

천연 갈변저해제로서 황금 추출물의 효소적 갈변 저해 효과

박미지¹ · 장민선¹ · 정문철² · 김건희^{1*}

¹덕성여자대학교 건강기능신소재학과

²한국식품연구원

Scutellaria baicalensis Extracts as Natural Inhibitors of Food Browning

Miji Park¹, Min-Sun Chang¹, Moon-Cheol Jeong², and Gun-Hee Kim^{1*}

¹Dept. of Health Functional Materials, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

²Korea Food Research Institute, Gyeonggi 463-746, Korea

Abstract

This study was designed to develop natural browning inhibitors. The anti-browning effects of distilled water (SBD) and 80% ethanol extracts (SBE) of *Scutellaria baicalensis* Georgi in apple slices were investigated by L and ΔE values. Both SBD and SBE were effective in reducing the browning of apple slices and were successively fractionated into chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), and water (H₂O) fractions. These extracts were measured for total phenolic content, flavonoid content, anti-oxidative activity (through free radical scavenging activity and the FRAP assay), ferrous ion chelation, and the inhibition of PPO (polyphenol oxidase) activity. Overall, fractions of SBE were better than fractions of SBD in all measurements. The highest total phenolic and flavonoid content were measured in the EtOAc and CHCl₃ fractions of SBE. EtOAc and CHCl₃ fractions also exhibited the highest anti-oxidative activities (in DPPH and ABTS free radical scavenging and the FRAP assay). Unusually, the highest ferrous ion chelating capacity was found in the H₂O fraction of SBD, but the other fractions showed more than triple the ascorbic acid already in use. Also, CHCl₃ fractions showed a stronger inhibition of PPO activity than ascorbic acid. All of these results suggest that EtOAc and CHCl₃ fractions from *Scutellaria baicalensis* can be used as natural anti-browning agents.

Key words: *Scutellaria baicalensis*, antioxidative, antibrowning, PPO inhibition

서 론

황금(*Scutellaria(S.) baicalensis* Georgi)은 다년생 초본 식물로 꿀풀과(Labiatae)에 속하며 약용식물로 전국에서 재배되고 있다. 예로부터 뿌리를 건조하여 금성황달, 임신질환, 종기 치료 등에 약재로 사용되어 왔다(1). 황금 추출물이나 황금에서 유래된 단일물질의 약리작용으로 항산화, 항균, 항바이러스 작용, 간기능 보호, 항염, 항경련, 접착성 과민반응 억제, 항고지혈 및 항불안 효과 등이 보고되고 있다(2). 또한 이러한 효과들과 관련하여 간세포의 지질과산화나 암세포의 증식을 억제하였으나 정상세포에는 영향을 끼치지 않아 부작용이 없는 치료효과를 지니고 있다고 보고되고 있다(3,4). 이러한 작용을 하는 주요 활성 물질은 baicalin, baicalin, wogonin, wogonoside 및 ganhuangenin으로 이들 모두 flavonoid 화합물이다. 이 flavonoid 화합물은 phenol기를 함유하고 있는 구조로 항산화 활성을 지닌다(2).

최근 경제발전에 따른 1인 및 2인 가족의 증가는 단채급식의 급증, 패스트푸드의 소비량 증가와 함께 편리성과 간편성

을 갖춘 최소 가공처리 된 신선편이 제품의 수요를 증가시켰다(5). 그러나 신선편이 제품은 박피, 절단 등과 같은 제조 공정 중의 조직 손상으로 인하여 저장이나 유통기간 중의 연화나 미생물 번식, 갈변, 악취 등의 품질 저하가 문제시되고 있다(6,7). 특히 갈변은 소비자들이 구매 시 바로 확인할 수 있는 품질 지표로 상품성을 좌우한다(8).

갈변은 농산물이 조직 손상으로 인해 세포 내에 존재하는 catechin, tyrosine과 같은 polyphenol 화합물이 polyphenol oxidase(PPO)의 작용으로 산화되어 theaflavin, melanin 등의 색소를 형성하며 일어나는 현상이다(3,9). 이러한 갈변을 저해하기 위해 Vit. C, 환원제, 산미제, 킬레이팅 약품 등의 화학물질들이 전통적으로 사용되어 왔으나, 최근 건강지향적 식품에 대한 소비자들의 관심 증가로 화학물질 처리 대신 천연물질에 대한 요구가 증가하고 있는 추세이다(6,10,11). 이에 따라 생약제, 차, 과일 및 채소류 등 천연물의 갈변저해 능력이 보고되고는 있으나 실제로 농산물에 적용할 경우는 미비한 실정이다(12,13). 황금 역시 tyrosinase 억제 활성을 본 연구는 있으나 식품에 적용하여 갈변저해능을 살펴본 연구

*Corresponding author. E-mail: ghkim@duksung.ac.kr
Phone: 82-2-901-8496, Fax: 82-2-901-8474

는 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 황금추출물의 사과 슬라이스에 대한 갈변 저해 효과를 살펴본 후, 이 추출물을 다양한 용매로 분획하여 분획물의 항산화 효과와 PPO 저해 활성을 조사하여 황금의 천연 갈변억제제로서의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 황금(*S. baicalensis* Georgi)은 서울 경동시장에서 건조 상태로 구입하여 사용하였다. 갈변 억제 대상으로 사용한 사과는 Fuji 품종으로 경북 영천에서 2012년 수확품을 구입 후 외관이 건전한 것을 선별하여 실험에 사용하였다.

