

가압볶음 무말랭이 열수 추출물의 항산화 효과

송영복¹ · 최정선² · 이지은² · 노정숙² · 김미정³ · 조은주² · 송영옥^{2*}

¹(주)세전식품연구소

²부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소

³신라대학교 식품영양학과

The Antioxidant Effect of Hot Water Extract from the Dried Radish (*Raphanus sativus* L.) with Pressurized Roasting

Yeong-Bok Song¹, Jeong-Sun Choi², Ji-Eun Lee², Jeong-Sook Noh²,
Mi-Jeong Kim³, Eun-Ju Cho², and Yeong-Ok Song^{2*}

¹Sejeon Food Co. Ltd., Chungbuk 365-824, Korea

²Dept. of Food Science & Nutrition, and Kimchi Research Institute,
Pusan National University, Busan 609-735, Korea

³Dept. of Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-736, Korea

Abstract

The antiradical property of hot water extract from dried radish (DR) or dried radish roasted with pressure (DRRP) was investigated *in vitro* and in LLC-PK₁ cell system. The contents of total free amino acid and reducing sugar in DR were decreased by 72.86% and 3.17%, respectively, after pressurized roasting. *In vitro* test, IC₅₀ for DR and DRRP for DPPH radical scavenging activity were 646.70 and 135.45 µg/mL, 896.10 and 566.98 µg/mL for superoxide anion radical, and 722.26 and 531.84 µg/mL for hydroxy radical, respectively. The radical scavenging effects of DRRP was significantly greater than those for DR (p<0.001). These radical scavenging effects of DR and DRRP were confirmed in LLC-PK₁ at which oxidative stresses were induced by superoxide, nitric oxide and peroxyxynitrite generated in the treatment of pyrogallol, SNP, and SIN-1, respectively. Cell viability was increased in the presence of DR or DRRP, dose dependently (p<0.05), and TBARS formation was decreased. The protective effects of DRRP against oxidative damage in LLC-PK₁ were greater than those of DR at the same concentration tested (p<0.05). This superior antiradical activity of DRRP might be due to the products produced during the pressurized roasting in addition to the antioxidative compounds originally present in the radish. 5-hydroxyl methyl furfural (5-HMF) known as an intermediate product of the maillard reaction was detected in DRRP (0.57 mg/g), but not from DR. In conclusion, daily consumption of DRRP may prevent oxidative damage by retarding oxidative stress.

Key words: dried radish, pressure roasting, antiradical activity, 5-hydroxy methyl furfural (5-HMP)

서 론

식품가공 분야에서 볶음처리하는 식물성 유지의 추출수를 증가(1)나 음용차의 고유한 향미와 색을 얻기 위한 수단으로 널리 사용되고 있다(2,3). 볶음에 의해 식품성분들은 다양한 분해, 합성, 축합 등의 반응을 통해 유용 성분이 생성됨으로써 여러 가지 기능성을 나타낸다. 특히 볶음 과정 중 일어나는 갈변화 반응은 식품 중에 존재하는 유리아미노산과 유리당이 amino-carbonyl 반응을 일으켜 melanoidin을 형성하고(4), 가열에 의하여 당이 분해되어 생성된 방향족 화합물(5) 등이 항산화작용(6), 항돌연변이 작용 및 항균 작용(7) 등이 있어 노화억제(8)나 성인병 예방(9) 등의 효과가 있다

고 알려져 있다. 볶음처리는 건강기능성이 높은 유용성분을 생성할 뿐만 아니라 향미성분도 증가시킴으로써 차 생산에 많이 이용되고 있다. 볶음차의 항산화 및 항돌연변이 기능성에 대한 보고로는 오가피차(10), 울무차(11), 둥글레차(12), 발아 벼 차(13), 옷나무 열수추출물(14), 동백잎차(15), 녹차(16), 감국 꽃차(17) 및 구지뽕잎차(18) 등 다양한 재료로부터 보고되고 있다.

무(radish, *Raphanus sativus* L.)는 십자화과 채소로 휘발성 함황 성분을 가지고 있어 독특한 매운 맛을 지니고 있다. 무는 다른 채소에 비해 유리아미노산, 당, 칼슘 및 인 등이 많이 함유되어 있다(19). 이러한 성분 외에 무 뿌리인 나복(羅蔔)은 가래, 기침해소, 이질 등에 효과가 있고, 어패류 또

*Corresponding author. E-mail: yosong@pusan.ac.kr
Phone: 82-51-510-2847, Fax: 82-51-583-3648

는 면류의 중독을 해소하는 데도 효과가 있다고 고전에 기록되어 있다. 무에 함유된 디아스타제(diastrase)는 소화촉진, 식중독, 숙취해소에 효과가 있으며 라핀(rapine)은 세균, 진균, 기생충 등에 대한 항균 작용이 있는 성분으로 알려져 있다. 그 외에도 무에는 이노작용, 정장작용, 혈당강하, 소염 및 지혈 등의 생리활성이 있어(20) 민간에서 널리 상용되어 왔다. 또한, 십자화과 채소들은 암을 예방하는 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 무 역시 다른 십자화과 채소와 마찬가지로 글루코시놀레이트(glucosinolate) 계통의 항암성 물질을 함유하고 있어서(21), 인체 폐암 세포의 증식을 억제시키는 작용이 있는 것으로 보고되었다(22). 생 무의 약리적인 효능 이외에도 반찬류로 사용하는 무말랭이를 볶아 차로 끓여 마시면 골다공증에 효과가 있다는 사실이 구전으로 전해지고 있는데 이는 아마도 건조에 의해 무에 함유된 성분들이 농축되었기 때문으로 생각된다. 본 연구에서는 무말랭이차를 개발하기 위한 기초 연구로 가압볶음 한 무말랭이의 열수 추출물의 유리기 소거능을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

