

홍삼으로부터 분리한 수용성 갈변물질의 항산화 활성 1. DPPH의 수소공여능 및 hydrogen peroxide 소거능 중심으로

이종원[#] · 도재호 · 심기환^{*}

한국인삼연초연구원, *경상대학교 식품공학과
(1999년 7월 16일 접수)

Antioxidant Activity of the Water Soluble Browning Reaction Products Isolated from Korean Red Ginseng 1. DPPH Radical and Hydrogen Peroxide Scavenging

Jong-Won Lee[#], Jae-Ho Do and Ki-Hwan Shim^{*}

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

^{*}Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

(Received July 16, 1999)

Abstract : The purpose of this study was to investigate the antioxidant activities of water soluble browning reaction products (WS-BRPs) isolated from korea red ginseng. Antioxidant activities of WS-BRPs were examined with the various systems. All three WS-BRPs (L, S-1 and S-2) were found to have an ability to donate hydrogen to DPPH. Especially, L was more effective than S-1, S-2. and, L as well as S-1 and S-2 was the strongest than BHT, BHA ($5 \times 10^{-4} M$), α -tocopherol (1.0×10^{-4}) and ascorbic acid ($5.7 \times 10^{-3} M$) previously known as antioxidants. These WS-BRPs (L, S-1 and S-2) also showed a synergistic effect against antioxidative activities of these antioxidants. Moreover S-2 had the strongest activity of these three WS-BRPs to scavenge free radicals such as hydrogen peroxide (H_2O_2).

Key words : *Panax ginseng*, maillard reaction, water soluble browning products, melanoidin, antioxidants.

서 론

갈색화반응은 효소적 또는 비효소적 반응으로 진행되고 있다. 비효소적으로 일어나는 Maillard reaction은 melanoidines 생성의 주된 반응이며, 그 반응물질(Maillard reaction products : MRPs)은 생체내 또는 식품내에서 다양한 항산화 활성을 나타낸다는 많은 연구가 보고되고 있다.¹⁻⁴⁾ 지금까지 갈변반응 생성물의 활성에 관한 연구는 주로 당과 아미노화합물을 대상으로 한 model system에 의한 연구가 많이 진행되었는데, 이

러한 model system에 의한 반응 생성물이나 분획물을 이용한 항돌연변이원성, 아질산염 소거능, 특히 항산화성에 대해서 많이 보고되었다.^{5,6)}

항산화제는 합성항산화제와 천연항산화제로 구분되며 합성 항산화제인 BHA, BHT, ascorbic acid, benzoic acid, *p*-oxybenzoic ester는 오랫동안 이용되어 왔으나 다량 섭취하면 유해하다는 설⁷⁾ 등에 기인하여 합성 식품첨가물에 대한 소비자의 거부반응으로 그의 수요가 급격히 감소되고 있는 추세에 있다. 따라서 이러한 Melanoidine의 항산화적 특성을 이용한 새로운 천연 항산화제 개발 및 그 이용을 적극 검토 할 수 있을 것이다.

홍삼의 갈변에 관한 연구는 김⁸⁾이 보고한 홍삼의 갈변화에 관한 연구를 비롯하여 홍삼엑기스의 색상 변화, 항산화 효과, 갈변촉진, 아미노산과 당류의 변화 등

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-866-5322; (팩스) 042-862-2522
(E-mail) jwlee@gtr.kgtri.re.kr/jeongwonlee@yahoo.com

을 조사하였는데, Han 등⁹⁾의 연구결과에 의하면 홍삼의 갈색화 반응 생성물들은 항산화 효력이 있으므로 홍삼에 함유된 지질 성분의 산패를 억제하여 품질안정에도 크게 기여할 뿐만 아니라 생체내 과산화지질 생성 억제로 노화 억제효과가 있다고 보고되고 있다. 또한 인삼의 활성검증 및 효능연구는 유기용매 추출물 대상으로 연구되어 왔으나 각종 유기용매 추출물보다는 물 추출물의 양이 훨씬 많으며, 그 중에서도 갈변물질이 상당히 많이 함유되어 있는 것으로 보고되었다.¹⁰⁾