추출물 제조

황금 추출물은 열수 및 ethanol(EtOH) 추출방법을 적용하였다. 건조하여 분쇄한 황금 200 g에 증류수 및 80% EtOH 1,500 mL를 넣고 60°C의 진탕수조에서 6시간 3회 반복 추출하였다. 각 추출물은 감압농축한 후 동결건조를 거쳐 분말형태로 제조하여 사과의 갈변저해제로 사용하였다. 또한 각 추출물을 극성이 다른 3가지 용매로 순차 분획, 추출하여 chloroform(CHCl₃), ethyl acetate(EtOAc)와 잔류 H₂O 분획물을 각각 얻었다. 이를 농축한 분말형태의 시료를 항산화 및 항갈변 측정의 시료로 사용하였다.

갈변저해 처리 및 저장

사과를 세라믹 칼을 이용하여 10 mm 두께로 절단한 후 분말형태의 추출물 0.1% 용액에 1분간 침지처리 한 후 종이 타월로 흐르는 물기를 제거하여 상온에서 48시간 동안 보관하며 외관의 변화를 관찰하였다.

사과 슬라이스의 표면색 측정

표면색은 표준백판(L=87.40, a=-0.49, b=1.96)으로 보정된 chromameter(CR-400, Minolta Co., Osaka, Japan)를 사용하여 시료 절단면의 중심부위를 3반복으로 Hunter L, a, b값을 측정하였고, 각 처리구간 색도의 차이는 색차(color difference, ΔE)를 이용하여 분석하였으며 계산식은 다음과 같다(14).

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$$

총 페놀 함량 측정

Folin-Ciocalteu법을 이용하여 측정하였으며(15), 0.1% 시료 0.1 mL에 2 N Folin-Ciocalteu 용액 0.5 mL를 첨가하여 3분간 반응시킨 후 20% Na₂CO₃ 1 mL를 첨가하여 1시간 동안 침전반응을 시켰다. 반응 용액을 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 그 상층액을 취하여 microplate reader(M2, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid

를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

0.1% 시료 10 μL에 EtOH 60 μL와 10% aluminium chloride hexahydrate 4 μL, 1 M potassium acetate 4 μL, 증류수 122 μL를 첨가하여 실온에서 30분 동안 반응시킨 후, microplate reader(M2, Molecular Device)를 이용하여 415 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였다(16).

DPPH radical 소거능 측정

0.1% 농도의 시료 50 μL를 시험관에 가하고 0.3 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 용액 150 μL를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 515 nm에서 microplate reader(M2, Molecular Device)를 이용하여 측정하고, 아래의 식으로부터 DPPH radical 소거활성을 계산하였다(17). 추출물 대신 양성대조군으로 ascorbic acid와 trolox를 넣어 같은 방법으로 실험을 수행하여 기존의 갈변저해제 및 항산화제의 효과와 비교하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = [1 - (A/B)] \times 100$$

A, sample의 흡광도; B, blank solution의 흡광도

ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical의 소거활성은 7.4 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)와 2.6 mM potassium persulphate를 하루 동안 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 후 이 용액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.4±0.05가 나오도록 buffer로 희석하여 사용하였다. 흡광도를 맞춘 ABTS 용액 190 μL에 0.1% 농도의 시료 10 μL를 가하여 10분간 반응시키고, 735 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식으로부터 ABTS 라디칼 소거활성을 계산하였다(18). 추출물 대신 양성대조군으로 ascorbic acid와 trolox를 넣어 같은 방법으로 실험을 수행하여 기존의 갈변저해제 및 항산화제의 효과와 비교하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity(\%)} = [1 - (A/B)] \times 100$$

A, sample의 흡광도; B, blank solution의 흡광도

FRAP assay

Ferric reducing antioxidant power(FRAP) assay에 사용된 시약은 0.3 M sodium acetate buffer(pH 3.6)와 40 mM HCl로 용해시킨 10 mM 2,4,6-tripyridyl-S-triazine(TPTZ) solution, 그리고 20 mM FeCl₃ solution을 사용하였다. 미리 제조된 sodium acetate buffer, TPTZ solution 및 FeCl₃ solution을 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 37°C에서 10~15분간 반응시켜 FRAP reagent를 준비하였다. FRAP reagent 150 μL를 0.1% 시료 50 μL에 혼합하여 실온에서 20분간 방치한 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 FRAP은 FeSO₄를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 Fe²⁺의 함량을 구하였다(19). 추출물 대신 양성대조군으로 ascorbic acid와

resorcinol을 넣어 같은 방법으로 실험을 수행하여 기존의 갈변저해제의 효과와 비교하였다.

