

## 갯김치 Chlorophylls 및 Carotenoids의 항산화 효과

송은승 · 전영수 · 최홍식<sup>†</sup>

부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소

### Antioxidative Effect of Chlorophylls and Carotenoids in Mustard Leaf *Kimchi* Activity

Eun-Seung Song, Yeong-Soo Jeon and Hong-Sik Cheigh<sup>†</sup>

Dept. of Food Science and Nutrition and Kimchi Research Institute, Pusan National University,  
Pusan 609-735, Korea

#### Abstract

Antioxidative effects of crude chlorophylls and carotenoids extracts from mustard leaf *kimchi* on the lipid peroxidation in rat liver homogenate, egg phosphatidyl choline (EPC) liposome and superoxide anion radical were examined. The extracts were found to inhibit the increase of the thiobarbituric acid (TBA) value and show the effect of antioxidative activity on the liposomal phospholipid membrane. The oxidation index of EPC liposome was markedly decreased in the presence of the extracts. The antioxidative activity of the extracts from mustard leaf *kimchi* was not related with fermentation period of the *kimchi*. The extracts from mustard leaf showed the similar antioxidative activity to  $\alpha$ -tocopherol within in the given level of addition. However, the extracts from red pepper powder containing only carotenoids showed high levels of the TBA value and the oxidation index. When the effect of the extracts from mustard leaf *kimchi* on free radical scavenging was observed by the determination of the superoxide anion radical scavenging activity, it had similar value to that of  $\alpha$ -tocopherol.

**Key words:** chlorophylls, carotenoids, mustard leaf *kimchi*, rat liver homogenate, EPC liposome, superoxide anion radical

#### 서 론

지질의 산화는 free radicals와의 상호반응에 의해 hydroperoxide가 생성되며 이것의 산화분해 및 중합반응에 의해 다양한 2차 생성물이 생성되어 번개의 원인물질이 만들어진다(1). 이는 금속제거제나 각종 항산화제에 의해 억제되는데 항산화 특성을 갖고 있는 물질들이 항돌연변이원성 및 항암성을 함께 가지므로 이들의 상호관련성, 기본 메카니즘, 그리고 이들 물질들의 탐색에 관한 연구가 진행되고 있다 많은 연구결과들은 항산화물질들이 지니고 있는 radical scavenger로서의 기능과 peroxides 및 singlet oxygen 생성억제 능력 등이 결국 항돌연변이원성 및 항암성 그리고 항노화성에까지 깊이 관여하고 있다고 보고하고 있다(2-4) 식품에 함유되어 있는 항산화제로는 tocopherol, L-ascorbic acid, carotenoids, 함황아미노산 및 아미노산 유도체, glutathione, 갈변물질과 flavonoids를 비롯한 페놀화합물 등이 있다(5-7).

갯김치는 sinigrin이 다량 함유되어 있어 숙성 중에 갯 자체의 myrosinase의 작용을 받아 여러가지 합황성분과 그

관련물질이 생성되어 독특한 매운맛과 향균성을 부여한다(8,9). 또한 다른 김치에 비하여 쉽게 산패되거나 연화되지 않고, 칼슘과 칼륨 등의 함량이 높아 무기질 공급원으로도 중요하다 하며, 특히 항산화성이 있는 것으로 알려진 ascorbic acid, chlorophylls,  $\beta$ -carotene의 함량이 타 경엽채소류의 김치에 비하여 많이 함유되어 있다(10,11). 갯김치의 chlorophyll 색소는 주로 갯에 의한 것으로 chlorophyll a 41 mg%, chlorophyll b 15 mg%를 함유하며 배추, 상치보다 그 함유량이 높다 갯김치의 carotenoids는 갯과 고추가루에서 기인하는데 갯에는 carotenoids 4.75 mg%로  $\beta$ -carotene, lutein 등을 주로 함유하는데 타 경엽채소류보다 그 함량이 높고 고추가루에는 carotenoids 175.6 mg%로 capsanthin,  $\beta$ -carotene이 주요 색소성분으로 알려져 있다(10). 광선이 차단된 상태에서 chlorophylls는 hydroperoxide가 형성되기 전 자동산화의 초기단계에서 생성된 유리기와 반응하여 항산화성을 나타내며, carotenoids의 많은 공액 이중결합이 singlet oxygen quencher로서의 특성을 나타낸다고 보고되고 있다(12).

