

In vitro 실험에서 검정콩 안토시아닌 조추출물의 효능 분석

이혜정* · 도완녀** · 김용호***†

*가천의과대학교 식품영양학과, **강릉대학교 식품영양학과, ***순천향대학교 의료생명공학과

In vitro Biological Activities of Anthocyanin Crude Extracts from Black Soybean

Hye-Jeong Lee*, Wan-Nyeo Do**, and Yong-Ho Kim***†

*Dept. of Food and Nutrition, Gachon University of Medicine and Science, Incheon 406-799, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Kangneung University, Kangwon 210-702, Korea

***Dept. of Medical Biotechnology, Soonchunhyang University, Chungnam 336-745, Korea

ABSTRACT This study was carried out to investigate the antioxidative and anti-inflammatory activity of crude anthocyanin compounds extracted from black soybean. The crude anthocyanin compounds were extracted with 80% methanol and concentrated to powder. The most abundant compound isolated from the extract was C3G(cyanidin-3-glucoside). The superoxide dismutase (SOD) assay was conducted to assess the antioxidative activity of the crude extract. SOD, which catalyzes the dismutation of the superoxide anion into hydrogen peroxide and molecular oxygen, is one of the most important antioxidative enzymes. The black soybean anthocyanin extracts inhibited more than 90% of the superoxide radical at a concentration of 0.1% and 100% at a concentration of 0.5%, indicating that this extract displayed excellent antioxidative activity. To assess the anti-inflammatory activity of the extract, a NO(Nitric oxide) production assay in RAW 264.7 cells was performed. NO is an important physiological messenger and effector molecule in many biological systems, including immunological, neuronal and cardiovascular tissues. In this assay, the anthocyanin extracts showed a high anti-inflammatory potential, where the inhibitory potency for NO production was similar to the positive control, particularly for EGCG(epigallocatechin-3-gallate), which is known to have excellent anti-inflammatory activity. Thus, it can be concluded that the anthocyanin extracts from black soybean have distinctive pharmaceutical activities and may be used as an excellent source materials to supplement the health benefits of various food products.

Keywords : black soybean, anthocyanin, C3G, SOD activity, NO production

콩의 성인병 예방 및 치료에 대한 효능은 널리 알려져 있으며(Kenedy, 1995; Hayes *et al.*, 1997; Messina *et al.*, 2002), 최근에는 우리나라를 중심으로 검정콩의 생리활성에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다(Kim *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008). 검정콩은 우리나라에서는 전통적 음식으로 이용되어 왔으며 또한 예로부터 소위 ‘약콩’으로 불리며 여러 민간요법에 많이 활용되었다. 검정콩은 종피에 안토시아닌을 다량 함유하고 있어 일반콩의 기능성 효과 외에도 안토시아닌에 의한 상당한 생리활성이 있음이 보고되었다(Kim *et al.*, 2004).

안토시아닌은 수용성 flavonoid계 색소로서 식물에 분포하는 종류는 20여종에 이르는 것으로 알려져 있는데(Harbone & William, 2000), 최근에 이들의 생리활성 효과가 밝혀짐에 따라(Plochman *et al.*, 2007; Kanatt *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2003; Wand & Lin, 2000) 많은 관심을 끌고 있다. 검정콩 안토시아닌의 주요 성분은 C3G(cyanidin-3-glucoside), D3G(delphinidin-3-glucoside) 및 Pt3G(petunidin-3-glucoside)인데(Chung *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2009), C3G가 human tumor cells 억제에 효과가 있다고 보고(Meiers *et al.*, 2001; Tsuda *et al.*, 1999)되었다.

