

아마란스 종자 추출물의 라디칼 저해활성

조현주¹ · 정강현¹ · 윤진아² · 송병춘 · 안정희*

¹서울과학기술대학교 식품공학과, ²배화여자대학교 식품영양과, 건국대학교 식품생명과학부

Free Radical-scavenging Activities of Amaranth (*Amaranthus spp. L.*) Seed Extracts

Kang-Hyun Chung¹, Hyeon-Ju Jo¹, Jin-A Yoon², Byeong Chun Song, and Jeung Hee An*

¹Department of Food Science and Technology, Seoul national University of Science & Technology

²Department of Food & Nutrition, Baewha Women's University

Division of food Bioscience, Konkuk University

Abstract

This study investigated the antioxidant activities of Amaranth (*Amaranthus spp. L.*) seed extracts. Methanol and hot water extracts of the seeds were evaluated for their total polyphenol, flavonoid, and tannin content, antioxidant activities, and protective effects against oxidative stress on L-132 cells. The hot water extracts showed higher total phenol (4.23 mg GAE/g) and tannin (0.511 mg TAE/g) content, while the methanol extracts showed higher flavonoid content (1.53 mg CE/g). The methanol extracts performed better than the water extracts for DPPH radical-scavenging activity, while the water extracts performed better for ABTS radical-scavenging activity and SOD-like activity. With L-132 cells, the water extracts showed strong protective effects against oxidative stress in a dose dependent manner with an effect three-fold higher than that of the methanol extracts at a concentration of 500 µg/mL. A higher inhibition activity of nitric oxide in RAW 264.7 cells was observed with the water extracts than with the methanol extracts at a concentration of 250 µg/mL. In summary, the water extracts showed the highest total polyphenol and tannin content and a more powerful protective effect against oxidative stress and inhibition effect of NO. Our results suggest that amaranth seeds may be useful as natural antioxidant compounds.

Key words: amaranth seeds, free radical-scavenging activity, antioxidant activity

서 론

최근 소비자들이 건강에 대한 인식이 증가하면서 건강기능식품에 대한 관심이 높아지고 있다. 이에 따라 건강기능식품 개발을 위해 건강 관련 기능성 물질 탐구, 기능성 원료 및 식품 개발에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있고, 기능성 소재 개발을 위해 천연물, 농수산물 및 약용식물로부터 생리 활성 평가 및 물질 분리에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다(Lee, 2013). 성인병 및 노화관련 각종 질환들은 활성산소에 의해 인간의 대사과정 중에 끊임없이 발생되어 생체를 노화시키는 주요인자로 작용하고 있다고 알려져 있는데, 활성산소를 방어하는 항산화물질이 노화 및

성인병 같은 질병의 치료 가능성 때문에 주목받고 있으며, 그 중 찰옥수수(Seo et al., 1999), 수삼(Kim et al., 2007), 식용꽃(Park et al., 2007), 국화꽃(Woo et al., 2010), 산채류(Lee et al., 2011), 맨드라미 (Kim et al., 2012), 더덕(Jeon et al., 2013), 쑥(Kang & Lee, 2013), 인삼꽃(Kim et al., 2013)등 천연물에서 추출한 천연항산화제에 관한 연구가 활발하다(Han et al., 2013). 활성산소 생성을 억제하기 위한 항산화물질로서 아스코르빈산, 토코페롤, 카로티노이드, 플라보노이드, 탄닌 등의 천연 항산화제와 함께 butylated hydroxyanisole(BHA) 및 butylated hydroxytoluene(BHT) 등의 합성항산화제가 개발 되어 식품, 화장품 등에 산화방지제로 많이 사용되고 있다. 천연항산화제들은 항산화력이 비교적 낮고 합성항산화제의 경우는 생체 효소 및 지방의 변이원성 및 독성으로 인체에 암을 유발할 수 있다는 보고가 있어 안전하고 강한 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다(Han et al., 2013).

아마란스(*Amaranth*)는 비름과(*Amaranthus spp. L.*)에 속하는 일년생 유사 화곡류(cereal)이고 쌍자엽 식물로(Lee et

*Corresponding author: Jeung Hee An, Division of Food Bioscience, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea 268 Chungwondaero, Chungju-si, Chungcheongbuk-do, 380-701, Korea
Tel: +82-43-840-3584; Fax: +82-43-840-3585
E-mail: anjhee@kku.ac.kr
Received March 6, 2014; revised April 15, 2014; accepted April 16, 2014

