

천연보존제로서 한국산 무 및 종자 단백질의 생화학적 특성 : 항유전독성 및 세포독성에 미치는 영향

최윤혁 · 황철원^{1*}

한동대학교 생명공학연구소, ¹한동대학교 기초학부

Received May 9, 2005 / Accepted June 22, 2005

The Biochemical Properties of Korean radish (*Raphanus sativus* L.) and Its Seed Protein as a Natural Preservative : The Influences on Antigenotoxicity and Cytotoxicity. Yoon-Hyeok Choi and Cher-Won Hwang^{1*}. *Institute of Bioscience and Technology, Handong Global University, Pohang, 791-708, Korea, ¹School of Liberal arts, Handong Global University, Pohang, 791-708, Korea* – In this study, we report antigenotoxicity and cytotoxicity of Korean Radish extract (RJ) and its seed protein (RSP) to non-tumoral 3T3 cell line. In the case of antigenotoxicity, each cell line was treated with 10 μ l of 100 μ g/ml N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) before adding 10 μ l of 10 mg/ml RJ and 1 mg/ml RSP to the cell. Both RJ and RS were shown 30% and 43% of antigenotoxicity respectively. As a result of quantitative analysis for lactose dehydrogenase (LDH), no cytotoxic activity against 3T3 cells was detected when the cells were treated with various concentrations of RJ and RSP. RSP showed 85% of antimicrobial activity against cosmetic sample (C1) assumed as contaminated by bacteria. RSP and RJ showed 79% and 76% of antimicrobial activities respectively on another cosmetic sample (C4, contaminated by fungi) were treated with 10 mg/ml RJ and 1 mg/ml RSP

Key words – natural preservative, antigenotoxicity, cytotoxicity, radish (*Raphanus sativus* L.), antimicrobial activity

WTO와 농산물 개방으로 인한 국내의 생물산업은 환경친화적이며 고 기능성을 가지는 상품으로 옮겨가고 있으며[5], 이는 식·음료 분야 뿐 아니라 미용의 축을 이루는 화장품 산업에서도 상용화 되고 있다[8]. 화장품 산업에서는 천연물 유래의 기능성화장품이 많이 개발 되어지고 있으나[12], 천연 기능성분의 혼합으로 이루어진 기능성 화장품은 미생물의 생육에 좋은 영양원으로 작용하기에 유효 기능성분의 보존에 어려움이 함께 존재한다. 현재 사용되고 있는 FDA 승인 화장품 보존제로서는 methyl paraben을 비롯하여 ethyl-, propyl-, butyl paraben과 imidazolidinyl urea, phenoxyethanol 등이 사용되어 지고 있으며[10] 이들 성분은 대부분 세균 및 곰팡이 등 오염균주의 세포막을 파괴하는 물질들이다. 하지만 이들 화학합성 보존제의 경우 눈, 호흡기 계통 및 피부의 자극원으로서 피부가 민감한 사람들에게는 피부트러블 및 알러지 등의 부작용을 유발하는 문제점이 우려되나[11] 이들의 사용은 불가피한 상황이다. 이를 극복하기 위해 백자단백질, ϵ -polylysine, lysozyme, 에탄올, 펙틴 분해물, Graphfruit 종자 추출물, 키토산 등이 사용되고 있으나[1] 경제적 혹은 기술적인 문제로서 산업적 수준에서의 이용에 제약이 따르는 실정이다. 이에 친환경적이며 안전성이 보장된 보존제의 개발이 요구되고 있으며 이들의 응용은 화장품 뿐 아니라 식품

등 관련사업에 부가가치를 더할 것으로 기대 된다.

본 연구진은 사전연구를 통해 한국산 무 및 그 종자 추출물로부터 강한 항균활성을 확인한 바 있다[4,9]. 무는 우리나라에서 배추와 더불어 국내 채소 총생산량의 약 60%를 차지하는 우리에게 친숙한 작물로서, 여러 가지 소화촉진 효소를 비롯하여 항산화 활성 및 항균활성이 있는 것으로 알려져 있어[7] 이에, 본 연구는 식품소재로서 친근한 무와 그 종자추출물의 항균활성을 천연물 보존제로 활용하기 위하여 항유전독성 및 세포독성을 COMET assay와 lactose dehydrogenase (LDH) 정량분석을 통해 확인하여 독성을 유발하지 않으면서 동시에 항균활성을 가지는 천연보존제의 개발과 더불어 WTO 체제하에서 우리농산물의 부가가치 극대화를 목표로 한국산 무의 이용가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