무말랭이 열수 추출물 제조

무는 국내산으로 울산시 농수산물 시장에서 구입하였다. 무를 깨끗하게 씻어 껍질째 3×3×0.5 cm로 절단하여 10일 동안 일광건조 시켜 무말랭이를 제조하였다. 무말랭이 열수 추출물의 수율을 높이기 위해 무말랭이 500 g을 재래시장에서 쌀 튀밥용으로 사용하는 가압볶음 장치에서 2분간 볶았다. 가압볶음 장치의 압력은 가열 2분 후 4.5 kg/cm²에 도달하였다. 가압볶음 한 무말랭이는 실온에서 냉각시킨 후 냉장 보관하였다. 무말랭이 열수 추출물 제조는 무말랭이 100 g과 가압볶음 무말랭이 100 g에 증류수 2 L씩을 각각 가하여 열탕추출(100°C, 60분) 하였다. 열수 추출물은 냉각 후 여과(No. 2, Advantec, Tokyo, Japan)하여 진공회전 농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)에서 1차 농축한 후 동결건조 하였다. 동결건조 시료는 -70°C의 냉동고(NU-6512G, NuAire Inc., Plymouth, MN, USA)에 보관하면서 각 분석 시료로 사용하였다. 동결건조 분말의 수율은 무말랭이(dried radish, DR) 열수 추출물 37.9%, 가압볶음 무말랭이(dried radish roasted with pressure, DRRP) 열수 추출물 42.1%이었다.

일반성분 및 환원당 함량

열수 추출물의 수분, 조회분, 조단백, 조지방은 상법으로 정량하였다. 환원당 함량은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법(23)으로 정량하였다.

유리아미노산 함량 분석

유리아미노산은 동결건조 시료 0.8 g에 에탄올 30 mL을 가해 4°C에서 24시간 방치한 후 10,000 rpm에서 15분간 원심

Table 1. Operating conditions for the amino acid analyzer

Instrument	Detector	SYKAM S4300 (Germany)
	Solvent delivery system	SYKAM S2100 (Germany)
Integrator		Pyramid
Flow rate		Buffer 0.4 mL/1 m
Wave length		440 nm, 570 nm
Column size		4.6 mm, 570 nm
Buffer	A	pH 3.45
	B	pH 10.85

분리한 상층액을 분리 회수한 후 다시 70% 에탄올 30 mL을 가해 균질화하여 10,000 rpm에서 150분간 원심분리(Union 32R Plus, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Seoul, Korea) 하였다. 회수한 상층액을 진공회전농축기에서 농축 후 에테르로 지방을 제거한 뒤 남은 용액을 농축하여 lithium citrate buffer(pH 2.2)로 회수하였다. 여기에 sulphosalicylic acid를 넣어 암소에서 단백질을 제거한 후 membrane filter(0.45 µm, Sartorius GmbH, Gottingen, Germany)로 여과하여 자동아미노산분석기(Sykam, Munich, Germany)에서 유리아미노산을 분석하였다. 기기분석 조건은 Table 1과 같다.

5-Hydroxymethyl-2-furfural(5-HMF) 함량 분석

Maillard 반응의 중간생성물인 5-HMF 함량을 HPLC(24)로 정량하였다. 동결건조 시료 5 g을 증류수 50 mL에 완전히 녹인 후 이중 10 mL을 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC(TSP Co., Fremont, CA, USA) 분석용 시료로 사용하였다. 분석칼럼은 LC-18(4.6 mm×150 mm, Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 사용하였으며 이동상으로 메탄올-물(10:90, v:v)을 사용하였고 용출속도는 1.0 mL/min이었다. 검출기(HP 1100, UV 280 nm, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)에 시료 20 µL을 주입하여 얻어진 피크와 표준물질 5-HMF(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로부터 얻어진 피크를 비교하여 그 면적으로부터 농도를 계산하였다. 분석은 3회 반복 측정하였다.

In vitro 라디칼 소거능 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거능은 에탄올에 농도별로 용해시킨 시료와 DPPH를 암소에서 30분간 방치시킨 후 흡광도를 측정하였다(25). Superoxide anion 소거능은 xanthine, nitrobluetetrazolium(NBT), xanthine oxidase을 열수추출물과 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다(26). Hydroxyl radical 소거능은 Fenton 반응을 일으켜 생성된 hydroxyl radical을 무말랭이 열수추출물이 소거하는 효과를 측정하였다(27). Peroxynitrite radical 소거능은 dihydro rhodamine(DHR) 123이 산화되면서 방출하는 형광 강도로 측정하였다. 무말랭이 열수추출물과 rhodamine buffer, DHR 123 용액 및 diethylenetriamine-penta acetic acid(DTPA) 및 3-morpholinopyridone(SIN-1)을 첨가하여 암소에서 10분간 반응시킨 후 형광강도

계(Bio-TEK Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)에서 형광도(Ex 485 nm, Em 530 nm)를 측정하였다(28).