전보에서 이미 홍삼의 갈색화 반응이 초기에서 효소적 갈색화반응, 증삼후에는 비효소적 갈색화반응이 관련된 복합적 반응에 의해 이루어지며, 홍삼의 갈변물질은 대부분 수용성 물질임을 밝혔고,¹¹⁾ 또한 홍삼 분말을 물로 추출한 뒤, 투석, 알콜 침전 및 column chromatography 등의 방법에 의해 분리한 후 기기분석 등으로 부분적 구조분석 결과를 보고하였다.¹²⁾ 따라서 본 연구에서는 고려 홍삼에서 분리한 수용성 갈변물질의 항산화 활성을 DPPH의 수소공여능 및 hydrogen peroxide 소거능 중심으로 조사한 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

1. 시료조제

홍삼 100 g(2 mm sieve 통과)에 10배 가량의 증류수를 가한 후 4°C에서 24시간씩 3회 추출하고, 4°C에서 원심분리(8,000 rpm, 20분)하여 얻은 상정액에 n-BuOH를 첨가한 후 진탕하면서 실온에서 3회 추출하여 지용성 물질과 사포닌류를 n-BuOH층으로 이행시키면서 제거하였다. 이렇게 제거된 수용성 갈변물질 분획에 55% 에탄올을 가하여 침전물을 제거한 후(Spectra, M. W.Cut-off 3,500)투석막으로 4°C에서 1일씩 3회 투석하여 투석내액(L이라고 명명)과 투석외액으로 나누었다. 투석외액의 저분자 갈변물질을 분리하기 위하여 Bio-Gel P-2로 gel chromatography상에서 분리하여 갈변물질 분획을 얻었다. Column상에서 먼저 유출되는 갈변물질 분획을 S-1, 그 다음에 유출되는 갈변물질 분획을 S-2로 명명한 후 각 시료를 동결건조하여 사용하였다.

2. 항산화 활성

(1) DPPH에 의한 수소공여능

수용성 갈변물질의 항산화능은 DPPH에 대한 수소공여능(electron donating ability, EDA)을 517 nm에서 측정하였다. 즉, 수용성 갈변물질(1%)을 0.2 ml씩 취하고

여기에 5×10⁻⁴M DPPH 용액(DPPH 12 mg을 100 ml의 에탄올에 완전히 용해시킨 후 100 ml의 증류수를 가한 액)3.5 ml를 가하여 10초 동안 진탕한 후 517 nm에서 10분간 흡광도의 변화를 측정하였다.¹³⁾ 그리고 수용성 갈변물질과 항산화제로 알려져 있는 BHA 5×10⁻⁴M, α-tocopherol 1.0×10⁻⁴, BHT 5×10⁻⁴M 및 ascorbic acid 5.7×10⁻³M 농도로 조정한 후 synergist 효과를 조사하였다.

(2) Hydrogen peroxide 소거능

과산화수소(H₂O₂)의 소거효과는 Loschen과 Roh 등¹⁴⁾의 방법에 따라 수행하였다. 즉, 수용성 갈변물질을 농도별로 첨가하여 150 mM KCl 2.0 ml와 50 mM HEPES-KOH(pH 7.4)1.8 ml를 혼합하였다. 이 혼합물을 25°C에서 10분간 반응시킨 후에 2.7 μM Scopolerin 20 μl를 가하여 반응시켰다. 냉각 후에 460 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조군은 시판 중인 30% 과산화수소를 200 μl를 첨가하여 흡광도에 대한 저해율(%)을 비교 측정하였다.