al., 1996a) 국내에서는 관상용으로 강원 일부지역에서 재배되고 있고 독특한 맛과 영양가치가 높아 국수, 비스킷(종실) 등의 식품개발에도 이용되고 있다(Kim & Ryoo, 2002; Choi, 2011). 아마란스는 다른 곡류에 비해 불포화 지방산의 함량이 높고 주 지방산은 리놀레산으로 구성되어 있고(Lee et al., 1996a) 또한 단백질 15-16% 함유하고 있으며 그중 lysine과 황 함유 아미노산이 풍부하다(Lee et al., 1996a). 아마란스의 생리적 연구로는 간과 혈액 내의 총 콜레스테롤, 중성지방과 LDL-콜레스테롤의 수준을 낮추주고 apo-lipoprotein A와 HDL-콜레스테롤 수준을 높여주며 콜레스테롤 합성에 관여하는 HMG-CoA reductase를 억제 효과를 가진 것으로 보고되었다(Qureshi et al., 1996; Caselato-Sousa & Amaya-Farfán, 2012). 그 밖에도 종자 메탄올추출물에서 위압과 대장암에서 억제효과(Lee et al., 1996b)가 보고되고 있고 아마란스 종자는 식용으로 사용이 가능하나 이에 대한 기능성 연구는 매우 미비하다(Kim & Ryoo, 2002; Choi, 2011).

본 연구에서는 아마란스 종자의 열수 추출물과 메탄올 추출물을 조제하여 총 페놀 및 플라보노이드 함량 측정과 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였으며 세포내에서 활성산소종 억제효과는 대식세포주인 RAW 264.7 세포내에서 NO 억제 활성, L-132 세포내에서 H₂O₂에 의한 산화적 스트레스에서의 세포 보호 효과를 측정하여 아마란스 종자가 가진 기능성식품소재로서의 개발 가능성을 검토하고자한다.

재료 및 방법

재료

재료는 강원도 평창지역에서 채취한 아마란스 종자를 깨끗이 수세하여 세정 및 세절하여 자연건조 후 마쇄하여 실험에 사용하였다.

추출물 제조

본 실험에 사용한 열수 추출물은 수직 환류냉각기가 부착된 추출 플라스크에 건조 시료 30 g과 증류수 10 배수(v/w)를 가하여 autoclave(SJ-220A100, Sejong Scientific Co., Ltd., Bucheon, Korea)를 이용하여 121°C에서 15분 동안 1.23 bar의 압력으로 추출하여 얻었다. 메탄올 추출물은 추출 플라스크에 건조 시료 30 g과 메탄올 10 배수(v/w)를 혼합하여 실온에서 24시간 진탕하여 얻었다. 제조한 추출물은 감압여과기로 여과한 여과액을 회전식진공농축기(R-114, Buchi Co., Flawil, Switzerland)를 사용하여 농축시킨 후 동결건조기(Ilshin Co., Seoul, Korea)로 건조 후 분말 상태로 냉동고(-70°C)에 보관하면서 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 아마란스 추출물은 메탄올추출물(9.4 g, 31.4%)과 물 추출물(4.69 g, 15.6%)이다.

총 폴리페놀 함량

총 페놀 함량은 Folin-Denis 방법(Singleton & Rossi, 1965)을 변형하여 측정하였다. 각각의 추출물을 증류수에 용해한 시료에 2 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent 및 20% Na₂CO₃(Daejung chemicals & Metals Co., LTD., Gyeonggi, Korea)을 차례로 가한 다음 실온에서 60분간 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 검량선에 근거하여 추출물 g당 mg gallic acid equivalent(GAE, dry basis)로 폴리페놀의 함량을 산출하였다.

총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Zhishen et al.(1999)과 Singleton et al.(1999)의 방법을 응용하여 측정하였다. 각 시료를 5% NaNO₂(Daejung chemicals & Metals Co., LTD., Gyeonggi, Korea)과 증류수를 혼합하여 5분간 반응시키고 10% AlCl₃·6H₂O를 첨가하여 다시 6분간 반응시킨 후 1 M NaOH(Daejung chemicals & Metals Co., LTD., Gyeonggi, Korea)와 섞어 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 (+)-catechin hydrate(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 검량선을 작성한 후 추출물의 총 플라보노이드 함량은 mg (+)-catechin hydrate(CE, dry basis)로 나타내었다.

탄닌 함량 측정

탄닌 함량은 AOAC법(1990)에 따라 증류수 75 mL에 시료 1 mL를 첨가한 뒤 Folin 시약 5 mL와 Na₂CO₃ 용액 10 mL를 가한 다음 증류수를 가하여 100 mL로 정용하여 30분간 반응 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였고, tannic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 표준물질로 사용하였다. 총 탄닌 함량은 mg tannic acid equivalent (TAE)/g로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH에 대한 수소공여 효과로 측정하는 라디칼 소거능은 Blois(1958)의 방법을 변형하여 측정하였다. 일정 농도로 희석된 시료와 0.2 mM DPPH solution(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 가하여 잘 혼합한 후 암소에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능 결과 값은 추출물 첨가구와 무첨가구를 비교하여 라디칼의 소거활성을 백분율(%)로 나타내어 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거능을 확인하였다.

ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Arano et al.(2001)과 Re et al.(1999)의 방법을 변형하여 사용하였다. 7 mM ABTS

(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액에 2.45 mM potassium persulfate(Daejung chemicals & Metals Co., LTD., Gyeonggi, Korea)를 혼합하여 암소에서 약 24시간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 1.0 ± 0.02 가 되도록 조절된 ABTS solution을 사용하였다. ABTS solution을 시료와 혼합하여 암소에서 6분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 추출물 첨가구와 무첨가구를 비교하여 라디칼의 소거활성을 백분율(%)로 나타내었다.