Cellular system에서 라디칼 소거능 측정

세포 배양: LLC-PK₁ cell(ATCC, Manassas, VA, USA)을 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액은 100 units/mL의 penicillin-streptomycin과 5%의 fetal bovine serum(FBS)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)을 사용하였다. 세포는 일주일에 2~3회 배양액을 바꾸어주면서 배양하여 6~7일경 세포분화가 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline(PBS)으로 세포를 세척한 후 trypsin-EDTA 용액(0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액)으로 부착된 세포를 분리한 뒤 원심분리 하여 세포를 모은 다음 이를 배지에 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 여러 통에 분주한 다음 액체질소에 보관하면서 계대배양에 사용하였다. 실험 시 LLC-PK₁ cell의 passage number가 10 이상 되지 않는 세포를 사용하였다.

산화 손상 유발: 세포가 confluence 상태가 되면 96 well plate에 well당 1×10^4 cells/mL로 seeding 하여 2시간 배양한 후 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 유리기 발생물질을 첨가하였다. 즉 pyrogallol(O₂⁻ generator) 1.2 mM, SIN-1 (ONOO⁻ generator) 1 mM 또한 SNP(NO generator) 1.2 mM을 처리하여 유리기를 생성시켰다. 산화 스트레스 하에서 세포를 24시간 배양한 후 무말랭이 열수 추출물 시료를 농도별로 처리하여 24시간 다시 배양하였다.

세포 생존율 측정: 살아있는 세포는 MTT에 의해 formazan을 생성하는 원리를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 즉 배양이 끝난 세포의 배양액을 제거한 후 1 mg/mL의 MTT 용액을 well에 주입하여 4시간 동안 재 배양하였다. 생성된 formazan을 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 구하였다(29).

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)

측정: 가압볶음 무말랭이의 세포손상 회복효과를 TBARS와 세포생존율로 알아보았다. TBARS는 Chen 등(30)의 방법을 변형시켜 사용하였다. 즉, 배양액 800 µL을 ependorf tube에 넣고 여기에 TBARS 시약 800 µL에 25% TCA 1 mL와 1% TBA 1 mL를 첨가하여 95°C에서 20분간 가열하였다. 실온에서 냉각한 후 800×g에서 15분간 원심분리 하여 상층액을 얻은 뒤 이를 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

로스팅 온도별 무말랭이 열수추출물의 갈변도 변화

볶음에 의한 무말랭이의 갈색물질 생성을 확인하기 위하여 무말랭이 100 g을 커피로스터기(제네카페, CBR-101A, 제네시스, 경기, 한국)에서 온도별, 즉 80°C, 120°C, 160°C 및 200°C로 12분간 볶는다. 볶은 무말랭이에 물 1 L(w/v)를 첨가하여 추출기(전기약탕기 DW-290, 대웅제약, 서울, 한국)에서 150분 열탕추출 하여 여과한 후 열수 추출물을 얻었다. 볶지 않은(0°C) 무말랭이도 동일한 조건으로 열수 추출하였

다. 추출물의 갈색도 측정을 위해 열수 추출물을 증류수로 40배 희석한 후 96 well Microplate Reader(model 680, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에서 흡광도(415 nm)를 측정하였다(31).

통계분석

무말랭이 열수추출물과 가압볶음 무말랭이 열수추출물의 *in vitro* 라디칼 소거 효과 비교는 Student *t*-test로 하였다. LLC-PK₁ cell에서의 pyrogallol, SNP, SIN-1에 의해 유발된 산화적 스트레스 개선 효과는 one-way analysis of variance (ANOVA)로 검증한 후 실험 군 간에 유의성이 발견되면 Duncan's multiple range test를 실시하여 0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

가압볶음 무말랭이의 일반성분 및 환원당 함량

무말랭이의 일반성분은 수분 16.56%, 조회분 10.25%, 조단백 16.20%, 그리고 조지방 함량은 1.39%이고, 가압볶음 무말랭이의 일반성분은 수분 9.33%, 조회분 10.90%, 조단백 15.53% 그리고 조지방 1.59%로 나타났다(Table 2). 무말랭이와 가압볶음 무말랭이의 환원당 함량은 각각 325.44 mg/g와 315.33 mg/g(Table 3)으로 가압볶음 과정 중 수분이 좀 더 소실되었으며(Table 2) 환원당 함량도 3.17% 유의적으로 ($p < 0.05$) 감소되었다(Table 3).

5-HMF 함량 변화

무말랭이 열수추출물에서 5-HMF는 정량되지 않은 반면, 가압볶음 무말랭이 열수추출물의 5-HMF 함량은 0.57 mg/g이었다(Table 3). 5-HMF는 maillard 반응의 중간 생성물로 무말랭이의 가압볶음 과정 중 생성된 것으로 생각된다. 무말랭이 볶음 전후의 유리아미노산, 환원당, 5-HMF 농도를 비

Table 2. Proximate composition of dried radish (DR) and dried radish roasted with pressure (DRRP) (%)

	Moisture	Crude lipid	Crude protein	Crude ash
DR	16.56±0.30	1.39±0.08	16.20±0.52	10.25±0.06
DRRP	9.33±0.47*	1.59±0.12*	15.53±0.45*	10.90±0.02*

Values are mean±SD.

* $p < 0.05$ by Student *t*-test between DR and DRRP.

Table 3. Changes in free amino acid, reducing sugar and 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) contents, and pH of the dried radish before and after pressurized roasting

	Free amino acid (mg/100 g)	Reducing sugar (mg/g)	5-HMF (mg/g)	pH
DR	183.50	325.44±4.73	0	5.62±0.01
DRRP	49.80*	315.33±1.40*	0.57±7.21*	4.81±0.01*

Values are mean±SD.

DR: dried radish, DRRP: dried radish roasted with pressure.