결과 및 고찰

1. DPPH에 의한 수소공여능

항산화물질의 가장 특징적인 역할이 oxidative free radical 반응을 이용한 후 환원성물질의 분석시약인 DPPH 방법에 따라 시간 경과에 따른 수용성 갈변물질

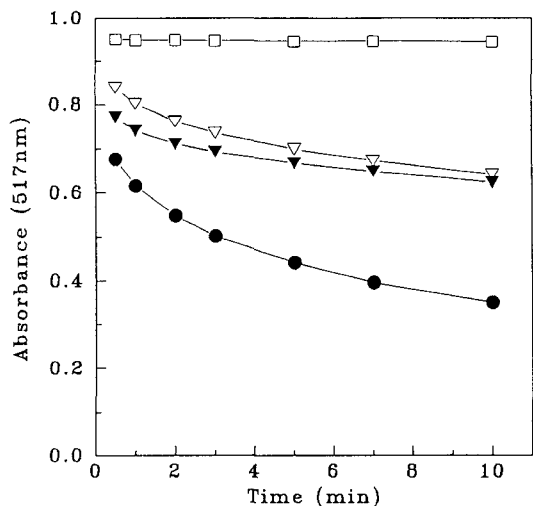


Fig. 1. Change of absorbance by the hydrogen donor properties of red ginseng WS-BRPs. □; Control, ●; L, ▽; S-1, ▼; S-2

의 수소공여능을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. L, S-1 및 S-2의 수소공여능에서 S-1과 S-2는 반응시간이 경과함에 따라 완만하게 감소하였고, L은 S-1, S-2보다 감소폭이 증가하였다. L의 반응초기에는 O.D가 0.676에서 반응후기에는 0.350으로 약 47% 정도 감소하였다. 中林 등¹⁵⁾은 인삼갈변물질의 항산화효과에 대하여 model system에서 glucose와 glycine을 수용액 중에서 가열하여 생성된 melanoidin 분자 중에는 비교적 안정한 유리가 존재하며, 산화방지제의 항산화능은 이러한 유리와 항산화능과의 관계가 있다고 보고되고 있다.

시판항산화제인 BHT, BHA, ascorbic acid, α -tocopherol과 L, S-1 및 S-2와 비교 실험한 결과는 Fig. 2와 같다. 고분자물질인 L의 경우는 BHT 5×10^{-4} M, BHA 5×10^{-4} M, α -tocopherol 1.0×10^{-4} M 및 ascorbic acid 5.7×10^{-3} M보다 강하였으며, S-1 및 S-2의 경우 반응초기 3분까지는 다른 합성항산화제 보다 약했으나 시간이 경과함에 따라 합성항산화제와 거의 비슷하게 감소하였다. 수용성 갈변물질은 DPPH와 반응하여 시간이 경과함에 따라 감소하고, 합성 항산화제인 ascorbic acid 및 α -tocopherol은 반응초기에 완료되는 결과를 보인 반면 BHT 와 BHA는 지속적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

최 등¹⁶⁾은 홍삼의 추출 용매의 극성이 강한 추출물

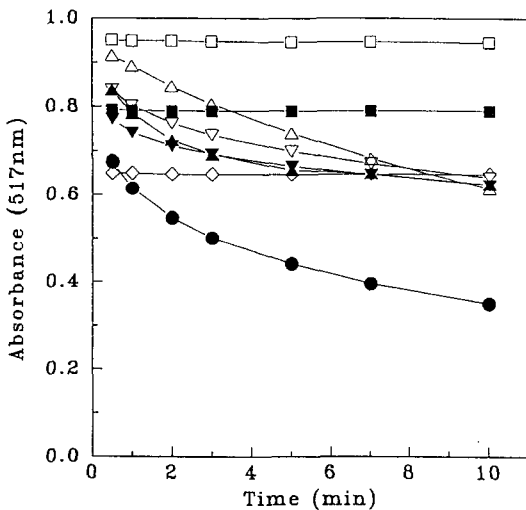


Fig. 2. Change of absorbance by the hydrogen donor properties of red ginseng WS-BRPs and the other antioxidants during the reaction with DPPH. □; Control, ●; L, ▽; S-1, ▼; S-2, ▲; BHA, △; BHT, ■; α -tocopherol, ◇; ascorbic acid

을 제외하고는 홍삼 추출물의 환원작용이 강하다고 하였다. 수용성 갈변물질의 반응시간이 증가함에 따라 환원이 증가되는 경향은 인삼추출물의 갈색화 반응이 촉진될수록 환원성이 증가되었다는 보고와 백삼에 비하여 마이야르형 갈색화 반응이 촉진된 홍삼에서 그 작용이 현저하게 증가되었다는 연구결과¹⁷⁾와 본 실험과는 유사한 경향이었다. 이와 같이 수용성 갈변물질의 항산화효과와 활성물질들은 홍삼의 노화억제효과와 상관성이 있을 것으로 생각된다.