철 이온(Fe^{2+})에 대한 chelate 효과 측정

0.1% 시료 50 μ L에 2 mM $FeCl_2$ 5 μ L를 가한 후, 실온에서 5분간 방치한 다음 증류수 130 μ L를 가하였다. 이 용액에 5 mM ferrozine 15 μ L를 가한 후 다시 10분간 반응시킨 후에 562 nm에서 microplate reader(M2, Molecular Device)를 이용하여 측정하고, 아래의 식으로부터 철 이온(Fe^{2+})에 대한 킬레이트 효과를 %로 나타내었다(20). 추출물 대신 양성대조군으로 ascorbic acid와 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)를 넣어 같은 방법으로 실험을 수행하여 기존의 갈변저해제 및 항산화제의 효과와 비교하였다.

$$\text{Chelating activity effect(\%)} = [1 - (A/B)] \times 100$$

A, sample의 흡광도; B, blank solution의 흡광도

Polyphenol oxidase 활성 저해력 조사

갈변 효소인 PPO 저해 활성은 50 mM phosphate buffer(pH 6.5) 1.7 mL와 PPO(500 units/mg) 0.2 mL를 혼합한 후 0.1%의 저해제를 0.1 mL를 첨가하여 25°C로 조절된 항온수조에서 15분간 방치하고 기질로서 4 mM catechin 용액 1 mL를 각각 첨가한 후, microplate reader(M2, Molecular Device)를 이용하여 420 nm에서 5분간의 변화를 측정하였다. 효소의 활성능은 흡광도의 변화를 관찰한 후 curve의 직선부위로부터 계산하였으며 효소 저해활성은 흡광도 감소량 %로 나타내었다(21). 추출물 대신 양성대조군으로 ascorbic acid를 넣어 같은 방법으로 실험을 수행하여 기존의 갈변저해제의 효과와 비교하였다.

$$\text{Inhibition of PPO activity(\%)} = [1 - (A/B)] \times 100$$

A, sample의 흡광도; B, blank solution의 흡광도

IC₅₀ value 측정

시료별 PPO 저해활성의 상대적 비교를 위하여 효소활성

의 50%를 저해하는 시료의 농도를 환산하여 IC₅₀ 값으로 하였다.

통계처리

통계처리는 SPSS Win program(Version 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 ANOVA 처리를 하였으며 least significance difference(LSD) test($p < 0.05$)로 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

사과 슬라이스의 표면색

사과 슬라이스를 황금 추출물에 침지하여 상온에서 48시간 동안의 외관 변화를 관찰한 결과, 황금 추출물 무처리군보다 황금 추출물 처리군에서 갈변이 다소 저해되는 것이 관찰되었다(Fig. 1). 48시간 후의 표면색에 있어서 무처리군과 SBD, SBE의 L값이 각각 64.83, 66.28, 66.89로 측정되어 무처리군의 L값이 가장 낮아 육안으로 판단한 황금추출물의 갈변저해를 수치적으로 확인할 수 있었다(Table 1). 48시간 후의 L값만을 보면 SBD보다 SBE의 값이 높았으나 0시간의 초기 L값을 고려하여 L값의 감소 정도로 비교하면 SBD가 SBE보다 갈변저해효과가 우수하다 할 수 있다. 그러나 SBE와 SBD의 L값의 유의적 차가 존재하지 않으므로 L값만으로 추출용매에 따른 황금 추출물의 실제적인 갈변저해효과를 판단하기에는 다소 무리가 있었다. 사과표면의 색변화는 L, a, b값을 모두 고려한 수치인 ΔE 값으로 나타낼 수 있으며 값이 클수록 색 변화가 많이 일어난 것으로 판단할 수 있다. ΔE 값의 경우 무처리군의 값이 4.77, SBD가 2.86, SBE가 3.34로 무처리군에 비해 황금추출물 처리군들의 색변화가 적게 일어난 것을 알 수 있었으며, SBD의 갈변저해효과가 가장 뛰어났다. Weller 등(22)은 L값의 변화는 PPO의 활성 증가와 관련이 있으며 PPO는 조직이 노화되거나 저장 시



Fig. 1. Changes in the appearances of apple slices treated in 0.1% distilled water and ethanol extracts from *S. baicalensis* after 48 hours at room temperature. SBD, distilled water extract of *S. baicalensis*; SBE, 80% EtOH extract of *S. baicalensis*.

Table 1. Changes in the Hunter L, a, b and ΔE value of apple slices treated in 0.1% distilled water and EtOH extracts from *S. baicalensis* after 48 hours at room temperature

Treatment ¹⁾	0 hr			48 hr			ΔE
	L	a	b	L	a	b	
Untreated	68.86 ± 1.07 ^{a2)}	-2.75 ± 0.28 ^a	16.38 ± 1.23 ^b	64.83 ± 1.01 ^a	-1.54 ± 0.03 ^{ab}	18.62 ± 1.44 ^a	4.77 ± 1.44 ^b
SBD	67.71 ± 0.21 ^a	-2.19 ± 0.35 ^b	15.36 ± 1.47 ^b	66.28 ± 0.52 ^a	-2.15 ± 0.07 ^b	17.84 ± 0.57 ^b	2.86 ± 0.30 ^a
SBE	69.82 ± 2.20 ^a	-2.47 ± 0.13 ^{ab}	19.34 ± 0.52 ^a	66.89 ± 4.00 ^a	-1.38 ± 0.71 ^a	20.50 ± 0.63 ^{ab}	3.34 ± 1.38 ^{ab}

¹⁾SBD, distilled water extract of *S. baicalensis*; SBE, 80% EtOH extract of *S. baicalensis*.

²⁾Each value represented mean ± SD of triplicate analyses. Values within each column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

스트레스를 받았을 때 용해성이 매우 커지고 활성화된다고 하였다. PPO는 산소와 반응하여 산화가 촉진되는데, 갈변 저해 처리 시 일반적으로 추출물에 침지하는 방법으로 진행되므로 과육이 코팅된다. 이로 인해 산소가 차단되어 PPO의 활성을 저해시키게 되며, 황금이 지닌 항산화능으로 인해 PPO의 저해활성 또한 증가된 것이라 판단된다. 따라서 다양한 용매로 분획한 황금 분획물의 항산화능과 PPO 저해능을 측정하여 천연 항갈변제로서의 특성을 조사하였다.

