

무청의 향균, 항산화 및 항혈전 활성

이예슬, 권경진, 김미선, 손호용*
안동대학교 식품영양학과

Received : February 19, 2013 / Revised : April 4, 2013 / Accepted : April 5, 2013

Antimicrobial, Antioxidant and Anticoagulation Activities of Korean Radish (*Raphanus sativus* L.) Leaves. Lee, Ye-Seul, Kyung-Jin Kwon, Mi-Sun Kim, and Ho-Yong Sohn*. Dept. of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

Radish (*Raphanus sativus*) is a common cruciferous vegetable, and its aerial parts, called *Mu-chung* in Korean, have plentiful nutritional components such as vitamins, minerals and dietary fibers. *Mu-chung* has been used as a *kimchi*, a traditional Korean fermented dish, and dried *Mu-chung* is an important component of soups commonly consumed during winter in Korea. Since the advent of the mass production of radish in Korea, with the segregation of farm areas and towns and changing diets, *Mu-chung* has mostly been discarded instead of utilized. In addition, studies concerning the efficient utilization and useful bioactivities of *Mu-chung* are still lacking worldwide. In this study, we prepared the ethanol extract of *Mu-chung* and its subsequent solvent fractions. Antimicrobial, antioxidation, and anticoagulation activities were then evaluated in the hopes of developing a functional biomaterial from Korean radishes' aerial parts. The ethanol extraction yield for hot-air dried *Mu-chung* was 5.6%, and the fraction yields of n-hexane (H), ethylacetate (EA), butanol (B) and water residue were 25.3, 3.6, 19.4, and 51.7%, respectively. Analysis of total polyphenol and total flavonoid contents showed that the EA fraction had the highest content (97.57 and 152.91 mg/g) amongst the fractions. In antimicrobial activity assays, the H and EA fractions were effective against gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Bacillus subtilis*), but not effective against gram negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). The B fraction also exhibited moderate antibacterial activity, suggesting that the extract of *Mu-chung* has various antibacterial components. In antioxidation activity assays, the EA fraction showed strong DPPH, ABTS and nitrite scavenging activities (69-222 $\mu\text{g/ml}$ of IC_{50}), including reducing power. In anticoagulation activity assays, the EA fraction demonstrated strong inhibition activity against human thrombin and prothrombin. Prominent anticoagulation activity was found in aPTT assays; the aPTT of the EA fraction was extended 15-fold compared than that of the solvent control. Our results suggest that *Mu-chung* is an attractive nutritional food material possessing useful bioactivities, and the EA fraction of *Mu-chung* could be developed as a functional food ingredient.

Keywords: Antimicrobial, antioxidant, anticoagulation, radish leaves, *Raphanus sativus* L.

서 론

무(*Raphanus sativus* L.)는 쌍떡잎 식물, 양귀비목, 겨자과에 속하는 한해살이 또는 두해살이 초본으로, 품종에 따라 비대한 지하부 뿌리(무)와 지상부 엽채(무청)를 함께 식용으로 사용하기도 하고, 뿌리만 또는 무청만 식용하기도 한다. 한국에서는 지역에 따라 무우, 무수, 무시 등으로 불리기도 하며, 주로 3종류가 재배되고 있다. 중국을 통해 들어온 재

래종(조선무)은 김치, 깍두기, 무말랭이 등으로 주로 생산 소비되며, 중국에서 일본을 거쳐 들어온 일본무 계통은 주로 단무지로, 유럽을 통해 들어온 샐러드용 무는 주로 샐러드로 이용된다. 우리나라 대표 채소중의 하나인 무는 수분함량이 93%, 조단백 1%, 당질 3%를 함유하며, 다량의 비타민C와 미네랄을 포함하는 것[12, 14]으로 알려져 있어 겨울철 비타민 공급원으로 주요한 역할을 해왔다. 또한 무씨는 내복자, 나복자 등으로 불리며, 한방에서는 약용으로 사용하기도 한다. 한편 무청은 건조하여 국이나 나물로 조리하여 이용하였으며, 실제 과거 채소가 귀했던 겨울철에 단백질, 비타민, 미네랄, 식이섬유 등을 공급해온 주요 식품이었다[14]. 그러나, 최근 도시와 농촌의 격리, 산업화의 정착, 식생활 습관의 변화 등

*Corresponding author

Tel: +82-54-820-5491, Fax: +82-54-820-7804

E-mail: hysohn@andong.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

으로 인해 무가 대량생산되는 시기에 무청은 제대로 이용되지 못하고 폐기되고 있는 실정이다. 그러나 무청을 말린 우거지의 경우 35% 이상이 식이섬유이고 20%의 높은 단백질 함량과 미네랄을 가지고 있음[16]이 알려지면서 점차 무청의 효율적인 이용에 관심이 증가되고 있다.