SOD 유사활성

SOD 유사활성 측정은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색 원리를 이용한 Marklund & Marklund (1974)의 방법을 변형하여 측정하였다. 일정 농도로 희석된 시료에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM trisaminomethane + 10 mM EDTA, pH 8.5, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)와 7.2 mM pyrogallol(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl(Daejung chemicals & Metals Co., LTD., Gyeonggi, Korea)를 가하여 반응을 정지시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 추출물 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

세포배양

L-132(폐 정상세포)와 RAW 264.7(대식세포) 세포주를 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양받아 100 units/mL의 penicillin-streptomycin(GIBCO, Grand Island, NY, USA)과 10%의 fetal bovine serum(Hyclone, Logan, UT)이 함유된 DMEM 배지(Welgene, Dalseogu, Daegu, Korea)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다.

세포 보호 효과 측정

L-132 세포에 대한 H₂O₂에 의해 유도된 세포독성을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. L-132 세포를 96 well plate에 5×10^4 /well로 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 다양한 농도의 시료를 첨가한 L-132 cell을 24시간 동안 배양 후, H₂O₂ (Daejung chemicals & Metals Co., LTD., Gyeonggi, Korea)를 2 mM의 농도로 첨가하여 30분간 처리하였다. 이 상태의 L-132 cell에 MTT solution(5 mg/mL, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 넣고 37°C에서 4시간 반응시켰다. 그 후 상등액을 제거하고 각 well에 200 µL의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Nitric Oxide(NO) assay

대식세포주인 RAW 264.7 세포로부터 일산화질소 생산의 지표로서 배양 상층액 내에 안정된 NO 산화물인 NO₂를 Griess 반응으로 측정하였다(Murakami et al., 2000). 96 well plate에 1×10^6 개의 cell을 PBS로 2번 수세한 후에 무혈청 배지(Welgene)로 교체 후 LPS(20 µg/mL, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), tetrahydrobiopterin(BH₄, 10 µg/mL, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 200 mM l-arginine(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 그리고 IFN-γ(100 U/mL, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 각각의 well에다 첨가하여 자극시켰다. 그 배지에 시료를 처리하여 실험하였다. NO 생성량은 supernatant를 모아 griess reagent로 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도로 측정하였다. 아래의 식에 따라 결과값을 계산하였다. 결과값 산출 후 세포에 대한 시료의 독성여부를 확인하기 위해 MTT solution(5 mg/ml, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용한 MTT assay를 사용하여 세포수를 측정하였다.

$$\frac{[(\text{compound Abs}_{540} - \text{negative Abs}_{540}) / (\text{positive Abs}_{540} - \text{negative Abs}_{540})] \times 100 (\%)}$$

통계처리

본 연구에서 실험값에 대한 통계분석은 SPSS 18.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program을 이용하여 분산분석(ANOVA)법을 실행하였으며, 실험군 간의 유의성은 Duncan의 다중범위 시험법(Duncan's multiple range test)으로 $p < 0.05$ 수준에서 유의적 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 플라노이드 함량

페놀 화합물은 다양한 구조와 분자량을 가지며, 항산화 효과 등의 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다. 폴리페놀은 식물의 대표적인 2차 대사산물로 식물체에 널리 분포되어 있으며, phenolic hydroxyl 그룹 때문에 단백질, 효소 단백질 또는 기타 거대분자와 결합하는 성질을 가지고 있어 항산화 작용, 항균, 항알레르기 및 항암효과에 관여하는 것으로 알려져 있다(Jeon et al., 2013). 꽃에 함유되어 있는 항산화물질 중 polyphenolic 화합물들은 우수한 항산화력을 가지는 것으로 알려져 있으며, 이는 라디칼을 안정화시킬 수 있는 phenolic ring의 존재 때문인 것으로 보고되어져있다(Middleton & Kandaswami, 1994).

아마란스 종자 추출물의 총 폴리페놀, 플라노이드 그리고 탄닌 함량은 Table 1과 같다. 메탄올 추출물의 폴리페놀 함량은 1.69 ± 0.12 mg GAE/g이고, 물 추출물은 4.23 ± 1.00 mg GAE/g으로 페놀성 물질의 함량이 나타났다. 총 폴리페놀 함량은 메탄올 추출물보다 물 추출물이 3 배가량

Table 1. Comparison of total polyphenol, flavonoid and tannin contents of extracts from Amaranth seeds.

Sample	Total phenolic content (mg GAE ¹⁾ /g)	Total flavonoid content (mg CE ²⁾ /g)	Tannin content (mg TAE ³⁾ /g)
Methanol ext.	1.69±0.12	1.53±0.17	0.316±0.048
Water ext.	4.23±1.00	0.08±0.00	0.511±0.012

¹⁾ Total phenolic content was expressed as mg/g gallic acid equivalent (GAE).
²⁾ Total flavonoid content was expressed as mg/g catechin equivalent (CE).
³⁾ Tannic acid content was expressed as mg/g tannic acid equivalent (TAE).
⁴⁾ Each value is mean±SD of triplicate determinations (n=3).