총 페놀 및 플라보노이드 함량

페놀성 화합물은 다양한 구조로 식물체내에 존재하고 있으며, 플라보노이드는 페놀성 화합물 중에서 자연적으로 생성되는 가장 큰 그룹 중 하나이다. 이들은 분자 내에 phenolic hydroxyl기를 지니고 있어 단백질 또는 효소 단백질, Fe²⁺, Cu²⁺ 등의 2가 금속이온과의 결합력, 기타 거대 분자들과 결합하는 성질과 높은 항산화 효과를 가지는 것으로 알려져 있다(23,24). 황금 추출물 100 g의 페놀함량을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 전반적으로 황금의 열수 추출 분획물보다 EtOH 추출 분획물의 총 페놀 함량이 더 높았으며, 분획용매별로 각각 EtOAc 분획물(53.95, 70.80 g·GAE/100 g) > CHCl₃ 분획물(53.30, 65.82 g·GAE/100 g) > H₂O 분획물(24.25, 23.22 g·GAE/100 g)의 순으로 EtOAc 분획물의 페놀 함량이 가장 높았다. Hyun 등(25)의 연구에 따르면 구절초의 용매분획물별 페놀함량은 EtOAc > CHCl₃ > H₂O 분획물 순으로 높게 조사되어 본 연구와 같은 양상을 나타냈다. Cai 등(26)은 황금의 열수 및 MeOH 추출물 100 g의 페놀함량은 각각 2.57, 8.17 g이었다고 보고하여 열수 추출물보다 MeOH 혹은 EtOH 추출물이 많은 페놀을 함유한다는 점에서 본 연구와 유사한 경향을 보였다.

황금 추출물의 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 황금의 열수 및 EtOH 추출의 CHCl₃ 분획물(11.43, 14.83 g·QE/100 g) > EtOAc 분획물(6.13, 10.30 g·QE/100 g) > H₂O 분획물(1.63, 4.13 g·QE/100 g)의 순으로 CHCl₃

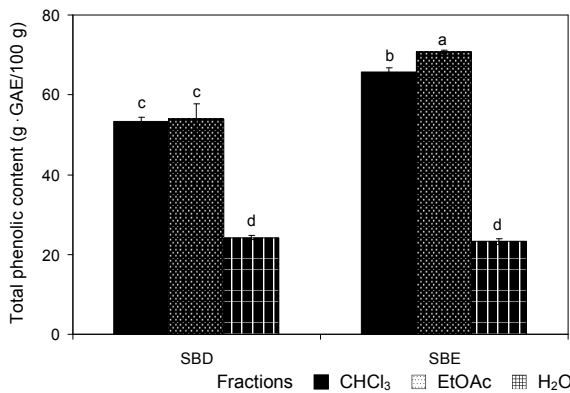


Fig. 2. Total phenolic contents of 0.1% fractions which extracted from *S. baicalensis*. SBD, distilled water extract of *S. baicalensis*; SBE, 80% EtOH extract of *S. baicalensis*. Each value represented mean±SD of triplicate analyses. Values that are followed by different letters are significantly different (p<0.05).

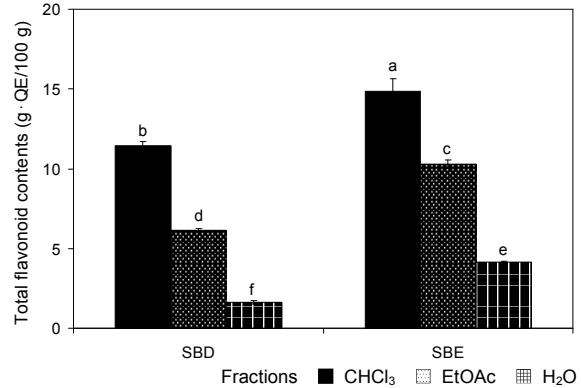


Fig. 3. Total flavonoid contents of 0.1% fractions which extracted from *S. baicalensis*. SBD, distilled water extract of *S. baicalensis*; SBE, 80% EtOH extract of *S. baicalensis*. Each value represented mean±SD of triplicate analyses. Values that are followed by different letters are significantly different (p<0.05).

분획물에서 플라보노이드 함량이 가장 높았다. 총 페놀함량과는 다른 경향을 나타내었지만 EtOH 추출의 분획에서 높은 함량을 나타냈다는 점에서 유사하였다.

DPPH radical 소거능

DPPH는 짙은 자주색을 나타내며 질소 중심의 안정한 free radical로서 515~520 nm에서 최대 흡수치를 나타낸다. 황 함유 아미노산, ascorbic acid, 페놀성 화합물 등의 항산화 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 DPPH-H로 환원되면서 노란색으로 탈색되며 흡광도가 감소된다(27). 황금 추출물 0.1%의 DPPH radical 소거능을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 황금 열수 추출의 용매분획물에 대하여 EtOAc 분획물이 86.26%로 가장 높았고, EtOH 추출의 용매분획물에 대하여 CHCl₃ 분획물이 90.92%로 가장 높았다. 양성대조군으로 사용한 0.1%의 ascorbic acid(96.23%)와 trolox(96.21%)의 라디칼 소거능과 비교하였을 때 전반적으로 황금 열수 추출의 분획물은 73.45~89.64%, 황금 EtOH 추출의 분획물은 73.58~94.49%의 값을 나타내어(p<0.05) 대체적으로 EtOH