무에 대한 연구로는, 무 재배, 저장, 가공 등에 대한 연구가 주로 이루어져 왔으며, 생리활성으로는 무 추출물의 항산화 활성[3], 항세균 활성[6], 인간 암세포에 대한 성장억제 활성[4, 24], 무 식이섬유에 의한 배변촉진 활성[18], 및 항염증 활성 [19] 등이 알려져 있다. 한편 무청에 대한 연구로는 조리방법에 따른 미네랄 함량 변화[9], 열풍건조에 따른 품질 특성 변화[16], 무청의 건조방법에 따른 미생물 변화[15] 등이 알려져 있으며, 생리활성에 대한 보고로는 무청의 항고혈압 활성[7, 12], 유방암 세포 성장억제활성[13], 폐암세포 생육억제효과[24], 항산화 활성[5, 14, 17], 콜레스테롤 축적 억제효과[17], 장 기능 개선 및 혈중 지질 개선 효과[10], 및 위장 자극 저하 및 자궁수축 활성[8] 등이 있다. 그러나, 재래종 조선무의 무청에 대한 항균 활성 및 항혈전 활성에 대한 보고는 없으며 활성 분획물 및 활성물질에 대한 연구는 아직 미미한 상태이다[4, 7]. 따라서, 본 연구에서는 무청을 이용한 새로운 건강식품소재 개발을 목표로, 국내에서 가장 많이 생산되면서도 효율적으로 이용되지 못하고 있는 재래종 조선무의 무청을 대상으로 ethanol 추출물 및 이의 순차적 유기용매 분획물을 조제하여, 이들의 유용생리활성들을 검토하였으며, 그 결과 무청 ethanol 추출물, 특히 ethylacetate 분획물에서 매우 강력한 항균, 항산화, 및 항혈전 활성을 확인하였다. 본 연구결과는, 대부분 폐기되고 있는 무청이 영양적인 면에서만뿐만 아니라 유용 생리활성면에서도 매우 가치 있는 식품소재이며, 향후 건강식품 개발의 새로운 소재로 활용될 수 있음을 제시하고 있다.

재료 및 방법

무청 추출물의 제조 및 수율

2011년 경북 안동에서 생산된 조선무의 무청을 구입하여 이를 50°C 건조기에서 2일간 건조한 후, 추출에 적합하도록 분쇄하여 95% ethanol (Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd., Korea)을 10배 가하여 상온에서 3회 추출하였다. 이후 추출액은 filter paper (Whatman No. 2)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)하였다. 무청 추출물의 유기용매 분획물 제조를 위해서는, ethanol 추출물을 물에 현탁한 후 n-hexane, ethylacetate 및 butanol을 이용하여 순차적으로 분획하고 물 잔류물을 회수하였으며[21], 각각의 분획물들은 감압 건조하여 분말화 하였다. 각각의 시료 분말은 DMSO에 녹인 후, 적

당한 농도로 희석하여 항균, 항산화 및 항혈전 활성 평가에 사용하였다. 기타 사용한 시약은 시약급 이상으로 Sigma Co. (USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 무청 건조물은 안동대학교 식품영양학과에서 보관하고 있다 (voucher specimen 2011-RS1).

무청 추출물의 항균 활성

조제된 무청의 ethanol 추출물 및 이의 분획물의 항균 활성을 평가하기 위해 그람 음성균으로 *Escherichia coli* KCTC 1682, *Proteus vulgaris* KCTC 2433, *Salmonella typhimurium* KCTC 1926, *Pseudomonas aeruginosa* KACC 10186를, 그람 양성균으로는 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, *Listeria monocytogenes* KACC 10550, *Bacillus subtilis* KCTC 1924를 사용하였다. 한편 항진균 활성 평가를 위해서는 *Saccharomyces cerevisiae* IF0 0233 및 캔디다증 진균감염증 원인균 *Candida albicans* KCTC 1940를 사용하였다. 먼저, 항세균 활성 평가의 경우, Nutrient broth (Difco Co., USA)에 각각의 세균을 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, 각 균주를 O.D.₆₀₀ 0.1로 조정하여 Nutrient agar (Difco Co., USA) 배지를 포함하는 멸균 petri dish (90×15 mm, Green Cross Co., Ltd., Korea)에 100 µl 도말하고, 각각의 시료 5 µl를 멸균 disc-paper (지름 6.5 mm, Whatman No.2)에 가하여, 37°C에서 24시간 동안 배양하였으며, 진균 경우에는 Sabouraud dextrose (Difco Co., USA)를 이용하여 동일한 방법으로 30°C에서 24시간 동안 배양 후, 생육저지환의 크기를 측정하여 항균활성을 평가하였다[21, 22]. 대조구로는 항세균제인 ampicillin과 항진균제인 miconazole (Sigma Co., USA)을 각각 1 µg/disc 농도로 사용하였으며, 생육저지환의 크기는 육안으로 생육이 나타나지 않는 부분의 지름을 mm 단위로 측정하였고, 3회 이상 평가 후 대표 결과로 나타내었다.