높았다. 아마란스(*Amaranth cruentus*) 종자의 폴리페놀 함량은 400-440 mg/kg, 새싹은 350-370 mg/kg으로 보고되어 있으며(Caselato-Sousa & Amaya-Farfán, 2012) 이번 실험의 아마란스(*Amaranthus spp. L.*) 종자 추출물보다는 폴리페놀 함량이 낮았다. 또한 멘드라미 꽃의 메탄올과 물 추출물의 폴리페놀 함량은 3.09-6.8 mg GAE/g으로 그 양이 아마란스 종자 추출물과 비슷하였다(Kim et al., 2012). 아마란스 추출물의 플라보노이드 함량은 메탄올 추출물(1.53±0.17 mg CE/g), 물 추출물(0.08±0.00 mg CE/g)으로 나타났다. 메탄올 추출물은 물 추출물보다 플라보노이드 함량이 19 배가량 높으며 추출용매에 따른 차이가 생기는 것은 추출성분이 극성에 따라 극성지수가 5.1 인 메탄올에 극성이 10.2 인 물보다 더욱 잘 추출되기 때문으로 사료된다(Yun & Jeong, 2012). 이러한 경향은 참당귀 꽃(Park et al., 2011)과 멘드라미 꽃(Kim et al., 2012) 추출물에서도 확인할 수 있었다. 아마란스(*Amaranth cruentus*) 새싹의 플라보노이드 함량은 300-690 mg/kg으로 보고되어 아마란스(*Amaranthus spp. L.*) 종자의 메탄올 추출물이 아마란스 새싹의 함량보다 높음을 알 수 있었다(Caselato-Sousa &

Amaya-Farfán, 2012).

탄닌 성분은 과실, 야채류 및 식물종자 등 식물체에 널리 함유되어 있으며, 수렴성이나 지혈작용 등의 약리성과 더불어 단백질이나 alkaloid와 결합하는 특성을 가지고 있다(Seo et al., 2000). 최근에는 탄닌성분의 항균, 항산화, 항종양작용 및 중금속 제거능과 같은 유용한 생리활성이 보고되어, 현대인의 식생활 향상에 도움을 줄 것으로 기대된다(Seo et al., 2000). 아마란스 종자의 탄닌 함량은 메탄올 추출물 0.316±0.048 mg TAE/g, 물 추출물 0.511± 0.012 mg TAE/g으로 물 추출물이 메탄올 추출물보다 1.6 배 가량 그 함량이 높음을 알 수 있었다. 이 함량의 차이는 용매의 극성에 따라 추출성분이 달라지기 때문으로 사료 된다(Yun & Jeong, 2012)로 내용 수정하였습니다.

DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능의 변화

천연물의 라디칼 소거활성은 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제시키는 역할을 하고 있으며, 라디칼 소거작용은 인체의 질병과 노화를 방지하는데 대단히 중요한 역할을 한다(Kim et al., 2001). DPPH radical 소거능 측정 은 항산화 활성을 측정하는데 가장 널리 사용되는 방법이다. 아마란스의 꽃 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 결과는 Fig. 1A과 같다. DPPH 라디칼 소거활성은 Ascorbic acid(5 µg/mL)가 43.4%의 활성을 보인 것과 비교하였을 때 50 µg/mL의 농도에서 메탄올 추출물 추출물(5.8%)이 가장 좋았으며 물 추출물의 활성은 250 µg/mL의 농도에도 활성을 보이지 않았다.

ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]는 비교적 안정한 free radical로서 DPPH 라디칼과 함께 항산화활성을 측정하는데 많이 이용되고 있다. ABTS를 peroxidase, H₂O₂와 반응시켜 활성 양이온인 ABTS+이

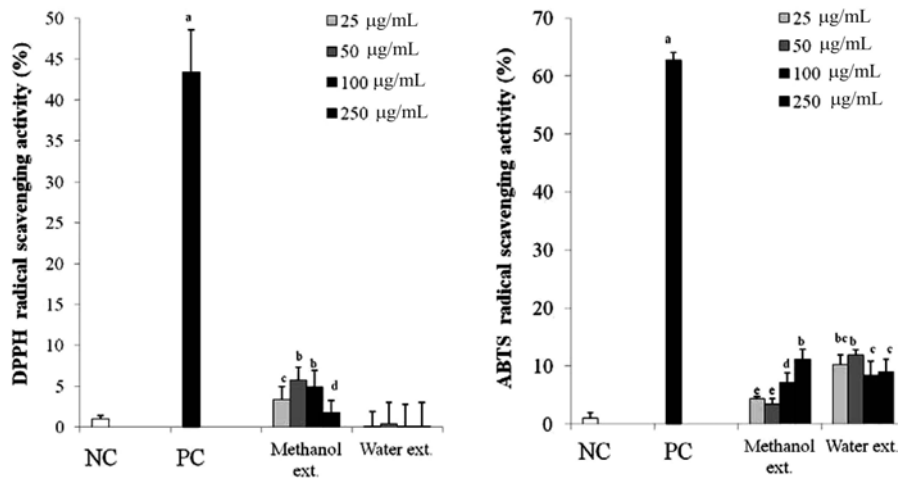


Fig. 1. Reactive oxygen species scavenging activities. A: DPPH scavenging activities of seeds extracts from Amaranth. B: ABTS scavenging activities of Amaranth seeds extracts. NC: negative control, PC: positive control, Ascorbic acid (5 µg/mL) was used as positive control. Values with different letters were significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. Each value is mean±SD (n=3).