*Means between DR and DRRP are significantly different by Student *t*-test ($p < 0.05$).

교해 보면 가압볶음 후 무말랭이의 유리아미노산 함량과 환원당 함량은 볶음 전 무말랭이에 비해 유의적으로 감소하였고($p < 0.05$), 5-HMF은 볶음 전에 정량되지 않았으나 볶음 후 정량되었다. Maillard 반응 생성물은 항산화작용(6), 항돌연변이 효과, 항균성(7) 등이 있어 노화억제작용(8), 성인병의 예방작용(9) 등 여러 가지 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 특히 maillard 반응 중간생성물인 5-HMF은 nitric oxide 생성저해(32), tyrosinase 저해(33), 산소와 헤모글로빈의 친화력 증가에 의한 적혈구의 손상 억제(34) 등의 생리활성이 있는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서 무말랭이는 가압볶음 처리 과정 중 maillard 반응이 일어남으로써 항산화 효과가 상당히 증진되었을 것으로 생각된다.

유리아미노산의 함량 변화

무말랭이에 함유된 총 유리아미노산은 183.5 mg/100 g이었고 가압볶음 무말랭이의 총 유리아미노산 함량은 49.8 mg/100 g로 볶음처리 과정 중 약 73%가 감소하였다(Table 4). 가압볶음 과정 중 가장 현저하게 감소한 아미노산은 L-glutamic acid로 거의 90% 이상이 감소하였다(Table 4). 유리아미노산은 휘발성 화합물의 전구물질로 함량이 높을수록 맛을 증진시키며 식품가공 시 열처리 공정 중 당과 반응하여 비효소적 갈변화 반응에 참여하는 것으로 알려져 있다.

Table 4. Changes in the free amino acid contents of the dried radish before and after pressurized roasting (mg/100 g)

Free amino acid	DR	DRRP
Taurine	7.90	2.50
L-Aspartic acid	1.80	0.20
L-Threonine	2.50	0.40
L-Serine	2.30	0.20
L-Glutamic acid	101.80	7.60
L-Glycine	0.80	0.20
L-Alanine	16.00	4.70
L-Valine	11.00	5.00
L-Isoleucine	7.00	3.10
L-Leucine	2.40	1.00
L-Tyrosine	1.00	0.40
L-Phenylalanine	2.10	1.30
β -Alanine	12.70	2.30
γ -Aminobutyric acid	4.50	1.90
L-Lysine	1.60	1.50
1-Methyl-L-histidine	2.40	0.50
Total	183.50	49.80

DR: dried radish, DRRP: dried radish roasted with pressure.

Table 5. IC₅₀ for hot water extract from dried radish (DR) or dried radish roasted with pressure (DRRP) for respective radical scavenging

	IC ₅₀ (μ g/mL)			
	DPPH	O ₂ ⁻	·OH	ONOO ⁻
DR	646.70 ± 30.81	896.10 ± 71.29	722.26 ± 21.62	92.41 ± 1.72
DRRP	135.45 ± 11.20***	566.98 ± 26.93***	531.84 ± 38.75***	60.87 ± 0.82***

IC₅₀ is the concentration of sample required for scavenging radical by 50%.

Values are mean ± SD of triplicates.

*** $p < 0.001$ by Student *t*-test between DR and DRRP at tested radicals.

*In vitro*에서 가압볶음 무말랭이의 라디칼 소거 효과

무말랭이와 가압볶음 무말랭이의 항산화능을 비교하기 위하여 각 라디칼에 대한 소거능을 IC₅₀로 구하였다. 무말랭이 및 가압볶음 무말랭이 열수 추출물은 DPPH radical, superoxide anion radical, hydroxyl radical 및 peroxy nitrite radical을 제거하는 효과가 농도 의존적이었다. 이들의 IC₅₀를 비교해 보면 모든 라디칼에 대해 가압볶음 무말랭이 열수 추출물의 소거효과가 유의적으로 높았다(Table 5, $p < 0.001$). 가압볶음 무말랭이와 무말랭이 열수 추출물의 라디칼 소거효과를 IC₅₀로 비교하였을 때, DPPH 라디칼 소거효과는 79.06%, O₂⁻ 소거능은 36.73%, ·OH 소거능은 26.36%, 그리고 ONOO⁻ 제거 효과는 34.13% 낮았다. 본 결과에 의하면 가압볶음에 의해 무말랭이의 라디칼 소거효과가 높아진 것으로 생각되고 이는 볶음과정 중 유효성분이 증가하거나 새로운 유효성분이 생성되었기 때문으로 사료된다.

LLC-PK₁ 세포에서 가압볶음 무말랭이의 산화적 스트레스 개선 효과

유리기 발생제를 사용하여 LLC-PK₁ 세포에 산화적 스트레스를 유발하여 세포손상을 초래한 다음 가압볶음 무말랭이 열수 추출물을 첨가하여 손상된 세포를 보호하는 효과를 알아보았다. Table 6에서 산화적 스트레스가 유발된 실험군의 세포 생존율을 정상군과 비교해 보았을 때 유ри기의 종류에 상관없이 약 70~80% 가량 세포가 사멸한 것으로 나타나 산화적 손상이 심각한 것을 알 수 있었다($p < 0.001$). LLC-PK₁ cell의 생존율은 pyrogallol에 의해 생성된 O₂⁻에 의해 31.40%, SNP에 의해 생성된 NO에 의해 26.64%, SIN-1에 의해 생성된 ONOO⁻에 의해 21.00%로 낮아졌다(Table 6). 이러한 LLC-PK₁ cell의 세포사멸은 무말랭이 또는 가압볶음 무말랭이 열수추출물을 첨가에 의해 보호되는 것으로 나타났다. LLC-PK₁ cell의 생존율은 무말랭이 열수추출물의 첨가 농도에 비례하여 증가하였고, 특히 가압볶음 무말랭이 열수추출물 첨가군의 세포생존율은 동일 첨가 농도에서 무말랭이 열수 추출물 첨가군에 비해 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 이러한 세포 보호 효과는 유리기의 종류에 상관없이 산화스트레스가 발생된 모든 실험군에서 나타나 무말랭이 또는 가압볶음 무말랭이 열수추출물의 세포손상 보호효과를 확인할 수 있었다.