무청 추출물의 항산화 활성

무청 추출물 및 이의 분획물의 항산화 활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 음이온 소거능, ABTS [2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] 양이온 소거능, nitrite 소거능 및 환원력 측정으로 평가하였다[2, 11, 21]. 먼저 DPPH 음이온 소거능 측정의 경우, 다양한 농도로 희석한 시료 20 µl에 99.5% ethanol에 용해시킨 2×10^{-4} M DPPH 용액 380 µl를 넣고 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 516 nm에서 microplate reader (Asys Hitech, Expert96, Asys Co., Austria)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. DPPH 음이온 소거능은 시료 첨가구와 비첨가구의 백분율로 표시하였다[2]. ABTS 양이온 소거능 측정의 경우, 7 mM ABTS (Sigma Co., USA) 5 ml와 140 mM potassium

persulfate 88 ml를 섞은 후 상온에서 16시간 빛을 차단하여 ABTS 양이온을 형성시켰으며, 이후 이 용액을 414 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 ethanol로 희석하였다. 조제된 희석용액 190 µl와 시료 10 µl를 혼합한 후 상온에서 6분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 식에 의해 ASA를 결정하였다[21].

$$\text{ASA} (\%) = [(C - S)/C] \times 100$$

C: DMSO 첨가시 흡광도

S: 시료 첨가시 흡광도

한편 nitrite 소거능 측정의 경우, 아질산염 용액(1 mM)에 시료용액을 가하고 여기에 0.1 N HCl을 가해 pH 1.2로 조정 한 후, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 Griess reagent (Sigma Co., USA)를 가하고 혼합하였다. 이후 15분간 실온에서 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 nitrite 양을 측정하였다. NSA (%)는 다음의 식에 의해 계산하였다 [21].

$$\text{NSA} (\%) = [1 - (A - C)/B] \times 100$$

A: 1 mM nitrite 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

B: 1 mM nitrite 용액의 흡광도

C: 무청 시료의 흡광도

환원력 평가의 경우 Oyaizu 등의 방법을 변형하여 측정하였다[11]. ethanol에 용해한 시료 2.5 ml에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 2.5 ml와 10% potassium ferricyanide 2.5 ml를 첨가하고 50°C에서 20분간 반응시킨 후, 10% trichloroacetic acid 2.5 ml를 첨가하여 반응을 종료하고 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액은 증류수로 2배 희석한 후, 신선하게 조제된 0.1% ferric chloride 용액과 5:1 (v/v) 비율로 혼합하고 700 nm에서 흡광도를 측정하여 평가하였다. 상기의 항산화 실험에서 대조구로는 vitamin C (Sigma Co., USA)를 사용하였으며, 용매 대조구로는 DMSO를 사용하였다. 각각의 활성 평가는 각각 3회 이상 반복한 실험의 평균과 편차로 표시하였으며, 소거능 평가에서 50%의 소거능이 나타나는 시료 농도를 IC₅₀로 나타내었다[21].

무청 추출물의 항혈전 활성

무청 추출물 및 이의 분획물 시료들을 DMSO (dimethylsulfoxide)에 녹인 후 적당한 농도로 희석하여 coagulation parameter인 Thrombin time (TT), Prothrombin time(PT) 및 activated partial thromboplastin time (aPTT)를 측정하였다[11, 21]. 사용된 인간혈장은 최근 1개월 동안 약물투