갯김치의 chlorophylls와 carotenoids의 항산화성을 지방

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: hscheigh@hyowon.pusan.ac.kr  
Phone 82-51-510-2838, Fax: 82-51-583-3648

산의 자동산화 과정에서 전보(13)에서 연구한 바 있으나, 생체조직 또는 산화효소계에 미치는 영향을 살펴볼지 못했다. 따라서 본 연구에서는 생체조직의 복잡한 구조와 특이성 때문에 여러물질들과의 상호작용을 규명하기 어려운 실정이므로 직접 이용하지 못하고, rat liver homogenate와 인공인 지질막인 egg phosphatidyl choline liposome을 조제하여 갖김치에서 추출한 chlorophylls와 carotenoids분획의 항산화성을 살펴보았으며, 또한 산화효소계에 대한 저해활성을 superoxide anion radical 소거활성을 측정하여 나타내었다.

## 재료 및 방법

### 실험재료와 김치제조

본 실험에 사용한 갖과 양념, 김치 제조방법은 전보(13)와 같이 행하였다.

### Crude chlorophylls와 carotenoids 분획의 조제

동결건조시킨 갖 및 발효기간이 다른 갖김치, 고춧가루를 AOAC법(14)에 따라 acetone-diethyl ether로 추출하여 crude chlorophylls와 carotenoids(CCC) 분획을 얻었다. 각각의 동결건조 시료 10 g에 들어있는 CCC 분획의 함량은 갖 180 mg (chlorophylls : 85.0 mg, carotenoids : 10.5 mg), 갖김치 225 mg (chlorophylls : 72.3 mg, carotenoids : 51.4 mg), 고춧가루 210 mg (carotenoids : 175.5 mg)이었다.

### Rat liver homogenate 조제와 항산화성 분석

Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷(1주령, 150 g)을 1주일 동안 사육하여 15시간 절식시킨 후 간을 적출하였다. 생리식염수에 간을 담귀 이 물질을 제거하고 잘게 잘라 150 mM KCl-10 mM phosphate buffer(pH 7.4)를 가해서 5%(w/v) 농도가 되게 조직마쇄기로 마쇄시킨 후 homogenate를 조제하였다(15). 5% rat liver homogenate 0.3 mL, 150 mM KCl-10 mM phosphate buffer, 20  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>, 0.5 mM ascorbic acid, 일정한 농도의 항산화성 물질을 첨가하여 반응액 전량이 1.0 mL가 되게 하여 37°C에서 60분간 incubation시킨 후 TBA값을 측정하였다. 즉 반응액 1 mL에 반응정지액(41.6 mg TBA + 16.8%TCA/0.125 N HCl 10 mL + 6.8 mM BHT/ethanol 1 mL) 3 mL를 가해 95°C에서 30분 가열한 후 냉각시키고 3,000 g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 정도를 분석하였다(16).

### Egg phosphatidyl choline (EPC) liposome 조제와 항산화성 분석

일정량의 인지질(EPC)을 CHCl<sub>3</sub>에 녹인 후 감압 증류시키고, 건조 피막을 만들었다. 항산화 물질을 함유한 liposome도 인지질에 일정량을 가한 후 같은 방법으로 하여 건조피막을 만들었다(17,18). 이렇게 만든 인지질 건조피막에 10 mM Tris-buffer(pH 7.4)용액을 가하여 30분간(0°C에서 2~3분 실시, 1분 쉼 반복) 20KHz로 Ultrasonicate(Ultrasonic proc-

essor, W-385, U.S.A.)처리한다. Ultrasonication 후에 10,000 g에서 30분 동안 원심 분리하여 probe particle과 undispersed phospholipid를 제거하고 상등액을 사용하여 liposome을 조제하였다. 조제된 liposome에 인위적으로 산화제인 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 30  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>를 넣어서 과산화물을 생성시킨 후, 5일 동안 생체온도인 37°C 항온기에 방치하면서 24시간마다 산화지수를 측정하였다. 산화지수는 지질 고유 흡수대인 215 nm에서의 흡광도와 과산화지질 흡수대인 233 nm에서의 흡광도비(233 nm/215 nm)로서 나타내었다(17,18)