2. 수용성 갈변물질과 합성항산화제와의 synergist 효과

BHT, α -tocopherol, BHA 및 ascorbic acid의 시판 항산화제와 수용성 갈변물질과의 synergist 효과를 조사한 결과는 Fig. 3, 4, 5 및 6과 같다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 tocopherol 1.0×10^{-4} M에 수용성 갈변물질 L, S-1, S-2를 첨가한 후 synergist 효과를 조사한 결과 α -tocopherol은 반응시간이 경과하여도 수소공여능 효과는 일정하나 α -tocopherol에 수용성 갈변물질 첨가한 시험구에서는 지속적으로 감소하여 synergist 효과가 있었다. 수소공여능의 강도는 L, S-2, S-1 및 α -tocopherol 순으로 나타났다. Fig. 4는 BHT 5×10^{-4} M과 수용성 갈변물질의 synergist 효과를 나타낸 결과인데 BHT의 경우 10분 경과시 보다 L, S-2 및 S-1 시험구가 약 2배 정도가 더 강한 항산화능을 보였으며, BHA 5×10^{-4} M (Fig. 5)과 ascorbic acid 5.7×10^{-3} M (Fig. 6) 및 수용

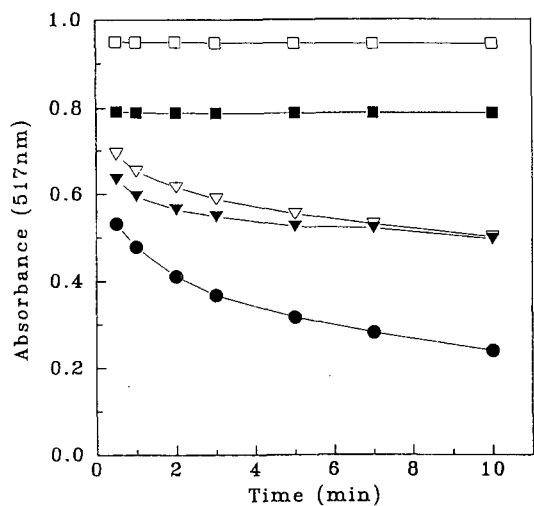


Fig. 3. Synergistic effect of red ginseng WS-BRPs on the antioxidative activities of α -tocopherol. □; Control, ■; α -tocopherol, ●; L, ▽; S-1, ▼; S-2

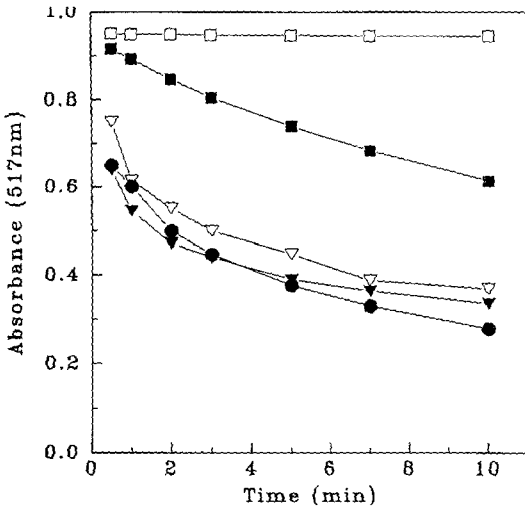


Fig. 4. Synergistic effect of red ginseng WS-BRPs on the antioxidative activities of BHT.
□; Conrol, ■; BHT ●; L, ▽; S-1, ▼; S-2