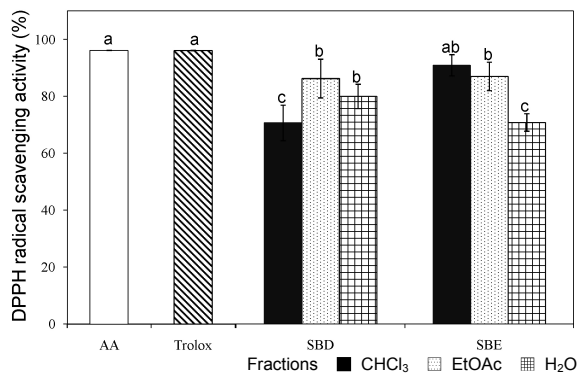


Fig. 4. DPPH radical scavenging activities of 0.1% fractions which extracted from *S. baicalensis*. AA, ascorbic acid; SBD, distilled water extract of *S. baicalensis*; SBE, 80% EtOH extract of *S. baicalensis*. Each value represented mean±SD of triplicate analyses. Values that are followed by different letters are significantly different (p<0.05).

추출의 분획물이 열수 추출의 분획물보다 라디칼 소거능이 우수한 것으로 조사되었다. 또한 가장 높은 활성을 나타낸 EtOH 추출의 CHCl_3 분획물의 경우 ascorbic acid와 trolox의 값과 유사한 소거능을 보였다. 이는 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 높으면 항산화능도 우수하다는 Kim 등(28)의 연구와도 유사한 경향을 나타내었다. Park과 Kim(29)이 보고한 황금추출물의 DPPH radical 소거능의 경우 열수 추출물이 EtOH 추출물보다 우수한 활성을 보여 본 연구와 다소 차이가 있었으나, 이는 시료의 추출방법에 따른 차이로 사료된다. Kim 등(30)이 보고한 황금 MeOH 추출의 EtOAc 분획층의 소거능은 양성대조군으로 쓰인 BHT와 비슷하였으며, 이는 본 연구결과와도 유사하였다.

ABTS radical 소거능

ABTS radical 소거능의 경우 ABTS와 potassium persulfate가 반응하여 ABTS cation radical이 생성되면 청록색을 띠게 되는데 이때 항산화물질과 반응하여 ABTS cation radical이 소거되면서 청록색이 탈색된다. 따라서 높은 탈색율을 보일수록 우수한 항산화 활성을 기대할 수 있다(27). 황금 추출물 0.1%의 ABTS radical 소거능을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 황금 열수 및 EtOH 추출 모두 CHCl_3 와 EtOAc 분획물에서 우수한 활성을 보였으나, H_2O 분획물에서는 현저히 낮은 활성을 보였다. 양성대조군으로 사용한 0.1%의 ascorbic acid(96.23%)와 trolox(97.67%)의 라디칼 소거능과 비교하였을 때 황금 열수추출의 CHCl_3 과 EtOAc 분획물의 경우 각각 87.30%, 87.17%, EtOH 추출의 CHCl_3 과 EtOAc 분획물의 경우 각각 96.34%, 99.07%에 해당하는 수치를 나타내어 EtOH 추출의 분획물이 ascorbic acid 및 trolox의 값과 유사한 소거능을 보였다. 대체적으로 EtOH 분획물이 열수 분획물보다 라디칼 소거능이 우수하였으며, 총 페놀 함량과 유사한 경향을 나타내었다. Cai 등(26)은 황금의 MeOH 추출물이 열수 추출물보다 ABTS radical 소거능이 더 높다고 보고하였는데 이는 본 연구의 EtOH 추출의 용매분획물

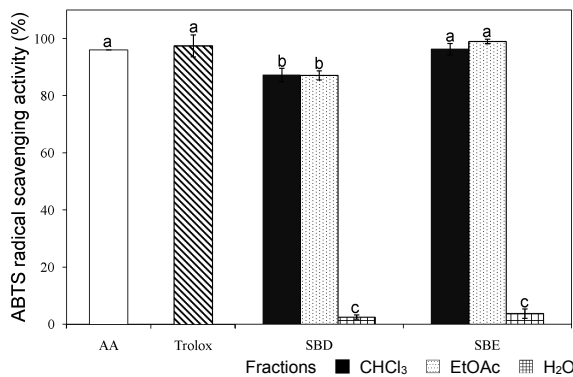


Fig. 5. ABTS radical scavenging activities of 0.1% fractions which extracted from *S. baicalensis*. AA, ascorbic acid; SBD, distilled water extract of *S. baicalensis*; SBE, 80% EtOH extract of *S. baicalensis*. Each value represented mean \pm SD of triplicate analyses. Values that are followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

이 더 높은 소거능을 보인 것과 같은 경향을 보였다.

FRAP assay

FRAP assay는 환원력을 측정하는 방법으로 ferric tri-pyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 시료의 항산화 성분 에 의해 ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+} -TPTZ)으로 환원되면서 593 nm에서의 흡수치가 증가한다(31). 0.1%의 황금 추출물의 FRAP assay에 의한 항산화 활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같으며, 분획물 간의 패턴은 DPPH radical 소거능 (Fig. 2)과 유사하였다. 황금 열수 추출의 EtOAc 분획물의 항산화능이 260.04 mM Fe^{2+} /mL로 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid(280.03 mM Fe^{2+} /mL)의 92.86%에 해당하는 수치를 나타내며 가장 우수한 활성을 보였다. 열수 및 EtOH 추출의 다른 분획물들 또한 ascorbic acid의 77.20~88.42%에 이르는 값을 나타내어 대체적으로 우수한 활성을 보였다.