형성 되면 추출물의 항산화력에 의해 ABTS+이 소거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 수치로 나타내어 추출물의 항산화 활성을 평가할 수 있다 (Kim et al., 2013). 아마란스 종자 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성을 평가한 결과는 Fig. 1B에 나타내었다. Ascorbic acid는 5 µg/mL의 농도에서 62.7%의 활성을 보여주었고 종자 메탄올 추출물에서는 농도에 따라 그 활성이 증가되는 경향을 보였으나 물 추출물은 큰 차이를 보이지 않았다. 메탄올 추출물은 250 µg/mL의 농도에서 활성이 11.1%로 가장 좋았으며 물 추출물은 50 µg/mL에서 11.8%로 가장 높은 활성을 나타내었다. 본 연구의 결과에 따르면 플라보노이드 함량이 높게 측정된 메탄올 추출물 추출물에서 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 결과를 보여주었다. 그러나 ABTS 라디칼 소거활성과 DPPH 라디칼 소거활성과는 결과에서 차이를 나타내었는데 이는 반응속도가 빠른 ABTS 라디칼과는 달리 DPPH 라디칼의 반응속도는 화합물에 따라서 매우 다르다고 알려져 있으며(Huang et al., 2005) ABTS 라디칼은 DPPH 라디칼과 달리 극성과 비극성 물질 모두와 반응하여 소거되며 ABTS 라디칼과 잘 반응하는 항산화 물질이 DPPH 라디칼과는 전혀 반응하지 않을 수도 있다고 알려져 있다(Re et al., 1999; Kim et al., 2013). 본 연구 결과, 물과 메탄올의 극성 차이와 용해되어 나온 활성 성분의 차이로 ABTS 라디칼에서 더 높은 활성을 보인 것으로 사료된다. 또한 물추출물의 폴리페놀과 탄닌 함량 높은 것이 ABTS 활성에 더 관여하는 것으로 보여진다.

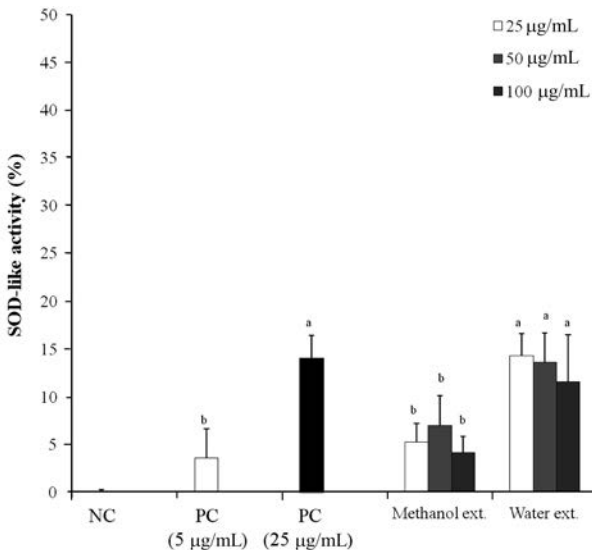


Fig. 2. SOD-like activity of seeds extracts from Amaranth. NC: negative control, PC: positive control, Ascorbic acid (5 and 25 µg/mL) was used as positive control. Values with different letters were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value is mean±SD (n=3).

SOD 유사활성의 변화

아마란스 추출물들의 SOD 유사활성을 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다. 종자 메탄올 추출물은 70 µg/mL 농도에서 7.04%으로 가장 높은 활성이 나타났으며 물 추출물은 50 µg/mL 농도에서 13.7%의 활성이 나타났다. 이는 Ascorbic acid(25 µg/mL)의 14.1%과 유사한 활성을 보였다. 산채류 34 종의 물과 메탄올 추출물(Lee YM et al., 2011)이 1 mg/mL 농도에서 SOD 유사활성을 측정하였을 때 거의 모든 시료의 활성이 나타나지 않았으며 그 농도를 5 mg/mL로 높였을 때 활성이 0.4-100%로 나타났다는 연구와 쑥 추출물(Kang & Lee, 2013)이 10 mg/mL의 농도에서 44.38-68.29%의 활성을 보인다는 결과와 비교 하면 아마란스 종자 추출물이 기존에 보고된 여러 종류의 천연물 보다 낮은 농도에서도 더 높은 SOD 유사활성을 보여주었다. 이와 같이 아마란스 종자의 라디칼 소거능이 매우 우수하기 때문에 항산화 기능성 소재로의 연구가 요구된다.

