON and P for 1 h. The concentration of cytokines in the culture medium, including TNF-α (A), IL-6 (B), and IL-1β (C) was measured by the ELISA kits. Data are presented as the mean±SD of three independent experiments. <sup>#</sup>*P*<0.05 compared with the control (none) group, \**P*<0.05 compared with the LPS treated group, <sup>#</sup>*P*<0.05 compared with CON and P of same parts. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

생성을 억제했다고 보고하였으며, Lee & Kang (2020)은 배암차즈기 용매 분획물의 항산화 활성이 높을수록 NO 및 염증성 사이토카인 생성 억제 활성이 높게 나타났다고 보고하였다. Choi et al. (2015)은 rosmarinic acid, homoplantagin 등 6종의 파이토케미컬을 함유한 배암차즈기 메탄올 추출물이 관절염 마우스 모델에서 염증성 사이토카인 생성을 억제하여 염증을 완화시켰다고 보고하였다. 이상의 결과들로 보아, CON과 P 처리구가 LPS로 자극된 대식세포에서 NO 및 염증성 사이토카인의 생성을 효과적으로 억제한 것은 배암차즈기 내 플라보노이드, 페놀산 등의 파이토케미컬과 관련되어 있다고 생각된다. NO 및 염증성 사이토카인 생성 억제 활성이 항산화 활성과 마찬가지로 CON보다 P 처리구가 높게 나타난 것은, 배암차

즈기를 효소처리하였을 때 기능성분의 용출이 증가한 결과와 일치한다고 판단되었다.

## 요 약

본 연구는 배암차즈기의 기능성분 추출을 증진시킬 수 있는 효소처리 최적조건을 선정하여, 수용화 특성 및 기능성분 함량을 확인하였다. 또한 대용량 추출을 통하여 대량 생산 적용성을 평가하였고, 항산화 및 항염증 활성에 대해 확인하고자 하였다. 효소처리 조건 선정을 위하여 구연산 처리 방법 및 효소 종류, 농도, 시간별로 측정하여 CON과 비교하였고, 수용화 특성 및 항산화 함량을 측정하여 pectinase, 1%, 2 h 처리 (P)를 최적 조건으로 선정하였다. 측정 결과 CON 대비 P 처리구에서 WSI는 약 1.3배, TP는 약 1.7배 증가하는 것으로 나타났다. LC-MS의 구조 동정 결과, 플라보노이드 성분들은 CON 대비 P 처리구가 6.6-9.5배 증진되었다. Lab-scale과 pilot scale에서 처리 용량에 대한 차이를 비교하기 위해 대용량 추출물을 제조하여 P와 L-P 처리구간 수용화 특성 및 기능성분 함량을 측정된 결과, L-CON에 비해 WSI, TP, TF는 각각 약 1.6배, 1.2배, 1.3배 증가하는 것으로 나타나 용량 차이에 대한 성분함량 차이는 보이지 않았다. 플라보노이드, 페놀산 등의 기능성분을 함유한 CON과 P 처리구는 항산화 효소의 활성을 증가시켜 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리로 증가한 ROS를 소거하여 산화적 스트레스로부터 대식세포를 보호하였다. 또한 CON과 P 처리구는 LPS로 자극된 대식세포 내 NO 및 염증성 사이토카인의 생성을 효과적으로 억제하였다. 항산화 및 항염증 활성 결과에서 CON보다 P 처리구가 높은 활성을 나타낸 것은 효소처리로 기능성분의 용출 및 함량이 증가한 분석 결과와 일치한다고 판단되었다. 본 연구에서 확인된 배암차즈기의 기능성분 함유량을 증진시킬 수 있는 효소처리 수용화 기술을 적용하여 그 효과를 확인하였으며 산업적으로 활용을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다. 또한 배암차즈기는 특유의 강한 쓴맛으로 인해 낮은 기호성으로 소비확대의 어려움이 있어 목 넘김 어려움 개선효과를 확인할 수 있는 관능적 특성에 대한 심도있는 연구가 진행된다면 활용가능한 기능성식품 소재 생산이 이루어질 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호 PJ015115)에 의해 이루어진 것으로 감사드립니다.

## References

Bae HS. 2016. Studies on the anti-oxidative and anti-inflammatory

efficacy of fermented *Salvia plebeia* R. Br. extract. Ph.D. thesis, Joongbu Univ. Geumsan, Korea.

Bae MJ, Ye EJ, Kim SJ, Kim JM, Yee ST, Park EM. 2007. The effects of plebeiae herb (*Salvia plebeia* R. Br.) on the anticancer (*in vitro*) and activation of immune cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 377-382.

Chang LW, Chu CC, Chu HL, Wu HC, Duh PD. 2015. Comparison of the protective effects of seven selected herbs against oxidative stress. *J. Coast. Life Med.* 3: 564-569.