철 이온(Fe^{2+})에 대한 chelating 효과

Ferrozine은 Fe^{2+} 와 복합체를 형성하여 붉은색을 띠게 되는데 이때 시료 중의 chelating 효과를 가진 물질이 Fe^{2+} -ferrozine 복합체의 형성을 방해하여 발색을 저해시킨다(32). Metal chelating agent는 제2의 항산화제로 불리며 구연산, 주석산 등의 유기산 및 폴리페놀 성분은 Fe^{2+} , Cu^{2+} 와 같은 산화촉진제를 chelating하여 free radical의 형성을 억제하는 효과를 나타낸다고 보고되고 있다(33). 본 연구에서 PPO와 직접 연관된 Cu^{2+} 에 대한 chelating 효과를 측정하진 않았지만, 동일한 전자가(2+)를 지닌 Fe^{2+} 에 대한 chelate 효과를 측정함으로써 Cu^{2+} 에 대한 chelating 효과를 유추하였다. Chelating 효과가 우수하다면 PPO 자체의 활성을 저하시켜 갈변저해에 효과가 있다고 할 수 있다. 황금 추출물 0.1%의 Fe^{2+} 에 대한 chelating 효과를 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. 황금 열수 및 EtOH 추출의 H_2O 분획물이 각각 71.02, 53.90%로 높은 활성을 나타내었고, CHCl_3 과 EtOAc 분획물의 경우 25% 내외의 활성을 나타내었다. 이는 현재

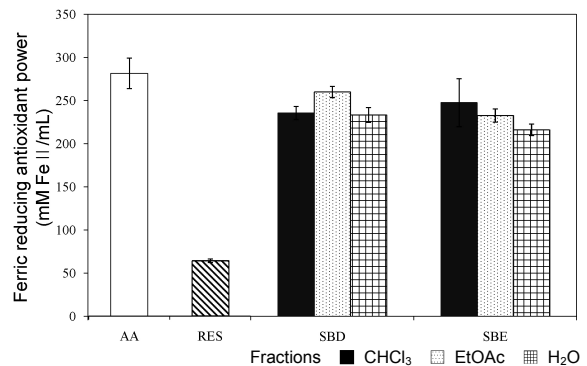


Fig. 6. Ferric reducing antioxidant power of 0.1% fractions which extracted from *S. baicalensis*. AA, ascorbic acid; RES, resorcinol; SBD, distilled water extract of *S. baicalensis*; SBE, 80% EtOH extract of *S. baicalensis*. Each value represented mean \pm SD of triplicate analyses. Values that are followed by different letters are not significantly different ($p < 0.05$).

Table 2. PPO inhibition activities of each fractions which extracted from *S. baicalensis*

Fractions	Distilled water		80% EtOH	
	Inhibition ¹⁾	IC ₅₀ ²⁾	Inhibition	IC ₅₀
Ascorbic acid	18.94±3.49 ^{b3)}	0.14±0.00 ^a		
CHCl ₃	11.52±1.72 ^{cd}	0.43±0.07 ^c	26.29±0.98 ^a	0.35±0.02 ^b
EtOAc	13.17±4.34 ^{cd}	0.44±0.06 ^c	15.08±3.11 ^{bc}	0.56±0.07 ^d
H ₂ O	9.96±2.81 ^d	0.79±0.02 ^e	10.93±5.93 ^d	0.77±0.05 ^e

¹⁾PPO inhibition activities of 0.1% each fractions, % (w/v).

²⁾IC₅₀: the half maximal inhibitory concentration, % (w/v).

³⁾Each value represented mean±SD of triplicate analyses. Values within each column followed by different letters are significantly different (p<0.05).

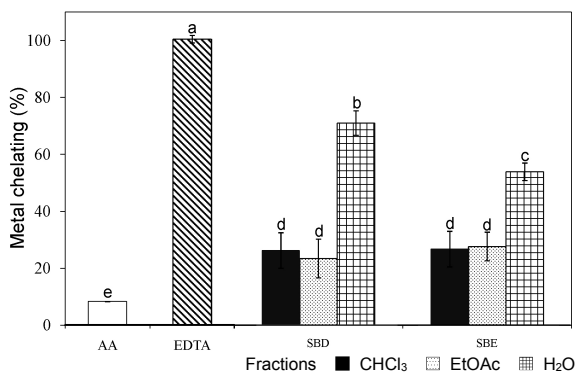


Fig. 7. Metal chelating activities of 0.1% fractions which extracted from *S. baicalensis*. AA, ascorbic acid; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; SBD, distilled water extract of *S. baicalensis*; SBE, 80% EtOH extract of *S. baicalensis*. Each value represented mean±SD of triplicate analyses. Values that are followed by different letters are significantly different (p<0.05).

신선편이 농산물의 항갈변제로 주로 알려져 있는 ascorbic acid의 chelating 효과가 8.12%로 측정된 것과 비교하여 약 3배 이상의 효과로 높은 chelating 효과를 보였다.