시료의 조제

무 추출물을 만들기 위하여 포항시 죽장면 일대의 고랭지에서 생산된 김장용 무의 일종인 백운무를 구입하였다. 이를 수세 및 분쇄한 후 여과지를 통하여 걸러진 여액을 8,000 rpm에서 원심분리 함으로서 고형물을 제거하였으며 이를 동결건조하여 무추출물(Radish Extract : RJ) 시료를 조제하였다. 종자 단백질을 경우 50 g의 백운 무 씨앗을 수세 후 10 배 부피의 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충액을 첨가한 다음 분쇄하였다. 이 분쇄액을 4°C에서 1일간 침지시킨 다음 거즈

*Corresponding author

Tel : +82-54-260-1304, Fax : +82-54-261-4603

E-mail : chowon@han.ac.kr

및 여과지를 통해 1회씩 거른 후 얻어진 여액을 12,000 rpm에서 원심분리하여 상청액만을 분리한 뒤 0.4 μm 여과막을 통해 고형물을 제거한 조단백질 용액을 얻어내었다. 조단백질 용액은 DEAE-cellulose 음이온교환 크로마토그래피를 통하여 활성을 나타내는 비흡착 분획을 분리하였으며, 이를 동결건조를 통하여 재 농축 한 뒤 sephadex G-50 젤 크로마토그래피를 통하여 약 6 kDa 크기의 활성분획(Radish seed protein : RSP)을 분리하여 실험에 사용하였다.

In vitro 유전독성 및 항유전독성 측정

RJ와 RSP의 첨가제로서 안전성 및 효용성을 모색하기 위해 *in vitro* 상에서의 유전독성 및 항유전독성 분석을 Choi [2]의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 수행하였다.

RJ 및 RSP가 강한 항균활성을 나타내는 농도가 되도록 HBSS 완충용액(Cambrex, USA)에 녹인 후(RJ : 10 mg/ml, RSP : 1 mg/ml), 각각 10 μl 씩 세포주에 처리하여 유전독성을 검색하였으며, 여기에 최종농도가 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 직접 발암원인 MNNG (Fluka, Germany)를 첨가한 후 세포주에 투여함으로써 항유전독성을 검토해 보았다. 음성대조구로서는 HBSS 완충액만을, 양성대조구로서는 MNNG만이 첨가된 HBSS 완충액을 사용하였다. 본 실험의 세포주로 사용된 비종양성 3T3 세포주(ATCC CCL No. 163)는 매 세포 계대시에 직경 3 cm의 둥근조직배양접시에 1.0×10^5 cells/plate로 분주하여 24시간 배양한 후 PBS 완충액으로 2회 세척한 다음 상기 시료를 가한 뒤 37°C, 5% CO₂의 조건 하에서 30분간 반응시켰다. 반응이 종료된 세포는 PBS 완충액으로 세척하고 0.125 mg/ml 농도의 proteinase K (Amnesco, USA) 100 μl 를 처리후 1 ml의 무혈청 DMEM 배지(Cambrex, USA)를 첨가하여 세포를 현탁시켰으며 이를 1000 RPM에서 3분간 원심분리 후 상청액을 제거하였다. 원심분리된 처리구별 3T3 세포주는 육안으로 관찰하여 침전된 세포의 양에 따라 150~200 μl 의 DMEM 배지(FBS free)를 첨가 후 현탁한 후, 이 중 10 μl 를 40°C의 1% low melting point agarose (LMA, in PBS ; Sigma, USA) 75 μl 와 섞어서 사전에 0.5% normal melting point agarose (NMA, in PBS ; Sigma, USA)로 coating 된 slide 위에 올리고 그 위에 cover glass를 덮어 세포 및 LMA 현탁액이 고르게 분산되도록 한 뒤, ice bath 위에 5분간 두어 젤을 굳혔다. 여기에 cover glass 제거 후 다시 40°C의 1% LMA 75 μl 를 올려서 top layer를 만든 다음 앞에서와 마찬가지로 cover glass로 덮어 젤을 굳혔다. 그 이후의 세포 용해, 전기영동, 핵 염색 및 분석은 전술한 Choi 등의 방법과 동일하게 수행하였다. DNA 손상에 의해 생성되는 'comet' tail의 길이에 따라 5단계(0~4)로 임의적 분류를 하였는데[3], 0단계는 5% 미만의 비손상, 1단계는 5~20%의 낮은 수준의 손상, 2단계는 20~40%의 보통 수준의 손상, 3단계는 40~90%의 높은 DNA 손상을 의미하며 마지막으로 4단계는 90% 이상의 매우 높은 수준의 DNA 손상단계를 의

미한다. 각 시료당 100개 이상의 세포를 관찰하고 전술한 손상단계로 세포를 분류한 후 시료당 손상 지수를 관찰하였다. 각 시료에 대한 유의성을 관찰하기 위해 3회 반복 실험 하였다.