유리기에 의한 산화적 손상을 확인하기 위하여 지질과산

Table 6. Protective effect of hot water extract from dried radish (DR) or dried radish roasted with pressure (DRRP) on the cell viability of LLC-PK₁ damaged under oxidative stress¹⁾ (Cell viability, %)

Treatment (μg/mL)	Oxidative stress induced by		
	O ₂ ⁻	NO	ONOO ⁻
Normal	100.00±0.95	100.00±1.06	100.00±1.45
Pyrogallol-treated control	31.40±0.70 ^{***}	—	—
SNP-treated control	—	26.64±1.49 ^{***}	—
SIN-1-treated control	—	—	21.00±0.80 ^{***}
DR	100	39.90±2.00 ^f	46.60±2.02 ^e
	250	51.52±1.96 ^c	53.73±1.72 ^d
	500	65.27±1.57 ^c	60.87±1.31 ^c
	1000	68.73±1.84 ^b	66.12±1.91 ^b
DRRP	100	51.17±0.87 ^e	51.89±0.87 ^d
	250	58.08±1.81 ^d	61.08±1.09 ^c
	500	67.19±1.86 ^b	64.37±1.43 ^b
	1000	74.94±1.38 ^a	72.63±1.46 ^a

Values are mean±SD of triplicates.

¹⁾Oxidative stress was induced by superoxide, nitric oxide or peroxynitrite which was generated in the treatment of pyrogallol, sodium nitroprusside (SNP) or 3-morpholinosydnonimine (SIN-1), respectively.

^{***}p<0.001 by Student *t*-test between normal and free radical generator treated control.

^{a-h}Means with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

화물 생성 정도를 살펴보았을 때, Table 7에서 보는 바와 같이 정상상태의 LLC-PK₁ 세포의 TBARS 농도에 비해 산화적 손상을 입은 실험군의 TBARS 농도는 약 400% 정도 유의적으로 증가하였다(p<0.001). 산화적 손상에 의해 생성된 TBARS 농도는 무말랭이 및 가압볶음 무말랭이 열수추출물의 첨가에 의해 유의적으로 감소함을 확인하였다(p<0.05), 무말랭이 또는 가압볶음 무말랭이 열수추출물을 1000 μg/mL 첨가 시 모든 실험군에서 TBARS 생성량이 실험대조군(유리기 생성제만 처리한 군)에 비해 1/2로 감소하여

(Table 7) 무말랭이 열수추출물의 산화스트레스 개선 효과는 현저함을 알 수 있었다. 이러한 산화스트레스 개선 효과는 동일농도 처리 시 가압볶음 무말랭이 열수추출물 첨가군이 무말랭이 열수추출물군에 비해 유의적으로 높았다.

볶음 온도에 따른 갈색물질 생성정도

무말랭이의 갈변물질의 생성정도를 확인하기 위하여 온도별로 볶음한 후 열수추출 하여 이들의 갈색도와 DPPH 소거능과의 상관성을 살펴보았을 때 Fig. 1에서 보는 바와

Table 7. Inhibition effect of hot water extract from dried radish (DR) or dried radish roasted with pressure (DRRP) on the formation of thiobarbituric acid reactive substances in LLC-PK₁ damaged under oxidative stress¹⁾ (TBARS (MDA nmol/mg protein))

Treatment (μg/mL)	Oxidative stress induced by		
	O ₂ ⁻	NO	ONOO ⁻
Normal	0.22±0.01	0.21±0.01	0.19±0.01
Pyrogallol-treated control	0.89±0.01 ^{***}	—	—
SNP-treated control	—	0.79±0.01 ^{***}	—
SIN-1-treated control	—	—	0.82±0.01 ^{***}
DR	100	0.88±0.01 ^a	0.71±0.01 ^a
	250	0.73±0.02 ^b	0.59±0.01 ^c
	500	0.61±0.01 ^c	0.49±0.01 ^c
	1000	0.49±0.01 ^g	0.39±0.01 ^f
DRRP	100	0.71±0.01 ^c	0.67±0.01 ^b
	250	0.69±0.01 ^d	0.53±0.01 ^d
	500	0.58±0.01 ^f	0.49±0.01 ^e
	1000	0.43±0.01 ^h	0.34±0.01 ^g

Values are mean±SD of triplicates.

¹⁾Oxidative stress was induced by superoxide, nitric oxide or peroxynitrite which was generated in the treatment of pyrogallol, sodium nitroprusside (SNP) or 3-morpholinosydnonimine (SIN-1), respectively.

^{***}p<0.001 by Student *t*-test between normal and radical generator treated control.