### Superoxide anion radical 소거활성 측정

Superoxide anion radical 소거 활성의 측정은 superoxide dismutase 활성 측정법을 이용하였다(19,20). 50 mM pH 7.5 phosphate buffer 3 mL에 10<sup>-4</sup>M EDTA, 10<sup>-5</sup>M cytochrome C, 5 × 10<sup>5</sup>M xanthine의 농도가 되도록 반응액을 조제하여 항산화성물질을 일정한 농도로 ethanol에 녹여 0.1 mL 첨가하고 xanthin oxidase 희석액(550 nm에서 1분당 흡광도 변화가 약 0.025 가량 되도록 희석하였다.) 0.1 mL를 가하여 반응을 개시하였다. 반응 개시 후 60초간의 흡광도 변화를 550 nm에서 측정하였다. 활성은 cytochrome C의 환원을 50% 억제하는데 필요한 superoxide dismutase의 양(1분당 0.0125의 흡광도 변화)을 1 U로 계산하였고, 그때의 시료량을 IC<sub>50</sub>으로 나타내었다(21).

### 통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과를 one way ANOVA(analysis of variance)로 검사한 후 Duncan's multiple range test로 각 군의 평균간의 유의성을 검정하였다(22).

## 결과 및 고찰

### Rat liver homogenate에 대한 항산화성

Rat liver homogenate에 산화촉진제인 FeSO<sub>4</sub> 및 ascorbic acid를 첨가하여 지질의 과산화반응을 촉진시킨 후 여기에 갖김치의 CCC분획을 첨가하여 생체 온도인 37°C에서 50분 동안 반응시켰을 때 TBA값의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 지방질의 자동산화에 대한 실험에서는 갖김치의 CCC분획이  $\alpha$ -tocopherol보다 항산화성이 높았으나 rat liver homogenate에서는  $\alpha$ -tocopherol보다 TBA값이 높게 나타났다. 갖김치의 주재료인 갖과 부재료인 고춧가루의 CCC분획에 대해서 실험한 결과는 Fig 2와 같다. 높은 함량의 chlorophylls과 carotenoids를 함유하는 갖의 CCC분획은  $\alpha$ -tocopherol과 거의 비슷한 수준으로 rat liver homogenate의 과산화를 억제하여 낮은 TBA값을 나타내었으나 carotenoids만을 함유하는 고춧가루는 갖의 항산화성과는 큰 차이를 나타내어 높은 TBA를 나타내었다.

Sato 등(15,16)은 chlorophyll 유도체인 sodium copper chlorophyllin(SCC)이 rat liver homogenate의 산화에 미치는

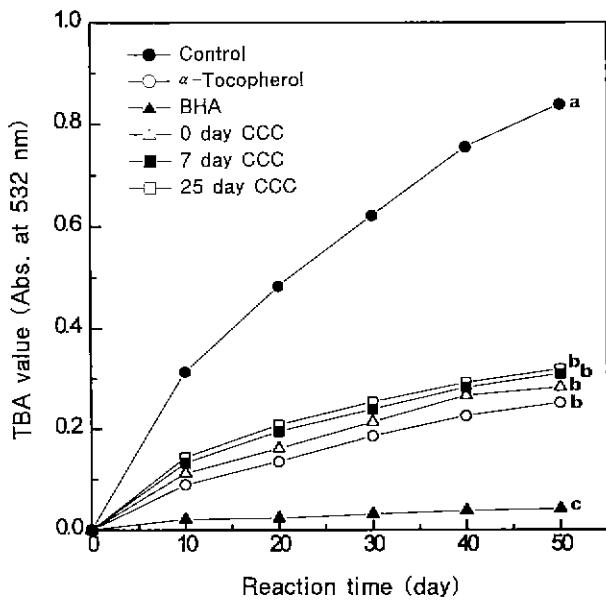


Fig. 1. Antioxidative activities of crude chlorophylls and carotenoids (CCC) extract of mustard leaf *kimchi* (MLK) on lipid peroxidation in rat liver homogenates at 37°C for 50 mins. Each extract was added 0.02% respectively. The different letters are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test (n=3).