여를 받지 않은 지원자의 전혈로부터 조제하였으며, 채혈 후 4°C에서 5,000 g로 5분 동안 원심 분리하여 혈장을 분리하고 냉동보관 하였으며(신선동결혈장), 필요시 상온에서 해동하여 사용하였다. PT와 aPTT는 MD Pacific Hemostasis (MD Pacific, China)의 분석시약을 사용하여 측정하였다. 트롬빈 저해 활성은 기존의 보고한 Amelung coagulometer KC-1A (Japan)를 이용하여 혈액 응고시간을 측정하여 평가하였다[21]. 37°C에서 0.5 U 트롬빈(Sigma Co., USA) 50 µl와 20 mM CaCl₂ 50 µl, 다양한 농도의 시료 추출액 10 µl를 coagulometer의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100 µl를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였으며, 시료 대조군으로는 아스피린(Sigma Co., USA)을, 용매 대조군으로는 DMSO를 사용하였다. 트롬빈 저해 활성은 3회 이상 반복한 TT 실험의 평균과 편차로 나타내었다. PT 측정은 표준혈장(MD Pacific Co.) 70 µl와 다양한 농도의 시료액 10 µl를 Amelung coagulometer KC-1A (Japan)의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 130 µl의 PT reagent를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었다. aPTT 측정의 경우에는, 표준혈장 70 µl와 다양한 농도의 시료액 10 µl를 Amelung coagulometer KC-1A (Japan)의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 65 µl의 aPTT reagent를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 반응하였다. 이후 65 µl CaCl₂ (35 mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었다. aPTT 연장 활성은 3회 이상 반복한 aPTT 실험의 평균치를 용매 대조구인 DMSO의 aPTT 평균치의 비율로 나타내었다.

영양 및 성분분석

무청의 수분함량은 적외선 수분측정기(HG53 Halogen Moisture Analyzer, Mettler-Toledo International Inc., Zurich, Switzerland)로 측정하였으며, 조단백, 조지방, 및 회분 함량은 AOAC 방법[1]에 따라 분석하였다. 즉 조단백질은 Kjeldahl법, 조지방은 soxhlet 추출법, 회분은 550°C 직접 회화법으로 분석하였다. 총 flavonoid의 함량 측정은 기존의 보고한 방법[20, 23]에 따라 측정하였으며, 각각의 시료를 18시간 메탄올 교반 추출하고 여과한 추출검액 400 µl에 90% diethylene glycol 4 ml를 첨가하고 다시 1 N NaOH 40 µl를 넣고 37°C에서 1시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 rutin을 사용하였다. 총 polyphenol 함량은 추출검액 400 µl에 50 µl의 Folin-ciocalteu, 100 µl의 Na₂CO₃ 포화용액을 넣고 실온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다[20]. 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다. 총당 정량의 경우에는 phenol-sulfuric acid법을, 환원당 정량의 경우에는 DNS 변법을 이

용하였다[21]. 각각의 분석결과는 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

무청 추출물 및 순차적 유기용매 분획물의 제조 및 성분분석

조선무 지하부가 수분함량 94.3%, 조단백질, 조지방, 탄수화물 및 회분 함량이 각각 $0.8 \pm 0.2\%$, $0.1 \pm 0.01\%$, $4.4 \pm 0.1\%$, 및 $0.4 \pm 0.03\%$ 로 나타난 것에 비해, 조선무 무청의 경우 수분함량은 $90.5 \pm 1.3\%$ 이었으며, 조단백질, 조지방, 탄수화물 및 회분 함량은 각각 $2.3 \pm 0.3\%$, $0.2 \pm 0.05\%$, $4.5 \pm 0.2\%$ 및 $1.5 \pm 0.1\%$ 로 나타나, 무의 지하부에 비해 무청이 영양적으로 우수함을 확인하였다. 무청을 2일간 50°C 에서 열풍건조한 경우, 바삭거리며 쉽게 부수지는 상태였으며 수분함량은 $7.5 \pm 0.5\%$ 로 감소하였다. 열풍건조 무청의 ethanol 추출수율은 5.6%이었다. Ku 등[14]은 무청의 추출수율을 26-35%로 보고한 바 있으나, 추출용매로 물 또는 50% 물이 포함된 ethanol 및 methanol을 사용하였으므로, 이러한 차이는 사용용매의 차이, 사용무청 및 무청 건조방법의 차이 등에 기인하리라 판단된다. 무청 ethanol 추출물의 순차적 분획물의 수율 및 이들의 성분분석 결과는 Table 1에 나타내었다. n-hexane, ethylacetate 및 butanol 분획물의 수율은 각각 25.3%, 3.6% 및 19.4%이었으며, 물 잔류물은 51.7%를 차지하여 ethanol 추출물의 50% 이상이 수용성 물질임을 알 수 있었다. 한편 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 분석결과 ethanol 추출물에서 25 mg/g 및 29.5 mg/g으로 높은 함량을 보였으며, 이는 건강식품으로 알려진 참나물보다는 낮은 함량이나, 산약이나 체리보다 높은 함량을 나타내었다[2, 11]. 특히 무청의 분획물 중 ethylacetate 분획물의 경우 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 각각 97.5 mg/g 및 152.9 mg/g으로 매우 높음을 확인하였으며, butanol 및 n-hexane 분획물에서도 각각 20-45 mg/g 및 49-71 mg/g의 높은 함량을 나타내었다. 한편 총당의 경우 물 잔류물 > butanol 분획 > ethylacetate 분획 > n-hexane 분획순으로 나

타냈으며, 환원당의 경우도 유사한 패턴으로 나타났다. 이러한 결과는 무청이 영양적으로도 생리활성적으로도 우수한 식품소재임을 의미한다.