본 연구에서는 검정콩 종피에서 안토시아닌을 메탄올로 추출한 다음 *in vitro* 실험에서 안토시아닌 조추출물의 항산화 및 항염효과를 분석하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

검정콩의 안토시아닌 조추출 및 함량 분석

검정콩 1 kg을 80% 메탄올 15 ℓ에 넣고 3일간 실온에서 방치한 후 100 μ m 필터로 여과하였다. 다시 여과액을 감압

†Corresponding author: (Phone) +82-41-530-1281
(E-mail) yohokim@sch.ac.kr <Received January 2, 2010>

농축한 후 동결건조한 결과 와인색의 바삭바삭한 추출 시료를 획득할 수 있었다. 이후 시료는 갈색병에 담은 후 냉장 보관하면서 안토시아닌 효능 분석에 사용하였다. 안토시아닌 함량은 reverse phase HPLC를 이용하여 분석하였다. TOSOH BIOSCIENCE TSKgel™ ODS-120T (5 μm, 15 cm×4.6 mm) 칼럼과 UV-visible 530 nm detector를 사용하였으며, mobile phase는 H₂O : methanol : formic acid를 78 : 17 : 5 (v/v/v), flow rate는 1 ml/min로 수행하였다. 분석에 사용된 표준물질인 cyanidin-3-glucoside(C3G), delphinidin-3-glucoside(D3G), petunidin-3-glucoside(Pt3G)은 노르웨이의 Polyphenols사에서 구입하여 사용하였다.

Superoxide dismutase (SOD) assay

Xanthine oxidase에 의해 발생한 superoxide anion이 시험에 사용된 안토시아닌에 의해 제거된 비율을 분석함으로써 시료의 항산화능을 평가하였다. 재료로 쓰인 세포배양액은 SOD assay kit(Dojindo Molecular Technologies, Rockville, USA)를 사용하였으며 absorbance는 ELISA Reader system (Power-wave X, Bio-tech INC, Vermont, USA)을 이용하였다. 먼저 안토시아닌 시료를 농도별로 96 well plate에 20 μl씩 분주한 후 reagent solution 20 μl를 넣고 섞어주었다 (Table 1). 이후 enzyme solution 20 μl를 넣고 37°C에서 incubation한 후 450 nm에서 absorbance를 측정하였으며, SOD 활성은 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{SOD activity (inhibition rate \%)} = \frac{\{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})\}}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

Nitric Oxide(NO) assay

한국세포주은행의 RAW 264.7 세포를 사용하였다. 세포 (5 × 10⁵ cells/ml)를 12 well plate에서 18시간 배양한 후 시료와 LPS(lipopolysaccharide, Sigma)를 처리하고, 48시간 후 NO의 안정한 대사물질인 nitrite를 Griess 방법으로 측정하였다(Huygen, 1970). 5% phosphoric acid에 용해된 1%

sulfanilic acid와 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride를 동량으로 혼합한 Griess 시약 100 μl를 동량의 시료와 혼합하여 37°C에서 30분간 처리하였다. 흡광도는 분광광도계(Power-wave X, Bio-tech INC, Vermont, USA)를 이용하여 540nm에서 측정하였고, NaNO₂를 이용한 표준곡선에서 농도를 계산하였다(Fig. 3).

DDT(Disk Diffusion Test) 시험

Escherichia coli(KCTC 2571), *Staphylococcus aureus*(KCTC 1916), *Candida albicans*(KCTC 7965), *Aspergillus niger*(KCTC6906)의 4가지 균주를 사용하여 DDT 분석을 수행하였다. 먼저 시험균을 액체배지에서 1~2일 동안 전배양한 후, 한천 농도가 0.8 %되는 한천배지 7 ml에 균수가 10⁵⁻⁶ cell/ml이 되도록 전배양액을 첨가하였다. 다시 균을 포함한 한천배지를 시험할 한천배지 위에 분주한 후, 50 μl의 시료, erythromycin, amphotericin B (positive control)를 각각의 원반(paper disk)에 적신 후 배지 위에 치상하고 균이 충분히 자랄 때까지 30~37°C에서 3~4일 동안 배양하였다. 항균활성은 배지 내에 형성된 투명대 크기(직경)를 mm 단위로 측정하여 나타내었다.