^{a-h}Means with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

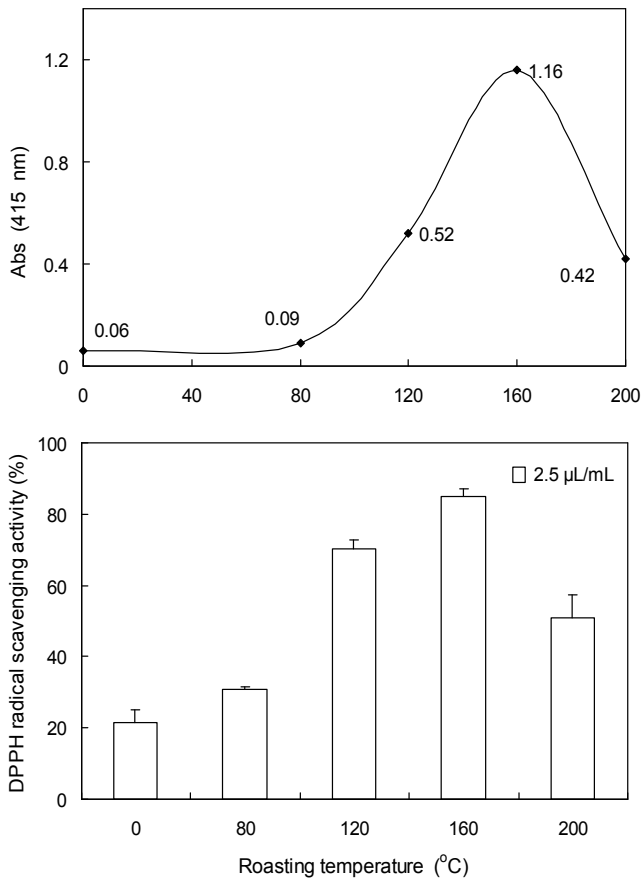


Fig. 1. Changes in browning color and DPPH radical scavenging activity of hot water extract from dried radish during roasting.

같이 갈색도는 볶음시간에 따라 증가하였다가 감소하였으며, DPPH 라디칼 소거능 역시 갈색도에 비례하여 나타났다. 그러나 볶음 전의 무말랭이 열수 추출물과 80°C에서 볶은 무말랭이 열수 추출물의 갈색도는 거의 측정되지 않았으나 DPPH 소거능은 21.67% 및 30.84%로 나타났다. 따라서 무말랭이 열수 추출물의 라디칼 소거능은 무에 함유된 항산화물질 및 볶음 과정 중 생성된 갈변물질에 의해 나타나는 것으로 생각된다.

생체 내 산화스트레스를 유발하는 활성산소 및 활성질소에 의한 산화손상은 잘 알려져 있다. O_2^- 는 에너지 생성과정 중 전자전달계에서 자연적으로 생성되며, NO 역시 혈관 벽에서 nitric oxide synthase에 의해 생성되고, 이들 유리기가 결합되면 ONOO⁻을 생성한다. 이들 유리기는 생체내 공존하는 지질, 단백질 및 DNA의 산화 또는 단백질의 니트로화 과정을 통해 효소를 불활성화시킴으로써 세포사를 유발한다고 알려져 있다(35). 이러한 산화손상은 여러 유리기 중에서도 ONOO⁻에 의한 손상이 가장 크다고 알려져 있는데, 이는 ONOO⁻의 반응성이 NO와 O_2^- 보다 크기 때문이다. 이러한 ONOO⁻의 독성은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부염 등 여러 질환과 관련 있는 것으로 보고되고 있으며(36,37)

최근에는 동맥경화 생성 및 진행을 촉진하는 물질로 많은 주목을 받고 있다(38). 인체 내에는 OH⁻, NO, ONOO⁻와 같은 유리기는 제거하는 항산화효소계가 존재하지 않기 때문에 이러한 활성산소 또는 활성질소의 제거는 체내 항산화물질 농도에 의존하고 있다. 본 연구에서 관찰된 무말랭이 또는 가압볶음 무말랭이 열수 추출물의 산화손상 예방효과는 유리기를 제거할 수 있는 항산화 기능 때문으로 생각된다. 이는 무에 함유되어 있는 함황 성분, 글루코시놀레이트 (glucosinolate), 유리아미노산, 그리고 환원당 등이 건조 과정이나 볶음 과정 중에서 항산화성이 높은 유효성분을 생성함으로써 항산화 기능을 지니는 것으로 사료된다. 5-HMF는 NO 저해효과가 있다(32)고 보고되고 있으며, 볶음 과정 중 생성된 갈변물질의 항산화 효과는 널리 보고되고 있다(6). 이뿐만 아니라 유리아미노산도 항산화기능이 있음이 보고되고 있다(39).

본 연구에서는 가압볶음 무말랭이 열수 추출물의 항산화 효과가 무말랭이 열수 추출물보다 유의적으로 높음이 관찰되었는데 이는 무말랭이에 존재하는 항산화 유효성분과 볶음 과정 중에 생성된 갈변물질에 의해 항산화성이 더욱 증진되었기 때문으로 사료된다. 더욱이 가압볶음 무말랭이 열수 추출물의 향과 맛은 관능평가에서 매우 높은 점수를 받아 (data not shown) 가정에서 손쉽게 항산화성이 높은 차를 만들 수 있을 것으로 생각된다. 가압볶음 무말랭이 차의 상용은 체내 산화스트레스를 억제함으로써 건강증진 효과가 있을 것으로 사료된다.