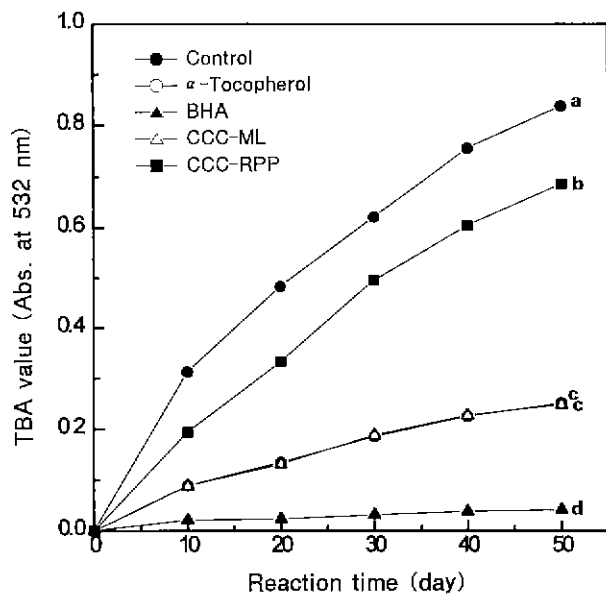


Fig. 2. Antioxidative activities of crude chlorophylls and carotenoids (CCC) extract of mustard leaf (ML) and red pepper powder (RPP) on lipid peroxidation in rat liver homogenates at 37°C for 50 mins. Each extract was added 0.02% respectively. The different letters are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test (n=3).

영향을 관찰했는데 SCC가 Fe<sup>2+</sup>와 ascorbic acid에 의해 촉진되는 liver homogenate의 산소 흡수를 저해함으로써 지질 과산화반응을 억제하고 이러한 항산화성은 SCC의 농도가

높을수록 증가한다고 보고하였다. SCC의 구리 복합물 화학구조가 항산화성에 기여하며 chlorophyll은 porphyrin 화합물의 마그네슘이 chelate형으로 존재할 때 항산화력이 증가된다고 한다(12).

EPC liposome에 대한 항산화성

생체막의 복잡한 구조와 특이성 때문에 생체막을 이용하여 여러물질과의 상호 작용을 알아보기 어려운 실정이므로 세포막의 주요성분인 인지질막, 즉 egg phosphatidyl choline (EPC)으로 EPC liposome을 만들어 갓김치의 CCC분획이 Fe<sup>2+</sup>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가하여 인위적으로 산화시킨 인지질 liposome 자체의 산화에 미치는 영향을 살펴본 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Klem에 의한 산화지수(oxidation index)는 지질 고유 흡수대인 215 nm에서의 흡광도에 대한 conjugated diene, hydroperoxide 및 peroxide 등의 과산화지질 흡수대인 233 nm의 흡광도 비(Abs. 233 nm/Abs. 215 nm)를 나타낸 것으로써, 5일 동안 반응시킨 후 EPC liposome은 0.87, 갓김치 CCC분획을 첨가한 EPC liposome은 0.5~0.6의 산화지수를 나타내어  $\alpha$ -tocopherol의 경우와 비슷한 항산화 효과를 나타내었다. Shin 등(23)은 liposome내 함유된  $\alpha$ -tocopherol은 순수 EPC liposome의 산화를 지연시켰으며, 특히 대두 saponin은 EPC liposome에 대한  $\alpha$ -tocopherol의 항산화 효과를 촉진시켰다고 보고하였다.