L-132 세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과

아마란스 종자 추출물의 L-132 세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과를 알아보기 위하여, H₂O₂ 처리에 의한 손상을 유발 했을 때 세포 생존율을 측정해보았다. 본 실험에서 산화적 스트레스 유발 물질로 사용된 H₂O₂는 쉽게 원형질막을 통과하기 때문에 *in vitro* 또는 *in vivo* 실험의 다양한 생리학적 또는 병리학적인 조건에 산화적 손상을

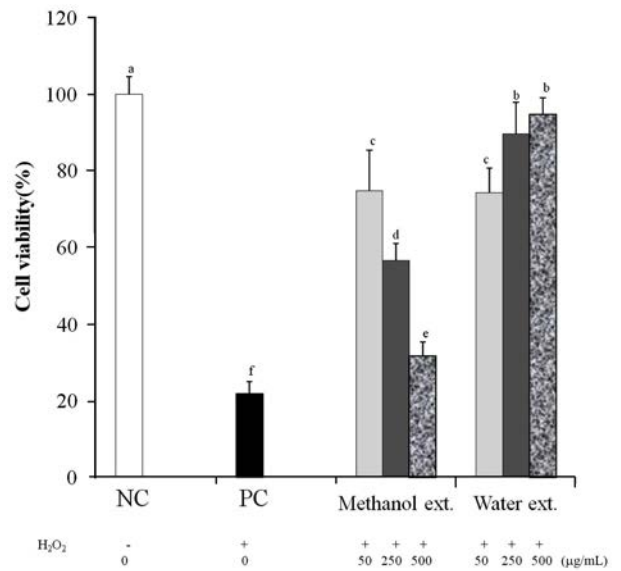


Fig. 3. Protective effects of seeds extracts from Amaranth on cell viability against H₂O₂ induced oxidative damage in L-132 cells. Cell viability was measured by MTT assay. Cells were incubated for 24 h before the addition H₂O₂. Oxidative damage was induced with 2 mM H₂O₂ for 30 min. NC: negative control, PC: positive control. Values with different letters were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value is mean±SD (n=3).

주는 독성 물질로 많이 이용되고 있다(Kim MJ et al., 2013). H₂O₂에 의해 L-132 세포 생존율은 22%로 감소하였으며, 산화적 손상에 대한 보호 효과는 500 µg/mL 농도에서 메탄올 추출물 31.2%, 물 추출물 94.8%로 물 추출물에서 높은 보호 효과를 보여주었다(Fig. 3).

본 연구에 따르면 폴리페놀과 탄닌의 함량이 메탄올 추출물보다 높은 물 추출물에서 H₂O₂ 세포내 보호활성도 높게 나타났다. 따라서 폴리페놀과 탄닌 성분이 세포내 산화적 스트레스에서 보호 효과를 보인 것으로 사료된다. 또한 미나리 발효액과 식초 시료 1000 µg/mL의 농도에서 각각 45.1%와 56.8%의 보호 효과를 보인 것과 비교했을 때 (Kim MJ et al., 2013) 아마란스 물 추출물의 활성이 매우 뛰어난 것으로 판단된다.

세포내에서 생성되는 NO 생성 억제활성

NO는 면역계에서 외부물질에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호 전달 물질로 nitric oxide synthase(NOS)의 작용에 의해 L-arginine이 L-citruline으로 변화되는 과정에서 생성되며 대부분의 조직세포에 영향을 미쳐 순환기계에서는 혈관 이완 물질로, 중추신경계에서는 신경 전달 물질로, 면역계에서는 방어 물질로 알려져 있다(Kim & Kang, 2008). 본 연구에서는 아마란스 추출물이 세포 내에서 NO 생성에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보기 위하여 대식세포 RAW 264.7에 추출물을 25, 50, 100, 250 µg/mL의 농도로 처리하였고 그 결과는 Fig. 4A와 같다. 추출물들의 RAW 264.7 대식 세포에 대한 독성은 나타내지 않았다(Fig. 4B). 아마란스 종자 추출물은 250 µg/mL의 농도에서 메탄올 추출물(12.7%)과 물 추출물(51.9%)의 억제활성을 보여주었다. 물 추출물은 시료 농도에 따라 활성이 증가하는 경향을 보