요 약

무말랭이 및 가압볶음 무말랭이 열수 추출물의 항산화 효과를 *in vitro*와 LLC-PK₁ cellular system에서 살펴보았다. 무말랭이 열수 추출물과 가압볶음 무말랭이 열수 추출물의 라디칼 소거능을 IC₅₀로 비교해 보았을 때 DPPH(646.70 vs 135.45 µg/mL), superoxide anion(896.10 vs 566.98 µg/mL) 및 hydroxyl radical(722.26 vs 531.84 µg/mL)에 대한 가압볶음 열수 추출물의 효과가 유의적으로 높은 것으로 나타났다($p < 0.001$). 이러한 유리기 소거효과는 LLC-PK₁ cell에서 pyrogallol, SNP 및 SIN-1 처리로 superoxide, nitric oxide 및 peroxynitrite를 생성하여 산화스트레스를 유발한 다음 무말랭이 및 가압볶음 무말랭이 열수추출물을 첨가하였을 때 농도 의존적으로 세포생존율이 증가하고, 과산화물 생성량이 감소하여 세포손상을 보호하는 효과가 관찰되었다. 가압볶음 무말랭이 열수 추출물의 산화손상에 대한 보호 효과는 무말랭이 열수추출물에 비해 모든 유리기에서 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 이러한 무말랭이 열수추출물의 항산화 효과는 무에 함유되어 있는 함황 물질, 유리아미노산, 배당체 등에 의한 것으로 생각되며 가압볶음 무말랭이 열수 추출물의 효과가 더 높은 이유는 무말랭이에 함유된 유효성분이

가압볶음에 의해 증가되고 더불어 볶음과정 중에서 생성된 maillard 생성물의 항산화성 때문으로 생각된다. 무말랭이의 환원당 및 유리아미노산 함량은 볶음 후 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$), 이에 반해 maillard 생성물의 중간산물인 5-hydroxymethyl-2-furfural(5-HMF) 함량은 무말랭이 열수 추출물에서는 검출되지 않았던 것이 가압볶음 무말랭이 열수 추출물에서는 0.57 mg/g이 측정되었다. 본 연구 결과 가압볶음 무말랭이 차의 섭취는 체내 유리기에 의한 산화적 손상을 보호하는 효과가 높은 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

문헌

- Kang MH, Chung HK, Song ES, Park WJ. 2002. Improved method for increasing of the oil yields in grape seed. *Korean J Food Sci Technol* 34: 931-934.
- Park NY, Jeong YJ, Kwon JH. 2007. Changes in flavor compounds of *Polygonatum odoratum* root during roasting. *Korean J Food Sci Technol* 39: 99-103.
- Lee GD, Jeong YJ, Park NY, Kwon JH. 1999. Monitoring for the color formation of a Doraji tea by soaking of theanine and sucrose solution and roasting. *Korean J Food Sci Technol* 31: 938-944.
- Chandra R, Bharagava RN, Rai V. 2008. Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation. *Bioresour Technol* 99: 4648-4660.
- Nishigaki R, Watanabe T, Kajimoto T, Tada A, Takamura-Enya T, Enomoto S, Nukaya H, Terao Y, Muroyama A, Ozeki M, Node M, Hasei T, Totsuka Y, Wakabayashi K. 2009. Isolation and identification of a novel aromatic amine mutagen produced by the maillard reaction. *Chem Res Toxicol* 22: 1588-1593.
- Papetti A, Daglia M, Aceti C, Quaglia M, Gregotti C, Gazzani G. 2006. Isolation of an in vitro and ex vivo antiradical melanoidin from roasted barley. *J Agric Food Chem* 54: 1209-1216.
- Summa C, McCourt J, Cammerer B, Fiala A, Probst M, Kun S, Anklam E, Wagner KH. 2008. Radical scavenging activity, anti-bacterial and mutagenic effects of cocoa bean maillard reaction products with degree of roasting. *Mol Nutr Food Res* 52: 342-351.
- Miller AG, Meade SJ, Gerrard JA. 2003. New insights into protein crosslinking via the maillard reaction: structural requirement, the effect on enzyme function, and predicted efficacy of crosslinking inhibitors as anti-aging therapeutics. *Bioorg Med Chem* 11: 843-852.
- Aronson D. 2004. Pharmacological prevention of cardiovascular aging - targeting the maillard reaction. *Br J Pharmacol* 142: 1055-1058.
- Chung HS, Youn KS. 2005. Effects of microwave, ultrasound and roasting pretreatments on hot water extraction of *Acanthopanax senticosus*. *Korean J Food Preserv* 12: 146-150.
- Chung HS, Youn KS. 2006. Optimization of roasting process for preparation of water extracts from job's tears (*Coicis lachryma-jobi*). *Korean J Food Preserv* 13: 119-124.
- Kim KT, Kim JO, Lee GD, Kwon JH. 2005. Antioxidative and nitrite scavenging activities of *Polygonatum odoratum* root extracts with different steaming and roasting conditions. *Korean J Food Preserv* 12: 166-172.
- Lee SH, Lee YR, Hwang IG, Woo KS, Kim KH, Kim JK, Jeong HS. 2009. Antioxidant activities and quality characteristics of germinated rough rice tea according to roasting temperature, time and leaching condition. *Korean J Food Sci Technol* 41: 386-391.
- Kwak EJ, Jo IJ, Sung KS, Ha TY. 2005. Effect of hot water extracts of roasted *Rhus verniciflua* stokes on antioxidant activity and cytotoxicity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 784-789.
- Lee SY, Hwang EJ, Kim GH, Choi YB, Lim CY, Kim SM. 2005. Antifungal and antioxidant of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L. *Korean J Medicinal Crop Sci* 13: 93-100.
- Son GM, Bae SM, Chung JY, Shin DJ, Sung TS. 2005. Antioxidative effect on the green tea and puer tea extracts. *Korean J Food & Nutr* 18: 219-224.
- Yu JS, Woo KS, Hwang IG, Chang YD, Jeong JH, Lee CH, Jeong HS. 2008. Quality characteristics of *Chrysanthemum indicum* L. flower tea in relation to the number of pan-firing. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 647-652.
- Park BH, Back KY, Lee SI, Kim SD. 2008. Quality and antioxidative characteristics of *Cudrania tricuspidata* leaves tea. *Korea J Food Preserv* 15: 461-468.
- Lee HG. 2006. *Food composition table I*. 7th ed. Park HJ, ed. National Rural Resources Development Institute, RDA. Sammi Publisher, Suwon, Korea. p 120-123.
- Jeong MS, Lee GS, Chae HJ. 2004. In vitro biological activity assay of ethanol extract of radish. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 67-71.
- Papi A, Orlandi M, Bartolini G, Barillari J, Iori R, Paolini M, Ferroni F, Fumo MG, Pedulli GF, Valgimigli L. 2008. Cytotoxic and antioxidant activity of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from *Raphanus sativus* L. (Kaiware Daikon) sprouts. *J Agric Food Chem* 56: 875-883.
- Yim HB, Lee GS, Chae HJ. 2004. Cytotoxicity of ethanol extract of *Raphanus sativus* on a human lung cancer cell line. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 287-290.
- Kongruang S, Han MJ, Breton CIG, Penner MH. 2004. Quantitative analysis of cellulose-reducing ends. *Appl Biochem Biotechnol* 113: 213-231.
- Korea Food and Drug Administration. 2003. *The Korea Pharmacopoeia 8th revision a manual*. Lee ES, ed. Shinil-sangsa, Seoul, Korea. p 1166.
- Arana-Sanchez A, Estarron-Espinosa M, Obledo-Vanzquez EN, Padilla-Camberos E, Silva-Vazquez R, Lugo-Cervantes E. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. *Lett Appl Microbiol* 50: 585-590.
- Candan F, Sokmen A. 2004. Effects of *Rhus coriaria* L. (Anacardiaceae) on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. *Phytother Res* 18: 84-86.
- Chalova VI, Crandall PG, Ricke SC. 2010. Microbial inhibitory and radical scavenging activities of cold-pressed terpeneless valencia orange (*Citrus sinensis*) oil in different dispersing agents. *J Sci Food Agric* 90: 870-876.
- Kang KS, Tanaka T, Cho EJ, Yokozawa T. 2009. Evaluation of the peroxynitrite scavenging activity of heat-processed ginseng. *J Med Food* 12: 124-130.