Polyphenol oxidase 활성 저해력

PPO의 반응은 monophenol이 diphenol이 되는 hydroxylation과 diphenol이 quinone이 되는 산화과정에서 작용하는 것으로 이 quinone이 중합반응을 거쳐 갈색이나 흑색을 띠는 melanin이 형성되면서 갈변이 일어난다(34). 항산화제 혹은 항갈변제들은 이 두 과정에서 다양한 메카니즘으로 작용을 하지만 모두 페놀의 산화를 저해시켜 이루어지는 반응으로 본 연구에서는 tyrosinase를 효소로, catechin을 기질로 하였다(35). 황금 추출물 0.1%의 PPO 활성 저해력을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 황금 열수 추출의 용매분획물은 EtOAc(13.17%)> CHCl₃(11.52%)> H₂O(9.96%)의 순으로, EtOH 추출의 용매분획물은 CHCl₃(26.29%)> EtOAc(15.08%)> H₂O(10.93%)의 순으로 나타났다. 대체적으로 EtOH 추출의 분획물이 열수 추출의 분획물보다 우수한 활성을 보였고, 열수 추출에서는 EtOAc 분획물, EtOH 추출에서는 CHCl₃ 분획물이 가장 뛰어난 활성을 나타내었다. 이는 총 페놀 및 플라보노이드 함량과 유사한 경향을 보여 플라보노이드 계열의 페놀물질인 황금의 주요 활성물질들이 PPO의 활성을

저해한 것이라 추정된다. IC₅₀의 경우 황금의 열수와 EtOH 추출 모두 H₂O 분획물(0.79, 0.77%)> EtOAc 분획물(0.44, 0.56%)> CHCl₃ 분획물(0.43, 0.35%)의 순으로 높게 나타나 CHCl₃ 분획물이 PPO 활성 저해력을 50%에 이르게 하는 농도가 가장 낮았다. 가장 우수한 활성을 보인 에탄올 추출의 CHCl₃ 분획물과 현재 갈변저해제로 사용되고 있는 ascorbic acid와 비교하였을 때, CHCl₃ 분획물이 ascorbic acid보다 높은 값을 보여 ascorbic acid가 더 우수하였다. 반면 두 물질 0.1%의 PPO 활성 저해력은 CHCl₃ 분획물이 ascorbic acid보다 우수한 것으로 나타나, 갈변저해제를 0.1% 내외의 저농도로 사용한다면 황금 추출물이 ascorbic acid보다 더 효과적이라 추정된다. 황금의 다양한 추출물의 항산화 및 tyrosinase 저해활성에 대한 연구는 다수 진행되어 있지만(2-4,30,36), 이 추출물을 농산물에 적용하여 갈변저해 정도를 실제적으로 살펴본 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 앞으로 황금의 다양한 추출물에 대한 실제적인 갈변저해 정도를 평가하는 연구가 추가적으로 필요하다고 사료된다.

요 약

천연 갈변저해 소재 발굴을 위해 황금을 열수와 EtOH로 추출한 후, 각각의 추출물에 사과 슬라이스를 침지하여 외관의 변화를 관찰한 결과 황금의 열수와 에탄올 추출물이 사과의 갈변억제에 효과적이었다. 이에 열수와 EtOH 추출물을 각각 상법에 따라 분획하여 CHCl₃, EtOAc, H₂O 분획물로 총 6가지 분획물을 얻었다. 이 분획물에 대한 총 페놀과 플라보노이드 함량 및 라디칼 소거능과 환원력 측정, 금속이온 chelating 등을 통하여 항산화 효과와 PPO(polyphenol oxidase) 저해 활성을 측정하였다. 대체적으로 EtOH 추출의 분획물이 열수 추출의 분획물보다 페놀과 플라보노이드 함량 및 항산화 활성이 뛰어났다. 총 페놀의 경우 EtOAc 분획물에서, 플라보노이드의 경우 CHCl₃ 분획물에서 가장 높은 함량을 나타내었다. DPPH와 ABTS radical 소거능, FRAP assay 결과 EtOAc 및 CHCl₃ 분획물에서 높은 항산화능을 보여 총 페놀 및 플라보노이드 함량과 유사한 경향을 나타내었다. 금속이온 chelating 활성은 특이적으로 H₂O 분획물에서 높은 활성이 나타났으나 다른 분획물들 또한 ascorbic

acid에 비해 약 3배 이상의 우수한 활성을 나타냈다. PPO 저해 활성의 경우 CHCl_3 분획물에서 높은 저해활성을 나타내어 다른 항산화 측정 결과와 유사한 경향을 보였으며, ascorbic acid에 비해 우수한 PPO 저해 활성을 보였다. 따라서 황금의 EtOAc 및 CHCl_3 분획물은 우수한 항산화 및 PPO 저해 활성으로 인해 갈변저해제로서 효과적이라 판단된다.

감사의 글

본 논문은 농림수산식품부 농림기술개발사업의 연구비 지원(310017-03-3-SB010)과 연구의 일부는 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구 지원사업으로 수행된 연구(2012-041653)로 이에 감사드립니다.