결과 및 고찰

검정콩 종피의 안토시아닌 추출

검정콩 1kg을 사용하여 메탄올로 추출 후 동결건조한 시료의 양은 총 73.93 g이었다. 이중 안토시아닌은 cyanidin-3-glucoside만 검출되었으며 그 함량은 추출된 시료의 2.2%이었다(Fig. 1). 따라서 추출 시료의 상당 부분이 안토시아닌 외의 수용성 성분이 포함된 것을 알 수 있었다. 그러나 검정콩에서 종피가 차지하는 비율이 10%미만임을 감안할 때 안토시아닌 추출 시 종피만을 사용하면 안토시아닌이 더 많이 함유된 조추출물을 얻을 수 있을 것이다. 한편, 추출 시료에서 안토시아닌 색소 중 C3G만 검출되었는데 이것은 안토시아닌의 불안정성으로 인하여 3일간의 추출 시간 및

Table 1. Amount of each solution for sample, blank 1, 2 and 3.

	Sample	Blank 1	Blank 2	Blank 3
Sample solution	20 μl	-	20 μl	-
ddH ₂ O	-	20 μl	-	20 μl
Reagent working solution	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl
Enzyme working solution	20 μl	20 μl	-	-
Dilution solution	-	-	20 μl	20 μl

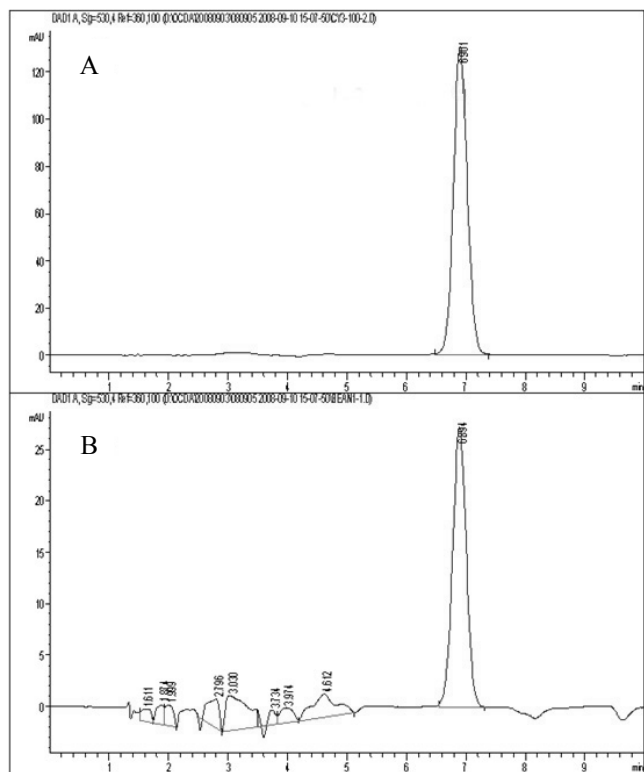


Fig. 1. HPLC chromatogram of anthocyanin analysis. A : standard(cyanidin-3-glucoside); B : crude extracts of black soybean

동결 건조 시 상대적으로 적은 함량 비율을 나타내는 D3G와 Pt3G는 손실된 것으로 판단된다. Kim 등(2008)은 안토시아닌은 아주 불안정한 색소로서 저장 조건, 광의 유무 및 pH 등에 의해서 안정성이 많은 영향을 받는다고 하였다.

Superoxide dismutase (SOD) assay

Superoxide dismutase(SOD)는 생체에 유해한 superoxide anion radical과 반응하여 hydrogen peroxide(H₂O₂)와 O₂로 전환시키는 효소로서 생체내에서 여러 활성산소 중에 대한 방어작용을 하는 대표적인 항산화 효소로 알려져 있다. Xanthine oxidase와의 반응에 의한 SOD 분석 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 시료는 검정콩 종피에서 추출한 안토시아닌 조추출물을 사용하였으며 비타민 C를 대비물질로 비교하였다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 anthocyanin extracts는 0.01%에서 0.5% 범위에서 농도 의존적으로 SOD 활성을 증가시키므로 알 수 있었다. 안토시아닌 조추출물 0.05%에서 radical의 inhibition rate가 66% 이었고 0.1%에서 91%의 억제율을 나타내었으며, 0.5%에서 superoxide radical을 100% 소거시키는 결과를 관찰할 수 있었다. 따라서 정제되지 않은