Choi JK, Oh HM, Park JH, Choi JH, Sa KH, Kang MK, Park PH, Shin TY, Rho MC, Kim SH. 2015. *Salvia plebeia* extract inhibits the inflammatory response in human rheumatoid synovial fibroblasts and a murine model of arthritis. *Phytomedicine* 22: 415-422.

Cinar I. 2005. Effect of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. *Process Biochemistry* 40: 945-949.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PT, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.

Flavonoid Data Base 1.0. 2016. National Institute of Agricultural Sciences (11-1390802-001097-01), Jongno, Seoul, Korea.

Go IH, Choi TH. 2016. Characteristics of acid hydrolysis indigo extracted from indigo (*Polygonum tinctorium* L.) leaves. *Journal of Korea TAPPI.* 48: 57-65.

Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *J. AOCS.* 58: 966-967.

Jeong HR, Sung MS, Kim YH, Ham HM, Choi YM, Lee JS. 2012. Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 41: 888-894.

Jeong JS, Kim YJ, Ahn EK, Shin JY, Go GB, Son BG. 2015. Antioxidative activities and qualitative characteristics of substitute tea using *Salvia plebeia* R. Br. *Korean J. Food Cook. Sci.* 31: 41-52.

Jeong JS, Kim YJ, Choi BR, Go GB, Son BG, Gang SW, Moon SM. 2014. Antioxidant and physicochemical changes in *Salvia plebeia* R. Br. after hot-air drying and blanching. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43: 893-900.

Jin XF, Lu YH, Wei DZ, Wang ZT. 2008. Chemical fingerprint and quantitative analysis of *Salvia plebeia* R. Br. by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48: 100-104.

Jo SY, Lee U, Kim EY, Lee JS, Her JW, Yoon TJ. 2010. A study on the anti-inflammatory and anti-allergic effect of *Salvia plebeia* R. extracts. *Korean J. Pharmacogn.* 41: 31-37.

Kamatou GPP, Viljoen AM, Gono-Bwalya AB, Van Zyl RL, Van Vuuren SF, Lourens ACU, Baser KHC, Demirci B, Lindsey KL, Van Staden J, Steenkamp P. 2005. The *in vitro* pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *J. Ethnopharmacol.* 102: 382-390.

Kang BH. 2008. *Korea herbal resources ecology pictorial book.* 2<sup>nd</sup> ed. Geo Book Press, Seoul, Korea. p 207.

Kil HW, Rho TW, Seo YJ, Yu AR, Yoon KD. 2020. Isolation of phytochemicals from *Salvia plebeia* using countercurrent chromatography coupled with reversed-phase HPLC. *Nat. Prod. Sci.* 26: 236-243.