무청 추출물 및 분획물의 항균활성

무청 추출물 및 분획물의 항균 활성 평가 결과는 Table 2에 나타내었다. 먼저 항세균 활성대조구로 사용된 ampicillin ($1 \mu\text{g}/\text{disc}$)의 경우 8.0-34.5 mm의 생육억제환을 나타내어 강력한 항세균 활성을 확인하였으며, 항진균제인 miconazole ($1 \mu\text{g}/\text{disc}$)의 경우 *C. albicans*에 대해 20 mm의 생육억제환을 나타내었다. 무청 ethanol 추출물($500 \mu\text{g}/\text{disc}$)의 경우 그람 음성균 중에서는 *P. vulgaris*와 *S. typhimurium*에 대해서는 7.5-10.0 mm의 생육억제환을 나타내었으나, *E. coli*와 *P. aeruginosa*에 대해서는 항세균 활성이 나타나지 않았다. 그러나 그람 양성균에 대해서는 실험균주 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis*에 대해 모두 양호한 항균 활성을 나타내었다. Ethanol 추출물의 분획물 중 항세균 활성은 n-hexane, ethylacetate 및 butanol 분획물에서 확인되어 무청 추출물이 다양한 항세균 활성물질을 포함하고 있음을 알 수 있었다. 특히 ethylacetate 분획물의 경우 *S. typhimurium* 및 *L. monocytogenes*의 식중독 유발균에 대해 14.0-16.0 mm의 강력한 생육억제환을 나타내어(Table 2), 향후 이의 활성성분 규명 및 ethylacetate 분획물을 이용한 생물소재 개발연구가 필요하다고 판단된다. 한편 무청 추출물 및 이의 분획물에서 항진균 활성은 모두 나타나지 않았다.

무청 추출물 및 분획물의 항산화 활성

무청 추출물 및 이의 분획물을 대상으로 다양한 농도에서의 DPPH 음이온 소거능을 평가한 결과는 Fig. 1(A)에 나타내었다. 대조구로 사용된 vitamin C의 경우 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 $79.9 \pm 1.6\%$ DPPH 소거능을 나타내어 강력한 항산화능을 확인하였다. 무청 시료 중에서는 ethylacetate 분획물이 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 $76.6 \pm 0.5\%$ DPPH 소거능을 나타내어 가장 우수한 소거능을 나타내었으며, 그 다음으로 butanol

Table 1. The yields of ethanol extract and its organic solvent fractions of *Raphanus sativus* L. leaves and their component analysis.

Extract/Fractions	Yield (%)	Content (mg/g)			
		Total polyphenol	Total flavonoid	Total sugar	Reducing sugar
Ethanol extract.	5.6	25.00 ± 0.05^b	29.53 ± 3.01	114.77 ± 3.14	60.72 ± 12.91
n-Hexane fr. ^a	25.3	20.04 ± 0.72	71.29 ± 2.84	53.85 ± 1.72	37.89 ± 0.62
Ethylacetate fr.	3.6	97.57 ± 0.86	152.91 ± 12.21	96.98 ± 4.29	37.64 ± 2.39
Butanol fr.	19.4	45.32 ± 0.72	49.64 ± 0.33	118.21 ± 2.29	74.59 ± 0.88
Water residue.	51.7	12.12 ± 0.19	7.99 ± 0.00	155.32 ± 0.00	82.28 ± 3.27