In vitro 세포독성 측정

RSP 및 RJ의 3T3 세포주에 대한 안전성을 검토하기 위하여 세포독성의 유무를 확인하였다. 세포독성을 확인하기 위해서 CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega, USA)을 사용하였으며 제조사의 매뉴얼과 같이 실험하였다. RSP 및 RJ가 강한 항유전독성을 보이는 농도의 10배 농도(RSP : 10 mg/ml, RJ : 100 mg/ml)가 되도록 DMEM 배지에 녹인 후 0.22 μm syringe filter로 여과하였고, 이를 4배씩 희석하여 시료를 준비하였다. 1.0×10^5 cells/well로 96 well plate 상에 3T3 세포주를 분주 한 후 6시간동안 배양한 뒤 배양상청액을 제거하고 50 μl 의 DMEM (5% FBS)을 첨가하였다. 각 시료를 well 당 50 μl 씩 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 하에서 1시간동안 반응시킨 다음 1,000 rpm, 3분간 원심분리 한 뒤 각 well의 상청액 50 μl 를 새 plate에 옮겼다. 이후, 50 μl 의 substrate mix를 첨가한 뒤 실온, 암실에서 15분간 반응시킨 다음 50 μl 의 reaction stop buffer를 첨가하여 반응을 종료시킨 뒤 492 nm 하에서 흡광도를 측정하였다.

항균활성 측정

기능성 한방화장품 생산업체인 소리소뷰티아카데미(대구시 수성구)로부터 제공받은 보존료가 첨가되지 않은 화장품 시료 4종(C1~C4)을 2~4주간 4°C에서 냉장보관한 다음 화장품시료 100 μl 를 멸균증류수에 10배씩 희석하여 LB agar 배지에 도말한 후 37°C에 하룻밤 배양하여 오염되어있는 미생물의 수를 측정하였다. 또한 RJ 및 RSP를 화장품 시료에 동량 첨가한 후 1시간동안 실온에 방치한 후 이를 도말하여 균의 수를 계수함으로써 오염균에 대한 시료의 저해활성을 측정하였다. 음성대조구로서는 화장품에 멸균 증류수를 첨가한 것을 사용하였으며, 양성 대조구로는 화장품 보존제인 0.1 M methyl paraben (methyl 4-hydroxybenzoate, in ethanol, Sigma, USA)을 화장품에 첨가한 것을 사용하였다. 저해활성은 음성대조구에서 관찰되는 미생물의 수를 100%로 하여 첨가물에 따른 미생물의 수를 계수한 다음 백분율로 환산하였다.

통계처리

시료의 항유전독성 효과 및 세포독성에 미치는 영향을 유의성 검증을 위해 Microsoft[®] Excel (Microsoft, USA)의 t-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

시료의 유전독성, 항유전독성과 세포독성

3T3 세포주에 직접발암원인 MNNG를 처리하였을때의 WDI

(weighted damage index)가 평균 204로 관찰되었고(data not shown) 이를 100% 손상으로 계산하여 다른 시료처리구와 비교하여 손상정도를 환산한 결과 Fig. 1와 같이 RJ 및 RSP의 경우 음성대조구와 거의 같은 수준의 손상효과가 관찰되어 유전독성이 거의 없는 것으로 확인되었다. 한편 무는 강한 항산화활성을 가진 것으로 보고되어 있어[6,13] 항유전독성을 검토한 결과 MNNG에 RSP를 첨가한 RSM의 경우 유전독성이 100%에서 70%로 감소되는 결과를 관찰 할 수 있었으며, MNNG에 RJ를 첨가한 시료 RJM의 경우 무려 43%가량의 매우 강력한 항유전독성을 관찰 할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 RSP와 RJ는 보존제 뿐 아니라 유효활성을 갖는 기능성 첨가제로서의 가능성을 시사한다.