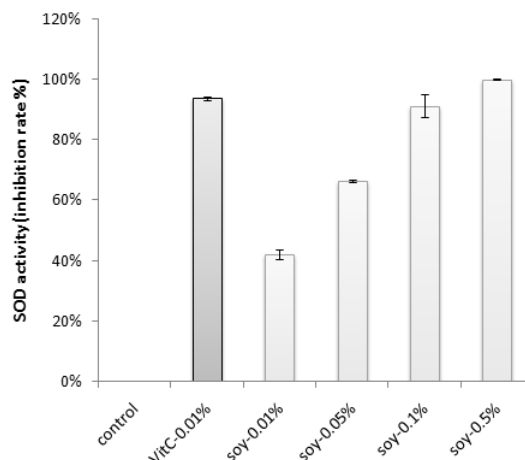


Fig. 2. SOD activity by anthocyanin extracts in black soybean.

안토시아닌 조추출물이더라도 항산화 효과가 큼을 알 수 있었다.

Nitric Oxide(NO) assay

NO는 인체 면역반응과 혈관 확장에 중요한 역할을 한다. 최근의 연구에 의하면 산화질소(NO)가 인체내 산화성 손상 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 이러한 산화질소 생성 억제가 항염효과에 도움을 주는 것으로 보고되었다(Imal *et al.*, 1993).

NO assay는 한국세포주은행의 RAW 264.7 세포를 사용하여 검정콩 안토시아닌 추출물이 NO억제에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 3, 4). Fig. 3은 540 nm에서 측정된 흡광도를 nitrite 양으로 전환하기 위해 standard curve를 작성한 것이다. Standard curve는 $y = 0.081x + 0.0282$ 로 수식화 할 수 있었으며, 이를 이용하여 시료에 의한 NO 값을 수치화 하였다.

Fig. 4는 안토시아닌 조추출물의 NO 억제 효과를 나타낸 것이다. 생쥐 유래 암세포주인 RAW 264.7 세포를 배양한 후, LPS(lipopolysaccharide 200 ng/ml)와 농도별 안토시아닌 추출물을 처리하고 일정량의 cell supernatant를 취한 후 Griess assay를 수행하였다. 음성대조군은 RAW 264.7 세포에 LPS 또는 시험물질을 처리하지 않은 것이며, 안토시아닌에 대한 대비물질로 EGCG(epigallocatechin-3-gallate)를 사용하여 비교하였다. 그림에서 보는 바와 같이 안토시아닌 추출물을 0.001%, 0.01%, 0.02% 농도로 각각 처리했을 때, LPS를 취한 후 증가된 NO의 생산이 농도 의존적으로 감소하는 결과를 나타내었다. 이는 녹차의 주요 성분인 EGCG와 같은 결과를 보였으나 안토시아닌 추출물이 정제되지 않은 것임을 감안할 때 NO 억제능은 EGCG보다 뛰어남을 알 수 있었다.