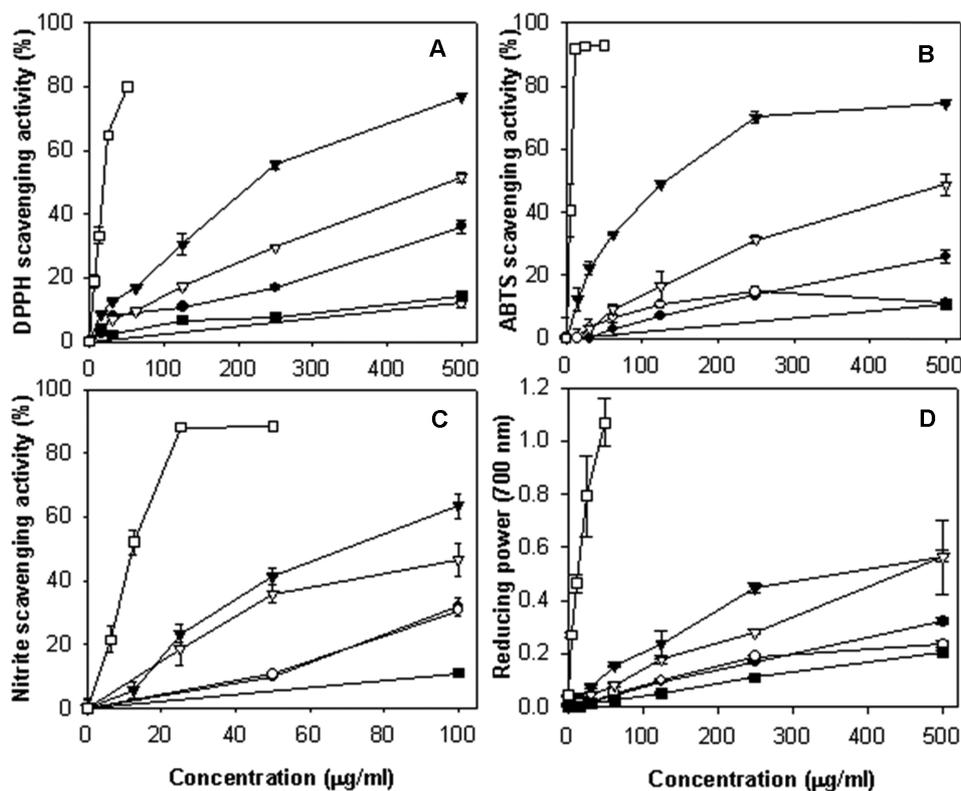
^afr.: fraction, ^bValues are mean \pm SD of triplicate determinations.

Table 2. Antimicrobial activity of ethanol extract and its organic solvent fractions of *Raphanus sativus* L. leaves against different pathogenic and food-spoilage bacteria and fungi.

Microorganism	Clear zone (mm)						
	^a Amp (1 µg/disc)	^b Mic (1 µg/disc)	<i>Raphanus sativus</i> L. leaves				
			^c E.ex.	^d H. fr.	^e EA. fr.	^f B. fr.	^g W. res.
Gram negative	^h EC	8.0	-	-	-	-	-
	PV	34.5	-	10.0	10.0	8.5	12.0
	ST	16.0	-	7.5	7.5	16.0	8.5
	PA	11.0	-	-	-	-	-
Gram positive	SA	25.0	-	9.5	7.5	-	-
	LM	28.0	-	-	15.5	14.0	9.0
	BS	25.5	-	8.5	7.5	7.5	7.5
Fungi	SC	-	20.0	-	-	-	-
	CA	-	20.5	-	-	-	-

^aAmp: ampicillin, ^bMic: miconazole, ^cE. ex.: ethanol extract of *R. sativus* L. leaves. ^dH. fr., ^eEA. fr., ^fB. fr. and ^gW. res.: hexane fraction, ethylacetate fraction, butanol fraction and water residue of the ethanol extract of *R. sativus* L. leaves, ^hEC: *Escherichia coli*, PV: *Proteus vulgaris*, ST: *Salmonella typhimurium*, PA: *Pseudomonas aeruginosa*, SA: *Staphylococcus aureus*, LM: *Listeria monocytogenes*, BS: *Bacillus subtilis*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, CA: *Candida albicans*, -: No inhibition.

The concentrations of ethanol extract and organic solvent fractions used were 500 µg/disc, respectively. The clear zone expressed was included a size of disc-paper (6.5 mm of diameter). The data represent a classical result of three independent determinations.

**Fig. 1. Radical scavenging activity and reducing power of the ethanol extract and its organic solvent fractions of *Raphanus sativus* L. leaves**

(A) DPPH scavenging activity, (B) ABTS scavenging activity, (C) nitrite scavenging activity, and (D) reducing power.

Symbols : ●: ethanol ex., ○: hexane fr., ▼: ethylacetate fr., ▽: butanol fr., ■: water residue and □: vitamin C.

분획은 동일농도에서 $51.5 \pm 1.5\%$ 소거능을 나타내었다. 그의 n-hexane 분획 및 물 잔류물은 11.9-14.1%의 미약한 DPPH 소거능을 나타내었다(Fig. 1A). 또한 ABTS 소거능의 경우, DPPH 소거능과 동일하게 ethylacetate 분획, butanol 분획 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 $74.7 \pm 0.6\%$ 및 $48.6 \pm 3.3\%$ 소거능을 나타내었다. 대조구로 사용된 vitamin C의 경우 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $91.8 \pm 0.2\%$ ABTS 소거능을 나타내었다(Fig. 1B). Nitrite 소거능의 경우, ethanol 추출물, n-hexane 분획, ethylacetate 분획, butanol 분획 및 물 잔류물이 각각 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 31.8 ± 2.8 , 30.7 ± 0.3 , $63.5 \pm 3.9\%$, $46.4 \pm 5.2\%$ 및 $11.1 \pm 0.3\%$ 소거능을 나타내어, 무청이 다양한 지용성 및 수용성 성분의 nitrite 소거물질을 함유하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1C). 환원력의 경우에도 ethylacetate 분획 > butanol 분획 > n-hexane 분획 > 물 잔류물의 순으로 나타나, ethylacetate 분획이 다양한 항산화력 평가에서 가장 우수함을 알 수 있었다(Fig. 1D). 전체적인 활성 radical 소거능의 IC_{50} 는 Table 3에 나타내었으며, ethylacetate 분획물에서 DPPH 소거능, ABTS 소거능, nitrite 소거능의 IC_{50} 는 각각 222.12, 130.84 및 69.44 mg/ml를 나타내어 분