또한 시료의 세포에 대한 안전성을 검토하기 위해 3T3 세포주에 각각의 시료를 첨가시킨 후 세포가 괴사할 때 방출되

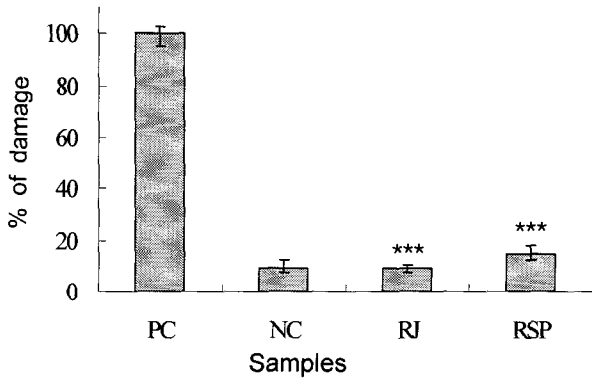


Fig. 1. Genotoxicity of radish extract (RJ, 100 µg/ml) and radish seed protein (RSP, 10 µg/ml) onto non-tumoral 3T3 cells. 1 µg/ml of MNNG was used as positive control (PC). Every sample was pre-incubated for 1hr. (*, p<0.05; **, p<0.005; ***, p<0.0005)

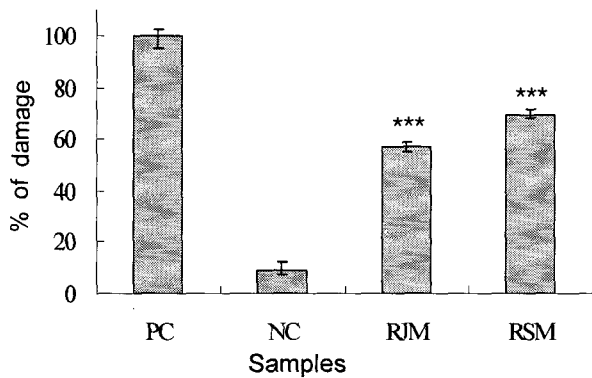


Fig. 2. Inhibitory effect (antigenotoxicity) of radish seed protein (RSP) and radish extract (RJ) on DNA damage induced by MNNG in non-tumoral 3T3 cells with preincubation for 1hr. RJM, 100 µg/ml of radish extract with 1 µg of MNNG; RSM, 10 µg/ml of radish seed protein with 1 µg/ml of MNNG (*, p<0.05; **, p<0.005; ***, p<0.0005)

는 LDH를 측정된 결과 Fig. 3에서 모식한 것과 같이 10 mg/ml RSP의 경우 22% 미만의 세포독성을, 100 mg/ml RJ의 경우 15% 미만의 세포독성이 관찰되었으며 그 이상의 농도에서도 ED50 값은 관찰되지 않았다. 또한 0.5 mg/ml RSP 및 10 mg/ml RJ 이하의 농도에서는 세포독성은 관찰되지 않았고 시료와 세포를 6시간 및 12시간 반응시킨 결과 또한 위의 결과와 뚜렷한 차이가 관찰 되지 않음을 확인하였다.

시료의 오염미생물에 대한 항균활성

항균활성 검증에 앞서 기능성 한방 화장품의 오염정도를 측정된 결과, 저온(4℃) 임에도 불구하고 2~4주가 지나면 많은 수의 미생물 집락이 관찰되었다(Table. 1). 4주간 보관한 화장품시료(C1, C2)의 경우 시료 1 ml 당 10⁵개 이상의 오염미생물이 검출되었으며 주로 세균집락이 관찰되었다. 또한 2주간 보관된 시료(C3, C4)의 경우에는 주로 균사를 형성하는 진균성 집락이었으며 시료 1 ml 당 10³개 이상의 오염미생물이 관찰되었다. 이에 따라 비교적 오염정도가 심한 시료 C1과 C4를 선정하여 이에 대한 RJ 및 RSP의 오염저해활성을 관찰한 결과(Fig. 4), RJ의 경우 10 mg/ml 농도로 시료와 동량 혼합하였을때 C1에서는 저해활성이 거의 관찰되지 않았으나, C4의 경우 약 76% 가량의 항균활성을 보였다. 또한 RSP의 경우 1 mg/ml 농도로 시료와 혼합하였을 때 C1에서는 약 85% 가량의 오염균 억제효과가 있었으며 또한 C4에서도 79% 가량의 항균활성을 확인할 수 있었다. 한편 양성대조구로 사용한 methyl paraben의 경우에는 C1에 대해서는 약 95%, C4에는 약 89% 가량의 항균활성을 보였다. 이전 연구 [4]에서 밝힌 바와 같이 RJ의 경우 항진균활성이 강하게 관찰되었기 때문에 세균성 오염이 심한 C1 시료에 활성을 보