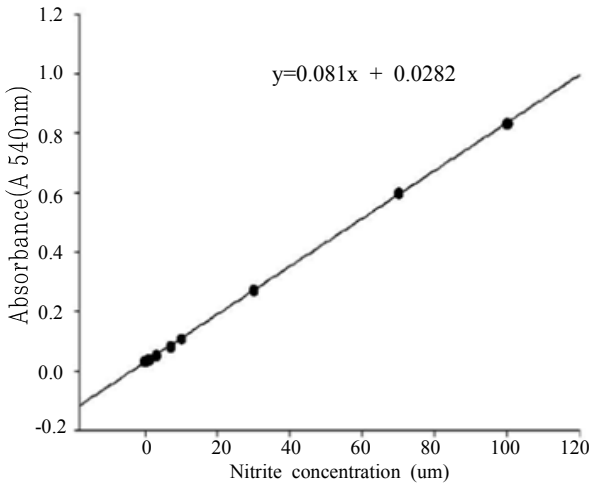


Fig. 3. Nitrite standard curve

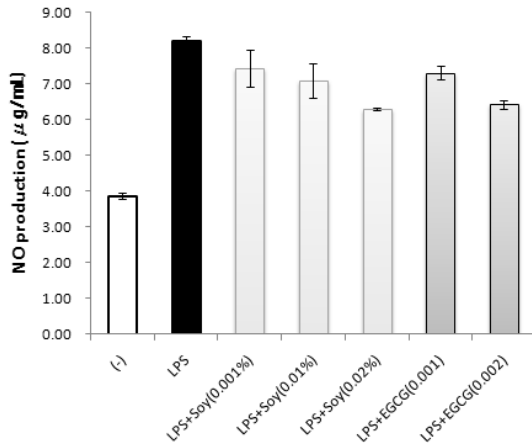


Fig. 4. Inhibitory effect of anthocyanin extracts on NO production in RAW 264.7 cells. (-):negative control; EGCG:epigallocatechin-3-gallate; LPS(lipopolysacchatide)

DDT(Disk Diffusion Test) 시험

안토시아닌 추출물이 NO 억제능이 있는 것으로 확인되었으므로 균주를 이용한 항균 효능을 DDT 시험으로 수행하였다. 4개의 시험균을 배양한 후 positive control로 erythromycin(*S. aureus*, *E. coli*)과 amphotericin B(*C. albicans*, *A. niger*) 등을 처리하여 항염증 효과를 분석하였다.

Table 2는 4개의 시험균 *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger*에 대하여 검정콩 안토시아닌 조추출물을 각각 0.1%, 1.0%, 5.0%, 10% 처리하였을 때의 항균력을 DDT에 의해 수치로 나타낸 것이다. Table에서 보는 바와 같이 시험물질인 안토시아닌 추출물은 각 시험균에 대해서 10%의 농도에서도 항균력을 보이지 않았다. 기존의 결과에서는 안토시아닌 pigments인 C3G 와 D3G가 항염증 효과가 있다고 하였다(Kong *et al.*, 2003). 따라서 본 시험의 결과로 판단하건데, 사용된 시료가 메탄올로만 안토시아닌을 추출한 조추출물로서 각 색소별로 완전하게 정제되지 않은 까닭인지, 혹은 시험에 사용된 시험균주에는 안토시아닌의 효과가 떨어지는 것인지에 대해서는 추후 좀 더 깊은 연구가 있어야 할 것이다. 그러나 본 실험의 결과에서 검정콩 안토시아닌 조추출물 상태로도 SOD 활성과 NO 억제능이 뛰어난 것으로 보아 검정콩의 안토시아닌은 여러 방면에서 효능을 발휘할 수 있으리라 판단된다.

적 요

검정콩 종피에 함유된 안토시아닌의 항산화 및 항염증 효과를 분석하였다. 메탄올로 추출된 검정콩의 안토시아닌 조추출물은 0.01%에서 0.5% 범위에서 농도 의존적으로 SOD 활성을 증가시켰으며 0.5%에서 superoxide radical을 100% 소거시키는 결과를 관찰할 수 있었다. 또한 RAW 264.7 세포를 배양한 후, 세포 배양액에 LPS와 농도별 안토시아닌

Table 2. Result of DDT (Disk Diffusion Test) by anthocyanin extracts from black soybean.