갓김치 구성분인 갓과 고추가루가 EPC liposome에 대한 항산화 효과를 살펴본 결과는 Fig. 4와 같다. Chlorophylls

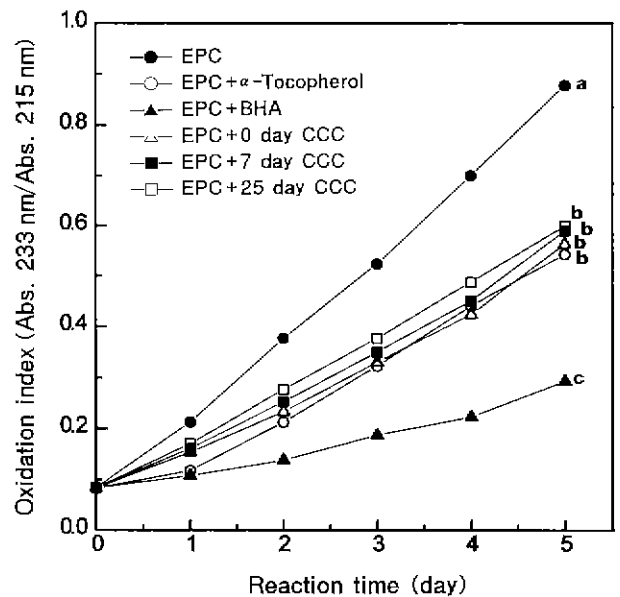


Fig. 3. Oxidation of egg phosphatidyl choline (EPC) liposomes by addition of crude chlorophylls and carotenoids (CCC) extract of mustard leaf *kimchi* (MLK). The oxidation index was expressed as absorbance at 233 nm/absorbance at 215 nm. Each extract was added 0.02% respectively. The different letters are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test (n=3).

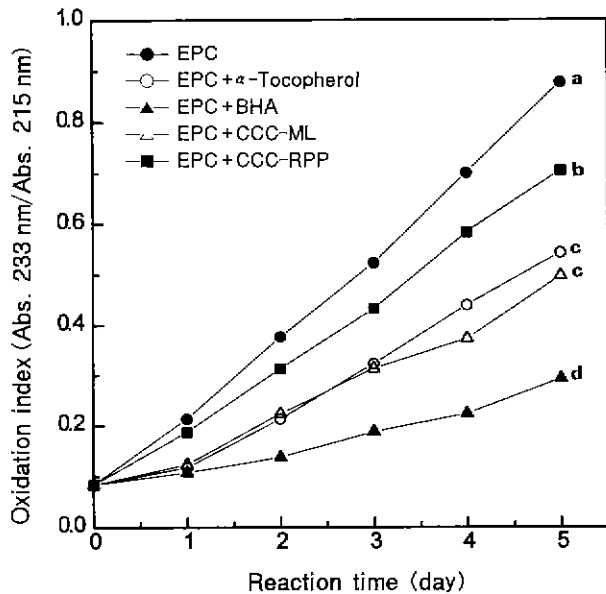


Fig. 4. Oxidation of egg phosphatidyl choline (EPC) liposomes by addition of crude chlorophylls and carotenoids (CCC) extract of mustard leaf (ML) and red pepper powder (RPP). The oxidation index was expressed as absorbance at 233 nm/absorbance at 215 nm. Each extract was added 0.02% respectively. The different letters are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test (n=3)

및 carotenoids 함량이 높은 갖의 CCC분획이  $\alpha$ -tocopherol을 첨가한 EPC liposome보다 낮은 산화 지수를 나타내었다. 이와 같은 결과는 앞에서 살펴 본 rat liver homogenate에 대한 결과(Fig. 2)와 유사한 경향을 보였다.

#### Superoxide anion radical 소거 활성

갖김치의 CCC분획이 생체내 산화효소계에 대해 저해활성을 나타내는가를 알아보기 위하여 superoxide anion radical 소거 활성을 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. 갖김치의 CCC분획은  $\alpha$ -tocopherol과 유사한 수준의 superoxide anion radical 소거 활성을 가지는 것을 볼 수 있었다. 따라서 갖김치가 항산화기능을 가지는 훌륭한 전통식품으로서 가치가 있으리라고 사료된다.