문헌

- Kim YL, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Song HJ, Lee, YJ, Lee YC, Lee JH, Im KH, Cho SI, Jeong JG, Joo YS, Choi HY. 2004. *Herbal medicine*. Young Lim Co., Seoul, Korea. p 216-217.
- Shang X, He X, He X, Li M, Zhang R, Fan P, Zhang Q, Jia Z. 2010. The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review. *J Ethnopharmacol* 128: 279-313.
- Kim SI, Do WS, Kim KS. 1999. Antioxidant effects of SR (*Scutellariae Radix*) aqua-acupuncture extract solution in vitro. *J Korean Acupuncture & Moxibustion Soc* 16: 497-509.
- Himeji M, Ohtsuki T, Fukazawa H, Tanaka M, Yazaki S, Ui S, Nishio K, Yamamoto H, Tasaka K, Mimura A. 2007. Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer Lett* 245: 269-274.
- Rageart P, Verbeke W, Devlieghere F, Debevere J. 2004. Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. *Food Quality Preference* 15: 259-270.
- Sapers GM, Miller RL. 1992. Enzymatic browning control in potato with ascorbic acid-2-phosphates. *J Food Sci* 57: 1132-1135.
- Braaksma A, Schaap DJ, Schipper CMA. 1999. Time of harvest determines the postharvest quality of the common mushroom *Agaricus bisporus*. *Postharvest Biol Technol* 16: 195-198.
- Sapers GM, Miller RL, Miller FC, Cooke PH, Chio SW. 1994. Enzymatic browning control in minimally processed mushrooms. *J Food Sci* 59: 1042-1047.
- Martinez MV, Whitaker JR. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci Technol* 6: 195-200.
- Fallik E. 2004. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). *Postharvest Biol Technol* 32: 125-134.
- Lee GC, Ahn SC. 1997. Inhibition effect of several cereal extracts on enzymatic browning. *Korean J Soc Food Sci* 13: 390-395.
- Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DS. 1995. Screening of tyrosinase inhibitors from plants. *Korean J Food Sci Technol* 27: 891-896.
- Kim JK, Cha WS, Park JH, Oh SL, Cho YJ, Chun SS, Choi C. 1997. Inhibition effect against tyrosinase of condensed tannins from Korean green tea. *Korean J Food Sci Technol* 28: 173-177.
- Chang MS, Park M, Jeong MC, Kim D, Kim GH. 2011. Antioxidative and antibrowning effects of *Taraxacum platycarpum* and *Chrysanthemum indicum* extracts as natural antibrowning agents. *Korean J Food Preserv* 18: 584-589.
- Richard-Forget FC, Goupy PM, Nicolas JJ. 1992. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 2. Kinetic studies. *J Agric Food Chem* 40: 2108-2113.
- Lin JY, Tang CY. 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem* 101: 140-147.
- Ramos A, Visozo A, Piloto J, Garcia A, Rodriguez CA, Rivero R. 2003. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 87: 241-246.
- Woo KS, Seo MC, Kang JR, Ko JY, Song SB, Lee JS, Oh BG, Park GD, Lee YH, Nam MH, Jeong HS. 2010. Antioxidant compounds and antioxidant activities of the methanolic extracts from milling fractions of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1695-1699.
- Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
- Dinis TC, Maderia VM, Almeida LM. 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino-salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 315: 161-169.
- Dennis D, Miller JW. 1998. Enzymatic browning. In *Kinetics of Tyrosinase*. Chapman & Hall, Inc., New York, NY, USA. p 44-49.
- Weller A, Sims CA, Matthews RF, Bates RP, Brecht JK. 1997. Browning susceptibility and changes in composition during storage of carambola slices. *J Food Sci* 62: 256-260.
- Jeong CH, Choi SG, Heo HJ. 2008. Analysis of nutritional components and evaluation of functional activities of *Sasa borealis* leaf tea. *Korean J Food Sci Technol* 40: 586-592.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2: 152-159.
- Hyun MR, Lee YS, Park YH. 2011. Antioxidative activity and flavonoid content of *Chrysanthemum zawadskii* flowers. *Kor J Hort Sci Technol* 29: 68-73.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74: 2157-2184.
- Chung HJ, Jeon IS. 2011. Antioxidative activities of methanol extracts from different parts of *Chrysanthemum zawadskii*. *Korean J Food Preserv* 18: 739-745.
- Kim KB, Yoo KH, Park HY, Jeong JM. 2006. Anti-oxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 328-333.
- Park CS, Kim DH. 2008. Biological activities of extracts from *Scutellaria baicalensis*, *Zizyphus jujuba* and *Atractylodes macrocephala*. *Kor J Herbology* 23: 41-51.
- Kim YH, Paek JY, Kwon HJ, Lee JW, Yoon KH, Han MD. 2009. Antioxidant and antibacterial activities of ethyl acetate extract from *Scutellaria baicalensis*. *Korean J Food & Nutr* 22: 367-376.
- Ooi KL, Muhammad TS, Tan ML, Sulaiman SF. 2011.

- Cytotoxic, apoptotic and anti- α -glucosidase activities of 3,4-di-*O*-caffeoyl quinic acid, an antioxidant isolated from the polyphenolic-rich extract of *Elephantopus mollis* Kunth. *J Ethnopharmacol* 135: 685-695.
32. Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR. 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *Afr J Biotechnol* 7: 3188-3192.
33. Wong JY, Chye FY. 2009. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *J Food Compos Anal* 22: 269-277.
34. Peter MAT, David AB. 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Bio Tec* 48: 1-4
35. Komori K, Yatagai K, Tatsuma T. 2004. Activity regulation of tyrosinase by using photoisomerizable inhibitors. *J Biotechnol* 108: 11-16.
36. Seo SY. 2001. Screening of tyrosinase inhibitors from oriental herbs. *Korean J Plant Res* 14: 32-37.

(2013년 1월 29일 접수; 2013년 2월 22일 채택)