여주었으나 물 추출물은 그러한 경향이 보이지 않았으며 그 억제 활성 또한 10% 내외로 높지 않았다. 이는 700 µg/mL 농도의 보두산 메탄올 추출물이 69.5%의 NO 생성을 감소 시켰고, 보두는 38.9%, 감초는 77.4% 감소시켰다는 결과와 비교하였을 때(Kim et al., 2009) 물 추출물의 세포내 NO 생성 억제활성은 다른 천연물보다 낮은 농도에서도 우수한 활성을 보인다고 판단된다. 이와 같은 아마란스 종자추출물의 높은 NO 생성 억제활성은 염증억제 효과가 좋은 소재로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 아마란스 종자 물 추출물과 메탄올 추출물의 폴리페놀과 플라보노이드 함량 측정과 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성, SOD 유사활성을 측정하였으며 H₂O₂에 의한 산화적 스트레스에서의 세포 보호효과와 산화질소 생성 억제활성을 분석하여 새로운 식물유래 라디칼 소거활성 물질을 개발하기 위하여 시행하였다. 물 추출물의 총 폴리페놀 함량은 4.23 mg GAE/100 g이고 탄닌 함량은 0.511 mg TAE/g으로 메탄올 추출물보다 높았다. DPPH 라디칼 소거활성은 50 µg/mL의 농도에서 메탄올 추출물(5.8%)이 가장 좋았으며 물 추출물의 활성은 250 µg/mL의 농도에도 활성을 보이지 않았다. ABTS 라디칼 소거활성에서 메탄올 추출물은 250 µg/mL의 농도에서 활성이 11.1%로 가장 좋았으며 물 추출물에서는 50 µg/mL에서 11.8%의 활성을 나타내었다. SOD 유사활성에서 메탄올 추출물은 100 µg/mL농도에서 14.04%으로 가장 높은 활성이 나타났으며 물 추출물은 50 µg/mL 농도에서 18.34%의 활성이 나타났다. 아마란스 종자 물 추출물의 경우 산화적 스트레

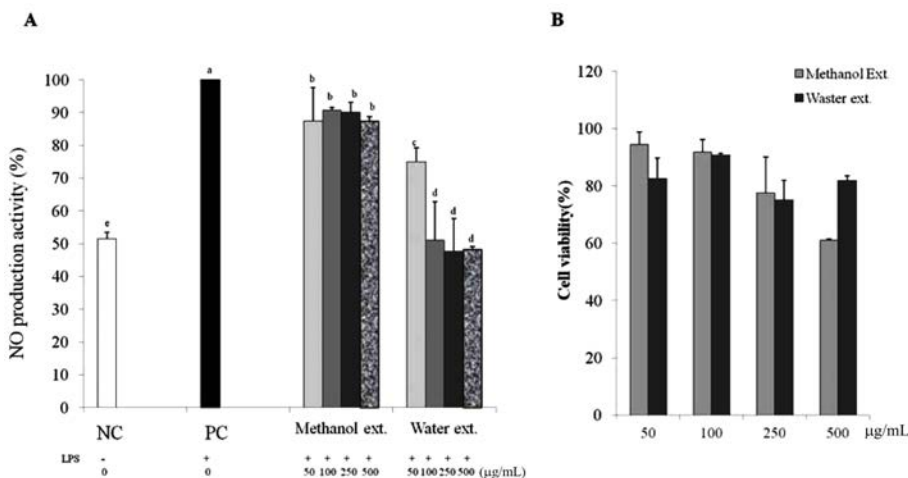


Fig. 4. A. Inhibitory effects of seeds extract from Amaranth on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages cells. NC: negative control, PC: positive control. LPS: the cell treated with LPS (20 µg/ mL), tetrahydrobiopterin (10 µg/mL), 200 mM l-arginine and IFN-γ (100 U/mL). B. Cytotoxicity of the seeds extracts in RAW 264.7 cells as determined using the MTT assay. Values with different letters were significantly different at *p*<0.05 by Duncan's multiple range test. Each value is mean±SD (n=3).

스(H_2O_2)에 의한 세포 보호 효과를 갖는 것을 확인하였다. 세포내 NO 생성 억제활성을 조사한 결과에서는 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 물 추출물이 51.9%의 가장 높은 억제활성을 보여주었다. 본 연구의 결과, 폴리페놀과 탄닌의 함량이 높은 물 추출물에서 라디칼 소거능은 낮았으나 산화적 손상에 대한 보호 효과와 NO생성억제능이 높아 강력한 항산화제로써의 활성을 보여주었다. 이러한 결과로 보아 아마란스 종자의 새로운 항산화소재로서 개발가능성을 보여주었다.