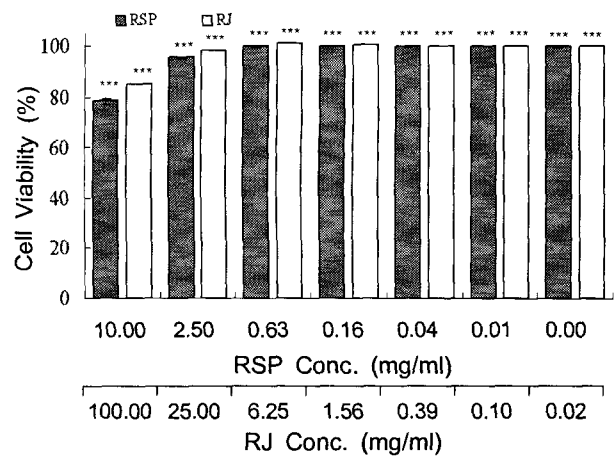


Fig. 3. Cytotoxicity of RSP and RJ onto 3T3 cell line. In order to investigate the cytotoxicity of RJ and RSP, the released LDH was determined quantitatively using the CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit. the ED50 value was not measured among various concentrations of RJ and RSP. (*, p<0.05; **, p<0.005; ***, p<0.0005)

Table 1. Microbial contamination of cosmetic samples

Cosmetic sample	Storage period	Microbial cells (cfu) / 1ml of sample	Notes
C1	4 weeks	3.6×10^5	Bacterial contamination
C2	4 weeks	2.6×10^5	Bacterial contamination
C3	2 weeks	2.4×10^2	Fungal contamination
C4	2 weeks	2.0×10^4	Fungal contamination

All samples were preserved at 4°C for 2~4 weeks.

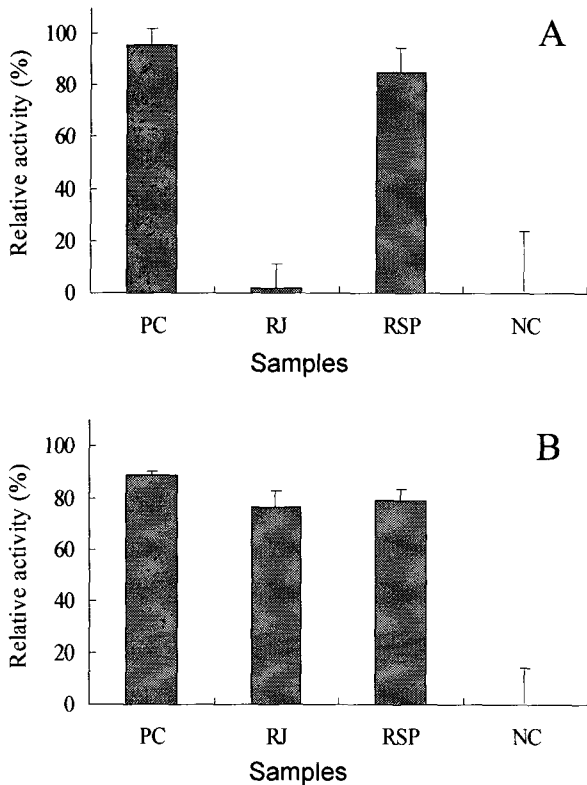


Fig. 4. Antimicrobial activities of radish seed protein (RSP) and radish extract (RJ). 1 mg/ml of RSP was shown an (putative) antibacterial activity (A, against sample C1) and an (putative) antifungal activity (B, against sample C4) above 80%. And also, 10 mg/ml of RJ was shown about 75% of antifungal activity (B).

이지 못한 것으로 사료된다. 한편 RSP의 경우 그람양성인 바실러스균과 그람음성인 대장균을 지표균으로 하여 사전실험을 한 결과 별다른 활성을 보이지 않았으나 (data not shown), 세균성 오염이 심한 C1시료에 강한 저해 활성을 보였는데, 단지 host spectrum의 차이에서 기인한 것인지 다른 저해 메커니즘의 문제인지는 추후 연구가 요구된다.