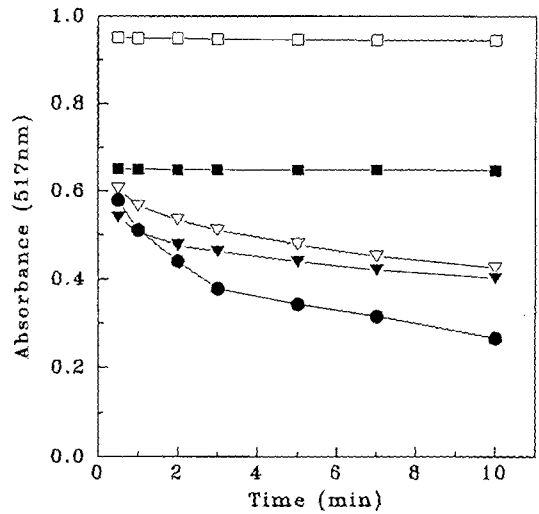


Fig. 6. Synergistic effect of red ginseng WS-BRPs on the antioxidative activities of ascorbic acid.
□; Conrol, ■; ascorbic acid ●; L, ▽; S-1, ▼; S-2.

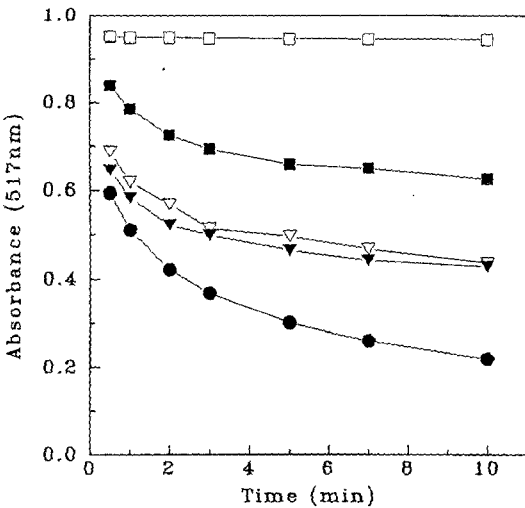


Fig. 5. Synergistic effect of red ginseng WS-BRPs on the antioxidative activities of BHA.
□; Conrol, ■; BHA ●; L, ▽; S-1, ▼; S-2

성 갈변물질과의 synergist 효과도 각각 반응시간이 경과함에 따라 synergist 효과는 더 좋았다. 시판 항산화제와 수용성 갈변물질의 synergist 효과는 있었고, 그 순서는 L, S-1 및 S-2 순으로 나타났다. 山口¹⁸⁾등은 Xylose-glycine 및 D-fructose와 각 아미노산의 반응물 및 BHT, ascorbic acid 및 α-tocopherol을 혼합하여 synergist 효과를 조사한 결과 본 실험 결과와 유사하였으며, melanoidin 그 자신이 항산화능을 갖는 것은 물론, 천연

및 합성 항산화에 의한 갈변반응 분해를 얻어 시판 합성 항산화제와 혼합하여 항산화능을 비교한 결과도 본 실험과 유사한 경향이였다. 양조간장의 항산화 작용을 나타내는 원인 물질로서 갈색물질, 아미노산 등의 질소 화합물질로 추정하고 있어 홍삼 수용성 갈변물질에서도 이런 원인물질이 확인되어 유사한 결과를 보이고 있다.¹⁹⁾ Kirigaya²⁰⁾ 등은 당, 아미노산계에서 생성된 Maillard 반응생성물은 저분자 reductone류에는 항산화성이 없으며, 항산화성의 원인물질은 최종생성물의 고분자물질 melanoidin이라고 보고하였으나, Kim²⁷⁾등은 melanoidin 분해를 ozonolysis시켜 환원성을 저하시키면서 탈색한 melanoidin에서도 항산화 활성을 나타낸다고 보고하고 있다.

3. Hydrogen peroxide의 소거능

수용성 갈변물질을 1, 5 및 10 μl의 농도별로 첨가하여 H₂O₂의 소거능을 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. L의 경우 1 μl 농도에서 51.66% 감소되었고, 10 μl 농도에서는 82.84%로 상당히 많이 감소되었다. S-1의 1 μl 농도에서 70.3%, 10 μl 농도에서 100%로 완전히 소거되었다. S-2의 농도에서는 첨가구가 100%로 완전히 소거되었다. 모든 시험구에서 농도가 증가할 수록 H₂O₂ 소거능이 증가하였다. H₂O₂ 및 SOD는 과산화지질의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 과산화 지질은 동맥경화, 뇌졸중 등의 성인병의 원인이 되고, 간장의 세포막에 과산화지질이 증가하면 세포의 기능이 저하