Table 3. The radical scavenging activities of the ethanol extract and its organic solvent fractions of *Raphanus sativus* L. leaves.

Chemical/samples	Radical scavenging activity: IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		
	DPPH	ABTS	Nitrite
Vitamin C	19.17	7.40	12.05
Ethanol extract.	>500	>500	>100
n-Hexane fr. ^a	>500	>500	>100
Ethylacetate fr.	222.12	130.84	69.44
Butanol fr.	482.97	>500	>100
Water residue.	>500	>500	>100

^afr.: fraction.

획물 중 가장 우수한 항산화능을 나타내었다.

무청 추출물 및 분획물의 항혈전 활성

항혈전 활성은 트롬빈 활성도에 의한 혈전 생성까지 소요되는 시간을 나타내는 TT, 외인제 응고인자의 결핍 및 이상을 검출하는 검사로 혈장에 조직 트롬보플라스틴과 칼슘을 첨가하여 피브리노이 생성될 때까지의 시간을 나타내는 PT(외인성 혈전생성), 혈장내 응고인자의 결핍이나 저해 정도에 따라 혈전 생성이 나타나는 시간을 의미하는 aPTT(내인성 혈전생성)로 평가하였다. 본 실험에서는 용매 대조구로 사용된 DMSO의 경우, 33.6초의 TT, 18.6초의 PT 및 40.5초의 aPTT를 나타내었다(Table 4). 현재 항혈전제로 사용되고 있는 아스피린(상품명: 프로텍트)의 경우 1.5 mg/ml 농도에서 66.5초의 TT, 33.8초의 PT 및 110.5초의 aPTT를 나타내어 우수한 항혈전 활성을 보였다. 한편 무청 추출물의 경우 5.0 mg/ml 농도에서, 무첨가구에 비해 1.7배의 연장된 TT, 1.28배 연장된 PT 및 1.38배 연장된 aPTT를 나타내어 항혈전 활성을 확인하였다. 분획물 중에서는 ethylacetate 분획물에서 무첨가구에 비해 2.43배 연장된 TT, 2.42배 연장된 PT를 나타내어 아스피린에 필적하는 우수한 항혈전 활성을 확인하였으며, 특히 내인성 혈전 생성을 나타내는 aPTT의 경우 무첨가구에 비해 15배 이상 연장된 응고시간을 나타내어, 무청 ethylacetate 분획물이 내인성 혈전 생성을 매우 강력하게 저해함을 알 수 있었다. 향후 활성물질 분리 및 이의 혈전생성 억제 기작에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 판단된다. 또한 무청의 항고혈압 활성이 무청의 ethylacetate 추출물에서 나타난다는 최근의 보고[7]를 고려하여, 무청 ethanol 추출물 중 ethylacetate 분획물의 항혈전, 항고혈압 기능성 식품소재로의 개발도 필요하다고 판단된다. 본 결과는, 버려지고 있는 무청이 영양적으로 우수할 뿐만 아니라, 항세균, 항산화 및 항혈전 활성을 가지고 있음을 제시하며, 무청을 이용한 새로운 식품소재 개발 가능성을 제시하고 있다.

Table 4. Anticoagulation activities of ethanol extract and its organic solvent fractions of *Raphanus sativus* L. leaves.

Chemicals/samples	Conc. (mg/ml)	Thrombin time (sec)	Prothrombin time (sec)	Activated partial thromboplastin time (sec)
DMSO	-	33.6 ± 0.6	18.6 ± 0.5	40.5 ± 1.1
Aspirin	1.5	66.5 ± 1.3	33.8 ± 2.7	110.5 ± 10.5
<i>Raphanus sativus</i> L. leaves				
Ethanol extract.	5.0	57.8 ± 7.0	23.8 ± 0.5	55.9 ± 4.0
n-Hexane fr. ^a	5.0	38.6 ± 1.0	21.7 ± 0.5	83.0 ± 8.9
Ethylacetate fr.	5.0	81.6 ± 12.2	45.0 ± 3.9	>600
Butanol fr.	5.0	42.3 ± 5.3	23.6 ± 0.3	52.6 ± 2.8
Water residue.	5.0	24.2 ± 2.6	16.6 ± 0.4	44.1 ± 3.2

Values are mean \pm SD of triplicate determinations. ^afr.: fraction.