첨가물에 있어서 천연 보존제는 그 부가가치가 큰 유효성분들로서 그 특성상 생물공학적인 기법이 적용되기 좋은 기능성 신소재이다. 한국산 무 및 그 종자유래 단백질의 보존제로서의 가능성을 조사한 결과 유효한 항균활성 및 항산화활성에 기인한 강력한 항유전독성을 관찰 할 수 있었다. 또한,

세포독성이 거의 없는 것으로 관찰되어 첨가물로서의 안전성 또한 확인할 수 있었다. 본 유효성분들은 우리 농산물에서 추출된 천연물질로서 화장품 뿐 아니라 식품의 천연보존제 등 여러 분야에서의 적용이 가능 할 것으로 사료된다. 또한 이러한 효과적이고도 안전한 천연 첨가물의 효율적인 생산 및 소비가 이루어져 국민건강 뿐 아니라 농가소득 창출 등에 이바지되어야 할 것이다.

요 약

본 연구는 한국산 무 및 그 종자단백질을 추출 및 분리하여 3T3 세포주에 대해 항유전독성과 세포독성에 미치는 영향과 항균활성을 검토하였다.

3T3 세포주에 직접발암원인 100 µg/ml MNNG를 10 µl씩 투여한 후 10 mg/ml의 무추출물(RJ)과 1 mg/ml의 종자단백질(RSP)을 10 µl씩 투여하였을 때, 각각 43%와 30%의 항유전독성을 보였다. 또한 lactose dehydrogenase (LDH) 정량 분석을 이용하여, 3T3 세포주에 대한 다양한 농도의 RJ 및 RSP를 투여한 후 세포독성을 관찰 한 결과 세포독성은 관찰되지 않았다. 한편 이미 오염된 화장품에 대해 10 mg/ml의 RJ와 1 mg/ml의 RSP를 투여하였을 때, 세균성오염화장품 시료(C1)에 대해서 RSP가 85%의 항균활성을 보였으며 진균성오염화장품 시료(C4)에 대해서 RSP는 79%, RJ는 76%의 항균활성을 보였다.

감사의 글

본 연구는 농특과제(202068-03-3-SB010)와 한동대학교 연구지원 사업일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- An. B. J. 1999. The material of natural anti-bacterial agents for the food preservative. *Food Industry and Nutrition*, 4, 5-16.
- Choi, J. W., J. H. Park, S. T. Ji. O. B. Choi, H. K. Shin. 1999. Antigenotoxic effect of dominant bacteria isolates from Kimchi *in vitro*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 31, 1071-1076.
- Gisell, R. F., C. B. Lourdes, L. N. Marcelam, P. Ana, M.

- Mudry, G. E. Prieto, A. C. Marta. 2002. DNA single strand breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivatives. *Toxicol. Lett.*, **132**, 109-115.
4. Hwang, C. W. 2003. Antifungal activity of Korean Radish (*Raphanus sativus* L.) extract against pathogenic plant. *J. of Life Science*, **13**, 223-229.
 5. Jang, K. W., S. H. Park, S. D. Ha. 2003. Technology trends in functional foods. *Food Sci. and Industry*, **36**, 8-16.
 6. Jeong, M. S., G. S. Lee, H. J. Chae. 2004. *In vitro* biological activity assay of ethanol extract of radish. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **47**, 67-71.
 7. Jung, D. H. 1998. In biological efficacy of food, Seonjin Munwhasa, Seoul, 72-74.
 8. Kim, Y. R., S. H. Ahn, B. D. Choi, S. J. Kang, G. W. Shin, M. J. Oh, T. S. Jung. 2004. In vitro examination of chondroitin sulfates extracted Midduck (*Styela clava*) and Munggae Tunics (*Halocynthia roretzi*) as a cosmetic material. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **33**, 646-652.
 9. Park, J. H., H. K. Shin, C. W. Hwang. 2001. New antimicrobial activity from Koreans Radish seeds (*Raphanus sativus* L.). *J. Microbiol. Biochechnol.*, **11**, 337-341.
 10. Sabalitschka, T. 1930. Application of ethyl p-hydroxybenzoate in maintenance of sterility, in sterilization and in disinfection. *Archives of Pharmacy*, **268**, 653 - 673.
 11. Schafer Jr, E. W., W.A. Bowles, Jr. 1985. Acute oral toxicity and repellency of 933 chemicals to house and deer mice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **14**, 111 - 129.
 12. Sohn, E. S., S. W. Kim, J. S. Kang, S. P. Lee. 2004. Technology trend and patent information analysis of cosmetic materials derived from natural products. *Applied Chemistry*, **8**, 466-469.
 13. Souria, E., Gh. Amin, H. Farsam, S. Andaji. 2003, The antioxidant activity of some commonly used vegetables in Iranian diet. *Fitoterapia*, **75**, 585-588.