산소에서 유래되는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, singlet oxygen 및  $H_2O_2$  등의 활성산소가 노화, 암 등에 대한 영향이 계속 보고되고 있으며, 이들의 제거에 대한 관심이 높아지고 있다(3). 특히 이들은 주로 불포화 지방산이 풍부한 생체막에서 유리라디칼 반응에 관여함으로써 지질 과산화물을 일으키며 지질 외에도 생체내 구성물질인 단백질, 아미노산, 펩티드 및 효소, 당질, DNA 등에 비특이적으로 작용하여 세포의 구조적 기능적 손상을 야기하며 각종 염증, 암 등을 비롯한 생체내 이상을 초래한다고 알려져 있다(24,25). 활성산소 및 각종 유리라디칼에 의해 야기되는 과산화반응과 각종 산소에 대한 생체내 방어 기구가 다각도로 연구되고 있는데 대표적인 것으로서 superoxide dismutase,

Table 1. Superoxide radical scavenging activity of crude chlorophylls and carotenoids (CCC) extract from mustard leaf *kimchi* in xanthine/xanthine oxidase-superoxide radical generating system

	Unit (U/mg) <sup>1)</sup>	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g) <sup>2)</sup>
0 day-CCC	91.1 <sup>ab3)</sup>	11.0 <sup>a</sup>
7 day-CCC	90.1 <sup>a</sup>	11.1 <sup>d</sup>
25 day-CCC	89.9 <sup>a</sup>	11.1 <sup>a</sup>
BHA	216.0 <sup>b</sup>	4.6 <sup>b</sup>
$\alpha$ -tocopherol	88.0 <sup>a</sup>	11.4 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup> Calculated by superoxide dismutase unit.

<sup>2)</sup> Inhibition of 50% cytochrome C reduction.

<sup>3)</sup> The different letters in column are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test (n=3).

catalase 및 glutathione peroxide 등의 효소, tocopherol, ascorbic acid, riboflavin, uric acid, selenium 등의 항산화 영양소 또는 항산화력을 갖는 혈청 단백질인 ceruloplasmin, transferrin, ferritin 등이 밝혀져 있다(24). 갖김치의 CCC분획이 생체내 산화효소계에 대해 저해활성을 나타내는가를 알아보기 위하여 superoxide anion radical 소거 활성을 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. 갖김치의 CCC분획은  $\alpha$ -tocopherol과 유사한 수준의 superoxide anion radical 소거 활성을 가지는 것을 볼 수 있었다. 따라서 갖김치는 항산화기능을 가지는 훌륭한 전통식품으로서 가치가 있으리라고 사료된다.

#### 요 약

갖김치의 chlorophylls와 carotenoids의 항산화성을 연구하기 위하여 crude chlorophyll와 carotenoids(CCC)분획을 추출하여 rat liver homogenate 및 EPC liposome의 산화에 대한 항산화 효과를 TBA가 변화 및 산화지수로서 측정하여 나타내었다. 갖김치의 CCC분획은  $\alpha$ -tocopherol과 비슷한 수준으로 항산화 활성을 보였으며, 발효기간에 따른 항산화성을 비교하였을 때 유의적으로 차이를 나타내지 않았다(p > 0.05). 높은 함량의 chlorophylls와 carotenoids를 함유하는 갖의 CCC분획은  $\alpha$ -tocopherol과 같은 수준으로 산화를 억제하였으나 carotenoids만을 함유하는 고춧가루는 갖의 항산화성과는 큰 차이를 보여 높은 TBA값과 산화지수를 나타내었다. 산화효소계에 대한 저해활성을 superoxide anion radical 소거활성을 측정하여 나타내었을 때  $\alpha$ -tocopherol과 유사한 수준이었다.