(Unit : mm)

		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	
Anthocyanin extracts	P.C. ^a	10.0%	32	12	29	15
		10.0%	NE ^b	NE	NE	NE
		5.0%	NE	NE	NE	NE
		1%	NE	NE	NE	NE
		0.1%	NE	NE	NE	NE

^aP.C: Positive control(*E. coli* and *S. aureus* : Erythromycin; *C. albicans* and *A. niger* : Amphotericin B)

^bNE: No effect

추출물을 가한 결과, 안토시아닌 추출물을 0.001%, 0.01%, 0.02% 농도로 각각 처리했을 때 LPS에 의해 증가된 NO의 생산이 농도 의존적으로 감소하는 결과를 보였다. 따라서 검정콩 안토시아닌 추출물의 항산화능 및 항염증효과를 가늠할 수 있었다. 그러나 안토시아닌 조추출물은 DDT 시험에 의해서는 *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger*에 대해서 10%의 농도에서도 항균력을 보이지 않았다.

인용문헌

- Choung, M.G., I.Y. Baek, and S.T. Kang. 2001. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean. *J. Agr. Food Chem.* 49: 5848-5851.
- Harborne, J.B. and C.A. Wiliam. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- Hayes, R.E., G.N. Bookwalter, and E.B. Bagley. 1997. Antioxidant activity of soybean flour and derivatives-A review. *J. Food Sci.* 42: 1527-1531.
- Huygen, I.C. 1970. Reaction of nitrogen dioxide with Griess type reagents. *Anal. Chem.* 42: 407-409.
- Imal, Y., H. Kolb, and V. Burkart. 1993. Nitric oxide production from macrophages is regulated by arachidonic acid metabolites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 105-109.
- Kanatt, S.R., R. Chander, P. Radhakrishna, and A. Sharma. 2005. Potato peel extract a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in radiation processed lamb meat. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1499-1504.
- Kenedy, A.R. 1995. The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *J. Nutrition* 125: 733S-743S.
- Kim, S.L., J.J. Hwang, J. Song, J.C. Song, and K.H. Jung. 2000. Extraction, purification and quantification of anthocyanins in colored rice, black soybean, and black waxy corn. *Korean J. Breed.* 32: 146-152.
- Kim, S.Y., K.O. Ko, Y.S. Lee, H.S. Kim, and Y.H. Kim. 2008. Extraction efficiency and stability of anthocyanin pigments in black soybean seed coat. *Korean J. Crop. Sci.* 53: 84S-88S.
- Kim, Y.H., S.G. Do, D.S. Kim, S.S. Woo, O.J. Kim, and H.J. Lee. 2008. Evaluation of toxicity of anthocyanin from black soybean by feeding test in mice. *Korean J. Food & Nutr.* 21: 397-402.
- Kim, Y.H., H.T. Yun, and K.Y. Park. 2004. Biological effects of black colored soybean. *Plant Resources* 7: 195-199.
- Kong, J.M., L.S. Chia, N.K. Goh, T.F. Chia, and R. Brouillard. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.
- Lee, H.J., E.Y. Choi, Y.J. Sim, O.S. Kim, H.J. Yoo, W.N. Do, and Y.H. Kim. 2009. Anthocyanin contents and pigment stability of black soybean by different extract condition and stabilizer. *Korean J. Food & Nutr.* 22: 150-157.
- Meiers, S., M. Kemeny, U. Weyand, R. Gastpar, E. Angerer, and D. Marko. 2001. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptpr. *J. Agric Food Chem.* 49: 958-962.
- Messina, M., C. Gardne, and S. Barnes. 2002. Gaining insight into the health effects of soy but a long way still to go: Commentary on the fourth international symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease. *J. Nutrition* 132: 547S-551S.
- Plochmann, K., G. Korte, E. Koutsilieri, E. Riehling, P. Riederer, A. Rethwilm, P. Schreier, and C. Scheller. 2007. Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 460: 1-9.
- Prior, R.L., X. Wu, and K. Schaich. 2005. Standardized method for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302.
- Tsuda, T., F. Horio, J. Kitoh, and T. Osawa. 1999. Protective effects of dietary cyanidin-3-O-beta-glucoside on liver Ischemia-reperfusion injury in rats. *Archives Biochem. Biophys.* 368: 361-366.
- Wang, S.Y. and H.S. Lin. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 48: 140-146.