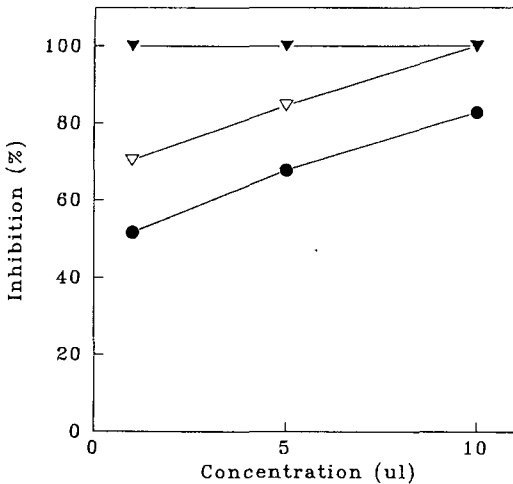


Fig. 7. Hydrogen peroxide scavenging activities by red ginseng WS-BRPs.

●; L, ▽; S-1, ▼; S-2.

되어 염증이 유발되며, 그 결과 간경화, 간염 등을 초래한다고 보고²¹⁾되고 있다.

Prapar 등²⁴⁾의 연구결과에 의하면 유해산소들은 DNA에도 손상을 주어 돌연변이를 일으킬 수 있고 나아가서는 종양이나 암의 원인이 될 수 있다는 사실이 밝혀졌다. 즉, DNA를 직접 공격하거나 이를 공격하는 2차적인 다른 radical인 lipid peroxide radical 등을 생성한다. 임 등²²⁾은 수삼, 백삼 및 홍삼의 70% 에탄올 엑스를 조제한 후 흰쥐에 경구투여한 결과 간 과산화지질은 백삼투여군과 홍삼투여군에서 현저하게 감소하였는데, 특히, 백삼투여군 보다 홍삼투여군이 더 감소한다고 보고하였다. Mitsuda²³⁾ 등은 당-아미노산 반응 melanoidin에 free radical이 존재하나 caramel 색소에는 free radical이 존재하지 않고, caramel 색소에는 항산화작용이 없는 점 등에서 free radical이 지방산에서 생성된 활성 radical을 분쇄하여 항산화성에 기여하는 것으로 설명하고 있다. 또한 melanoidin은 금속이온과 강하게 결합하고 있으므로 melanoidin의 metal scavenger로서의 작용과 항산화성과 밀접한 관계가 있는 것으로 추정된다.

결론적으로 Melanoidin 또는 MRPs들은 정확한 항산화 메커니즘에 대한 의문점이 있음에도 불구하고 이들은 일정 수준의 항산화 활성을 가지고 있다고 보고하고 있다.^{25,26)} 이들은 반응조건 특히, 반응물질의 농도와 배합율, 반응온도에 따라 이들 물질들의 항산화 활성은 서로 다른 양상을 나타낸다고 보고하고 있다.²⁰⁾ 또한

melanoidin에서 분획한 2개의 환원성 물질 중 고분자에만 강한 항산화 활성을 나타냈고, 또한 ozonolysis시켜 환원성을 저하시키면서 탈색한 melanoidin에서도 처리하지 않은 것보다 높은지 거의 같은 수준의 항산화 활성을 나타낸다고 보고하고 있다.²⁷⁾ 따라서 DPPH 수소공여능 및 Hydrogen Peroxide 소거능 실험 결과에서 WS-BRPs는 항산화 활성이 있는 것으로 확인되었다. 따라서 다양한 항산화 시스템에서 WS-BRPs 물질의 항산화 활성을 연구하고, 또 다른 기능성 생리활성 분야에도 연구를 추진할 예정이다.

요 약

홍삼에서 분리한 수용성 갈변물질의 항산화 활성을 DPPH 수소공여능 및 hydrogen peroxide 시스템에서 조사한 결과를 다음과 같다.