29. de Andrade Vitral JC, Fraga MR, de Souza MA, Ferreira AP, Farinazzo Vitral RW. 2010. In-vitro study of the cellular viability and nitric oxide production by J774 macrophages with ceramic, polycarbonate, and polyoxymethylene brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 137: 247-253.
30. Chen CY, Lin TK, Chang YC, Wang YF, Shyu HW, Lin KH, Chou MC. 2010. Nickel (II)-induced oxidative stress, apoptosis, G2/M arrest, and genotoxicity in normal rat kidney cells. *J Toxicol Environ Health A* 73: 529-539.
31. Morales FJ, Jimenez-Perez S. 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chem* 72: 119-125.
32. Kim NY, Kang TH, Kim DH, Kim YC. 1999. A nitric oxide synthesis inhibitor from the roots of *Gentiana scabra* in RAW 264.7 cells. *Kor J Pharmacogn* 30: 173-176.
33. Sharma VK, Choi J, Sharama N, Choi M, Seo SY. 2004. In vitro anti-tyrosinase activity of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural isolated from *Dictyophora indusiata*. *Phytother Res* 18: 841-844.
34. Abdulamluk O, Safo MK, Chen Q, Yang J, Brugnara C, Ohene-Frempong K, Abraham DJ, Asakura T. 2005. 5-hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. *Br J Haematol* 128: 552-561.
35. Zhao J. 2007. Interplay among nitric oxide and reactive oxygen species: a complex network determining cell survival or death. *Plant Signal Behav* 2: 554-547.
36. Hayashi Y, Sawa Y, Nishimura M, Fukuyama N, Ichikawa H, Ohtake S, Nakazawa H, Matsuda H. 2004. Peroxynitrite, a product between nitric oxide and superoxide anion, plays a cytotoxic role in the development of post-bypass systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg* 26: 276-280.
37. Nugroho A, Park MG, Jin SE, Choi JS, Park HJ. 2009. Quantitative analysis of flavanone glycosides and peroxynitrite scavenging effect of the five oriental medicinal drugs (*Aurantii nobilis* Pericarpium, *Citrii unshiu* Pericarpium, *Citrii unshiu* Semen, *Aurantii Fructus*, *Poncirii Fructus*). *Kor J Pharmacogn* 40: 370-375.
38. Heeba G, Moselhy ME, Hassan M, Khalifa M, Gryglewski R, Malinski T. 2009. Anti-atherogenic effect of statins: role of nitric oxide, peroxynitrite and haem oxygenase-1. *Br J Pharmacol* 156: 1256-1266.
39. Park EY, Murakami H, Matsumura Y. 2005. Effects of the addition of amino acids and peptides on lipid oxidation in a powdery model system. *J Agric Food Chem* 53: 8334-8341.

(2010년 5월 4일 접수; 2010년 6월 15일 채택)