감사의글

이 연구는 서울과학기술대학교 교내 학술연구비(일부) 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Alvarez-Jubete L, Wijngaard H, Arendt EK, Gallagher E. 2010. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chem.* 119: 770-778.
- AOAC. 1990. Official Methods Analysis. 15th ed. Association of official analytical chemists, Washington, DC, USA.
- Arao MB, Cano A, Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* 73: 239-244.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Caselato-Sousa VM, Amaya-Farfán J. 2012. State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive review. *J Food Sci.* 77:93-104.
- Choi HS. 2011. Effect of adding amaranth powder on noodle quality, *J Korean J Food & Nutr.* 24: 664-669.
- de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 202-226.
- Fang FC. 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 820-832.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR, 1982 Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138.
- Han JH, Moon HK, Chung SK, Kang WW. 2013. Comparison of antioxidant activities of radish bud (*Raphanus sativus* L.) according to extraction solvents and sprouting period. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 42: 1767-1775.
- Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food. Chem.* 53: 1841-1856.
- Jeon SM, Kim SY, Kim IH, Go JS, Kim HR, Jeong JY, Lee HY, Park DS. 2013. Antioxidant activities of processed deoduck (*Codonopsis lanceolata*) Extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 924-932.
- Kang KM, Lee SH. 2013. Effects of extraction methods on the antioxidative activity of *Artemisia* sp. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1249-1254.
- Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon H, Surh YJ. 2000. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett.* 150: 41-48.
- Kim HS, Kang JS. 2008. Preparation and characteristics of bread by medicinal herb composites with immunostimulating activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 109-116.
- Kim HW, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H. 2002. Screening of edible Japanese plants for suppressive effects on phorbol ester-induced superoxide generation in differentiated HL-60 cells and AS52 cells. *Cancer Lett.* 176: 7-16.
- Kim HY, Ko JY, Song SB, Kim JI, Seo HI, Lee JS, Kwak DY, Jung TW, Kim KY, Oh IS, Jeong HS, Woo KS. 2012. Antioxidant activities of solvent fractions from methanolic extract of cockscomb (*Celosia cristata* L.) Flowers. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 1502-1507.
- Kim JS, Ryoo HJ. 2002. Application to the biscuits manufacture of processed amaranth seeds, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 15: 321-325.
- Kim KH, Kim DM, Byun MW, Yun YS, Yook HS. 2013a. Antioxidant activity of panax ginseng flower-buds fermented with various microorganisms. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 663-669.
- Kim PJ, Yun HJ, Heo SK, Kim KA, Kim DW, Kim JE, Park SD. 2009. Anti-inflammatory Effect of Bodusan. *Kor. J. Herbology.* 24: 49-56.
- Kim MJ, Choi JH, Kwon SH, Kim HD, Bang MH, Yang SA. 2013b. Characteristics of fermented dropwort extract and vinegar using fermented dropwort extract and its protective effects on oxidative damage in rat glioma C6 cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* 45: 350-355.
- Kim SH, Choi HJ, Oh HT, Chung MJ, Cui CB, Ham SS. 2008. Cytoprotective effect by antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction in human HepG2 cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40: 696-701.
- Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 626-632.
- Kim YC, Hong HD, Rho JH, Cho CW, Rhee YK, Yim JH. 2007. Changes of phenolic acid contents and radical scavenging activities of ginseng according to steaming times. *J. Ginseng Res.* 31: 230-236.
- Lee JH, Kim KJ, Lee J, Lee ST, Ryu SN. 1996a. Functional ingredient and their some variance in amaranth and quinoa. *Korean J. Crop Sci.* 41: 145-165.
- Lee JH, Moon HI, Lee JI, Kang CW, Lee ST. 1996b. Isolation and identification of squalene and antineoplastic activity of its residue extract in Amaranth. *Korean J. Crop Sci.* 41: 450-455.
- Lee NY, 2013, Antioxidant effect and tyrosinase inhibition activity of seaweeds ethanol extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1893-1898.
- Lee YM, Bae JH, Jung HY, Kim JH, Park DS, 2011. Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean edible wild plants. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 29-36.
- Lodovici M, Guglielmi F, Meoni M, Dolara P. 2001. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food Chem.*

- Toxicol. 39: 1205-1210.
- Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47: 469-474.
- Middleton E, Kandaswami C. 1994. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol.* 48: 115-119.
- Murakami A, Nakashima M, Koshihara T, Maoka T, Nishino H, Yano M, Sumida T, Kim OK, Koshimizu K, Ohigashi H. 2000. Modifying effects of carotenoids on superoxide and nitric oxide generation from stimulated leukocytes. *Cancer Lett.* 149: 115-123.
- Park SH, Cho KH, Shon YH, Lim JK, Nam KS. 2001. Testing of cancer chemopreventive potential of *Prunella vulgaris* L. aqua-acupuncture solution using biochemical markers of carcinogenesis. *Kor. J. Pharmacogn.* 32: 163-167.
- Park YJ, Kim HJ, Heo BG. 2007. An in vitro study on total phenol content, electron donor capacity and their cytotoxicity effects of extracts of four different edible flowers. *Flower Res. J.* 15: 4145.
- Qureshi AA, Lehmann JW, Peterson DM. 1996. Amaranth and its oil inhibit cholesterol biosynthesis in 6-week-old female chickens. *J. Nutr.* 126:1972-1978.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- Seo JH, Jeong YJ, Shin SR, Kim KS. 2000. Effects of tannin from astringent persimmons in alcohol fermentation for persimmon vinegars. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 407-411.
- Seo YH, Kim IJ, Yie AS, Min HK. 1999. Electron donating ability and contents of phenolic compounds, tocopherols and carotenoids in waxy corn (*Zea mays* L.). *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 581-585.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- Woo JH, Shin SL, Lee CH. 2010. Antioxidant effects of ethanol extracts from flower species of compositae plant. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 159-164.
- Yun YS, Jeong KS. 2012. Polyphenol contents of *Rumex crispus* root extract with hot water and its antioxidative effect. *J. Environ. Sci.* 21: 1265-1274.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555-559.