1. DPPH 수소공여능 : 수용성 갈변물질 S-1, S-2는 반응시간이 경과 함에 따라 완만하게 감소하였고, L은 S-1, S-2 보다 시간이 경과 함에 따라 감소폭이 증가하였다. L의 경우 BHT, BHA 5×10^{-4} M, α -tocopherol 1×10^{-4} M 및 ascorbic acid 5.7×10^{-3} M 보다 감소폭이 증가하였으나, S-1, S-2는 합성 항산화제와 감소폭이 비슷하였다.

2. Synergist 효과 : L, S-1 및 S-2 와 상기의 합성 항산화제 농도와 시너지스트 효과를 조사한 결과, 모든 시험구에서 반응 시간이 경과 함에 따라 감소폭이 증가하여 시너지스트 효과가 나타났다.

3. Hydrogen Peroxide 소거능 : 수용성 갈변물질의 hydrogen peroxide 소거능을 조사한 결과, L은 50~80%, S-1은 70~100%, S-1은 모든 첨가구에서 반응 초기부터 100%로 완전히 소거되었다.

인 용 문 헌

- Namiki, M : *Adv. Food Res.* **32**, 115 (1988).
- 최홍식, 이정수, 문갑순, 박진영 : *한국식품과학회지* **22**, 332 (1990).
- Oimomi, M. and Hayase, F. : *Nippon Nogeikakaku Kai-shi* **61**, 987 (1987).
- 문갑순, 최홍식 : *한국식품과학회지* **19**, 537 (1987).
- Namiki, M. and Hayase, F. : *Am. Chem. Soc. Washinton* **215**, 21 (1983).
- Mathew, A. C. and Parpia, H. A. B. : *Adv. Food. Res.* **19**,

- 75 (1971).
7. Hathway, D. E. : *Academic press, New York*, **15**, 1 (1966).
 8. 김동연 : *한국농화학회지* **16**, 60 (1973).
 9. Han, B. H., Park, M. W., Woo, L. K., Woo, W. S. and Han, Y. N. : *Proc. of 2nd Intl. Ginseng Symp. Seoul Korea*, p.13 (1978).
 10. 이종원, 이성계, 도재호, 심기환 : *고려인삼학회지* **3**, 244 (1995).
 11. 이종원, 이성계, 도재호, 성현순, 심기환 : *고려인삼학회지* **3**, 249 (1995).
 12. 이종원, 고희룡, 심기환 : *한국식품영양학회지* **5**, 499 (1998).
 13. Blois, M. S. : *Nature* p.1981 (1958).
 14. Loschen, G. Flohe, L and Chance, B. : *FEBS Lett* **18**, 261 (1971).
 15. 中林敏良, 木村進, 加 博通 : *食品と變色とその化學, 光琳書院, 東京*, p.223 (1967).
 16. Ando, T., Tanaka, O. and Shibata, S. : *Soyakugaku Zasshi* **25**, 8 (1971).
 17. 도재호, 김경희, 장진규, 양재원, 이광승 : *한국식품과학회지* **21**, 480 (1989).
 18. 山口直彦, 小山吉人. : *日本食品工業學會誌* **14**, 281 (1967).
 19. 문갑순, 최홍식 : *한국식품과학회지* **9**, 537 (1987).
 20. Kirigaya, N., Kato, H. and Fujimaki, M. : *Agric. Biol. Chem.* **32**, 287 (1968).
 21. 美濃眞 : *老化, 化學人, 東京*, p.27
 22. 임창진, 박은희, 이동권, 홍순근 : *약학회지* **25**, 65 (1981).
 23. Mitsuda, H. Yasumoto, K Iwami, K. : *營養と食糧* **19**, 210 (1989).
 24. Prapar, H. D. and Bird, R. P. : *J. Agric. Food Chem.* **32**, 433 (1984).
 25. Yamaguchi, N., Koyma, Y. and Fujimaki, M. : *Prog. Food Nutrition Sci.* **5**, 429 (1981).
 26. Yamaguchi, N. : *Dev. Food Nutrition Sci.* **13**, 291 (1986).
 27. Kim, S. B., Hayase, F. and Kato, H. : *Argic. Biol. Chem.* **49**, 795 (1985).