#### 문 헌

1. Simic, M.G., Jovanovic, V and Niki, E. *Lipid oxidation in food*. Am. Chem. Soc., Washington, DC, p.14 (1992)
2. Simic, M.G., Tayler, K.A., Ward, JF and Von Sonntag, C.: *Oxygen radicals in biology and medicine* Plenum press, New York, p 60 (1988)

3. Liu, D X., Wen, J., Liu, J. and Li, L.P. : The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis, Reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipid. *FASEB J.*, **13**, 2318-2328 (1999)
4. Diplock, T.A. : Antioxidant nutrients and disease prevention. *Am J. Clin. Nutr.*, **53**, 189-193 (1991)
5. Cheigh, H.S., Lee, J.S. and Lee, C.Y. - Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**, 570-573 (1993)
6. Cheigh, H.S. and Park, K.Y. Biochemical, microbiological and nutritional aspects of *kimchi* (Korean fermented vegetable products) *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32**, 109-115 (1994)
7. Cheigh, H.S. : Biochemical characteristics of *kimchi*. *J. East Asian Soc. Dietary Life*, **5**, 89-101 (1995)
8. Cho, Y.S., Park, S.G., Jun, S.S., Moon, J.S. and Ha, B.S. : Proximate sugar and amino acid composition of *dolsan* leaf mustard. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**, 48-52 (1993)
9. Park, S.G., Cho, Y.S., Park, J.R., Jun, S.S. and Moon, J.S. : Changes in the contents of sugar, organic acid, free amino acid and nucleic acid-related compounds during fermentation of mustard leaf *kimchi*. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 48-53 (1995)
10. Cho, Y.S., Ha, B.S., Park, S.G., and Jun, S.S. : Contents of carotenoids and chlorophylls in *dolsan* mustard leaf. *Korean J. Dietary Culture*, **8**, 153-157 (1993)
11. Kim, J.I. : Studies on the antioxidative flavonoids and nucleoside of mustard leaf *kimchi*. *Ph.D. Dissertation*, Pusan National University p.60-90 (2000)
12. Gross, J. : *Pigments in vegetables* : Chlorophylls and carotenoids. An AVI Book, New York, p3-112 (1991)
13. Song, E.S., Jeon, Y.S. and Cheigh, H.S. : Changes in chlorophylls and carotenoids of mustard leaf *kimchi* during fermentation and their antioxidative activities on the lipid oxidation. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **26**, 563-568 (1997)
14. A.O.A.C. : *Official Methods of Analysis* 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., p.942 (1990)
15. Sato, M., Imai, K. and Murata, T. : Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. III The antioxidative activities of the commercial preparations of sodium copper chlorophyllin. *Yakugaku Zasshi*, **100**, 580-583 (1980)
16. Sato, M., Fujiura, H., Imai, K. and Murata, T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. IV. The antioxidative action of copper chlorins. *Yakugaku Zasshi*, **100**, 941-944 (1980)
17. Huang, C.H. and Lee, L.P. Diffusion studies on phosphatidylcholine vesicles. *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 234-239 (1973)
18. Barenholz, Y., Gibbes, D., Litman, B.J., Goll, J., Thompson, T.E. and Carlson, F.D. : A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **16**, 2806-2810 (1977)
19. McCord, J.M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6053 (1969)
20. Beyer, W.F. and Fridovich, I. : Assaying for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.*, **161**, 559-561 (1987)
21. Lynch, R.E. and Fridovich, I. : Effects of superoxide on the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.*, **253**, 1838-1841 (1978)
22. 채서일, 김범중. SPSS/PC + 를 이용한 통계분석. 범문사, 서울, p.66-80 (1989)
23. Shin, M.O., Bae, S.J. and Kim, N.H. : Antioxidant effect of soyasaponin on the liposomal phospholipid membrane. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 381-385 (1992)
24. Draper, H.D. and Bird, R.P. : Antioxidants and cancer. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 433-438 (1984)
25. McCord, J.M. : Free radicals and inflammation. *Science*, **185**, 529-533 (1974)

(2001년 3월 13일 접수)