Kim AR, Kim DH, Jeong GT. 2015. Optimum reaction condition

- of enzymatic hydrolysis for production of reducing sugar from *Enteromorpha intestinalis*. *KSBB J.* 30: 53-57.
- Kim HS, Ham JS. 2003. Antioxidativ ability of lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 23: 186-192.
- Kim JY, Kim HM, Kim JH, Guo S, Lee DH, Lim GM, Kim W, Kim CY. 2023. *Salvia plebeia* R. Br. and rosmarinic acid attenuate dexamethasone-induced muscle atrophy in C2C12 myotubes. *Int. J. Mol. Sci.* 24: 1876.
- Kim KC, Kim JS. 2019. Phenolic content and antioxidant activity of sweet wormwood tea extracts using different solvents. *J. Plant Biotechnol.* 46: 338-345.
- Kim M, Kim JY, Yang HS, Choe JS, Hwang IG. 2021. Nepetoidin B from *Salvia plebeia* R. Br. inhibits inflammation by modulating the NF- $\kappa$ B and Nrf2/HO-1 signaling pathways in macrophage cells. *Antioxidants* 10: 1208.
- Kim MJ, Nam DG, Choe JS, Choi AJ. 2022. Effects of antioxidative and functional components of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extract by fermentation and enzyme treatment. *Food Eng. Prog.* 26: 112-118.
- Kim YJ, Jeong JS, Park NJ, Go GB, Son BG. 2014. Active ingredients and antioxidant activities of *Salvia plebeia* R. Br. according to pretreatment conditions. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43: 1948-1953.
- Kwon DH, Cha HJ, Lee H, Hong SH, Park C, Park SH, Kim GY, Kim S, Kim HS, Hwang HJ, Choi YH. 2019. Protective effect of glutathione against oxidative stress-induced cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages through activating the nuclear factor oxygenase-1 pathway. *Antioxidants* 8: 82.
- Lee YR, Woo KS, Hwang IG, Kim HY, Lee SH, Lee JS, Jeong HS. 2012. Physicochemical properties and antioxidant activities of garlic (*Allium sativum* L.) with different heat and pressure treatments. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 278-282.
- Lee YY, Kang SA. 2020. Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Salvia plebeia* R. Br. extracts. *Korean J. Food Nutr.* 33: 483-492.
- Li J, Zhang X, Yu Q, Fu X, Wang W. 2014. One-step separation of four flavonoids from *Herba Salviae plebeiae* by HSCCC. *J. Chromatographic Sci.* 52: 1288-1293.
- Lim JA, Yun BW, Baek SH. 2007. Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of methanol extract from *Salvia plebeia* R.Br. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 15: 183-188.
- Makkar HPS. 1999. Quantification of tannins in tree foliage: a laboratory manual for FAO/IAEA. joint FAO/IAEA division of nuclear techniques in food and agriculture. Vienna. p. 1-29.
- Marques MPC, Cabral JMS, Farnades P. 2010. Bioprocess scale-up: quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85: 1184-1198.
- Meng N, Chen K, Wang Y, Hou J, Chu W, Xie S, Yang F, Sung S. 2022. Dihydrohomoplantagin and homoplantagin, major flavonoid glycosides from *Salvia plebeia* R. Br. inhibit oxLDL-induced endothelial cell injury and restrict atherosclerosis via activating Nrf-2 anti-oxidation signal pathway. *Molecules* 27: 1990.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Nam DG, Kim MA, Im PR, Choe JS, Choi AJ. 2019. Solubilization of polysaccharides and functional components of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) using ethanol and enzyme. *Korean J. Food Preserv.* 28: 545-554.
- Nam DG, Kim MA, Im PR, Choe JS, Choi AJ. 2020. Quality properties of jelly using ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) concentrate prepared with enzymatic hydrolysis. *Korean J. Food Cook Sci.* 36: 233-242.
- Nam DG, Kim MA, Im PR, Kim SB, Choe JS, Choi AJ. 2018. Solubilization of polysaccharide and functional components by high-pressure enzyme treatment from ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Food Eng. Prog.* 22: 173-185.
- Ngo YL, Lau CH, Chua LS. 2018. Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food Chem. Toxicology* 121: 687-700.
- Park SI, Kim TS, Park CG, Kang MH. 2012. Nutritional and sensory of green leafy vegetables cultivated from medicinal plant seed. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 22: 271-277.
- Qu XJ, Xia X, Wang YS, Song MJ, Liu LL, Xie YY, Cheng YN, Liu XJ, Qiu LL, Xiang L, Gao JJ, Zhang XF, Cui SX. 2009. Protective effects of *Salvia plebeia* compound homoplantagin on hepatocyte injury. *Food Chem. Toxicol.* 47: 1710-1715.
- Shin JS, Park JJ, Jun WJ. 2020. Effect of hot water of *Salvia plebeia* R. on the production of splenocyte cytokines in mouse. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 49: 754-758.
- Shin MK, Kim SK, Lee SK, Yang EY, Lee HO, Baek SH. 2001. Cytotoxicity and antimicrobial effect of the extract of *Salvia plebeia*. *Kor. J. Pharmacogn.* 32: 55-60.
- Shirsat R, Suradkar S, Koche D. 2011. Antioxidant activity and total polyphenol content of aqueous extracts from three selected lamiaceae members. *Indian Journal of Pharmaceutics* 2:43-45.
- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. 2000. Role fo reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415-418.
- Song BB, Kim SK, Jeong GT. 2011. Enzymematic hydrolysis of marine algae *Hizikia fusiforme*. *KSBB J.* 26: 347-351.
- Strati IF, Gogou E, Oreopoulou. V. 2015. Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food Bioprod. Process* 94: 668-674.
- Sultana B, Anwar F, Ashraf M. 2009. Effect of extraction solvent/ technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules* 14: 2167-2180.
- Tufvesson P, Fu W, Jensen JS, Woodley JM. 2010. Process consideration for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food Bioprod. Process* 88: 3-11.
- Yan TR, Lin YH, Lin CL. 1998. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase II with high hydrolysis and transglucosylation activities from *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem* 46: 431-437.
- Yoon WJ, Ham YM, Yoo BS, Moon JY, Koh J, Hyun CG. 2009. *Oenothera laciniata* inhibits lipopolysaccharide induced production of nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub>, and proinflammatory cytokines in RAW264.7 macrophages. *J. Biosci. Bioeng.* 107: 429-438.
- Yoshizawa S, Horiuchi T, Fujiki H, Yoshida T, Okuda T, Sugimura T. 1987. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of "tannin" in green tea. *Phytother. Res.* 1: 44-47.
- Zengin G, Stefanucci A, Rodrigues MJ, Mollica A, Custodio L, Aumeeruddy MZ, Mahomoodally MF. 2019. *Scrophularia*



*lucida* L. as a valuable source of bioactive compounds for pharmaceutical applications: *In vitro* antioxidant, anti-inflammatory, enzyme inhibitory properties, *in silico* studies, and HPLC profiles. J. Pharma. Biomed. Analysis 162: 225-233.

### Author Information

- 김미진:** 국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과 연구원  
**양희선:** 국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과 연구원  
**김지영:** 국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과 연구원  
**최정숙:** 국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과 농업연구관  
**최애진:** 국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과 농업연구사