요약

우리나라 대표 채소중의 하나인 무의 지상부는 과거 채소가 귀했던 겨울철 주요한 단백질, 비타민, 미네랄, 식이섬유 공급원으로 이용되어 왔으며, 무청김치 및 우거지 등으로 식용되어 왔다. 그러나, 최근의 도시와 농촌의 격리, 산업화의 정착, 식생활 습관의 변화 등으로 인해, 무청은 대부분 폐기되고 있는 실정이며, 무청의 효율적인 이용 및 유용생리활성에 대한 연구는 미미한 상태이다. 본 연구에서는 무청을 이용한 새로운 건강식품소재 개발 연구의 일환으로 조선무의 무청을 대상으로 ethanol 추출물 및 이의 순차적 유기용매 분획물들을 조제하여, 이들의 항균, 항산화 및 항혈전 활성들을 검토하였다. 그 결과 무청의 ethanol 추출물의 수율은 5.6%이었으며, 이들의 n-hexane, ethylacetate 및 butanol 분획 효율은 각각 25.3, 3.6, 19.4%로 나타났으며, 물 잔류물은 51.7%를 나타내었다. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 분석 결과 ethylacetate 분획에서 97.57 및 152.91 mg/g의 매우 높은 함량을 나타내었으며, ethylacetate 분획물은 매우 강력한 항균, 항산화, 및 항혈전 활성을 나타내었다. 먼저 항균 활성의 경우 무청 n-hexane 및 ethylacetate 분획물은 그람 양성균(*S. aureus*, *L. monocytogenes* 및 *B. subtilis*)에 대해 양호한 항균 활성을 나타내었으며, 그람 음성균에서는 *E. coli* 및 *P. aeruginosa*를 제외한 *P. vulgaris*와 *S. typhimurium*에 대해 생육억제 활성을 나타내었다. 즉, 물 잔류물을 제외한 모든 분획물에서 부분적인 항세균활성이 나타나, 무청 추출물이 다양한 항세균 활성물질을 포함함을 확인하였다. 항산화 활성 평가 결과, ethylacetate 분획물에서 우수한 DPPH 소거능, ABTS 소거능, nitrite 소거능 및 환원력을 확인하였다. 또한 항혈전 활성 평가에서도 ethylacetate 분획물에서 양호한 트롬빈 및 프로트롬빈 억제활성과 함께, 강력한 내인성 혈전 생성억제를 확인하였다. 본 연구결과는 무청이 영양적 측면 및 유용생리활성 측면에서 매우 우수한 식품소재임을 제시하고 있으며, 무청을 이용한 기능성 식품 개발 및 ethylacetate 분획을 이용한 유용 소재개발의 기본 자료로 활용될 것이다.

Acknowledgement

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2011-0002798).

References

1. A. O. A. C. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Associ-

- ation of official analytical chemists. Washington D.C.
2. Ahn, S. M., H. Y. Ryu, D. K. Kang, I. C. Jung, and H. Y. Sohn. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of the fruit of *Prunus avium* L. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 195-200.
 3. Beevi, S. S., L. N. Mangamoori, and B. B. Gowda. 2012. Polyphenolics profile and antioxidant properties of *Raphanus sativus* L. *Nat. Prod. Res.* **26**: 557-563.
 4. Beevi, S. S., L. N. Mangamoori, M. Subathra, and J. R. Edula. 2010. Hexane extract of *Raphanus sativus* L. roots inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human cancer cells by modulating genes related to apoptotic pathway. *Plant Food Hum. Nutr.* **65**: 200-209.
 5. Beevi, S. S., M. L. Narasu, and B. B. Gowda. 2010. Polyphenolics profile, antioxidant and radical scavenging activity of leaves and stem of *Raphanus sativus* L. *Plant Food Hum. Nutr.* **65**: 8-17.
 6. Beevi, S. S., L. N. Mangamoori, V. Dhand, and D. S. Ramakrishna. 2009. Isothiocyanate profile and selective antibacterial activity of root, stem, and leaf extracts derived from *Raphanus sativus* L. *Foodborne Pathog. Dis.* **6**: 129-136.
 7. Chung, D. H., S. H. Kim, N. Myung, K. J. Cho, and M. J. Chang. 2012. The antihypertensive effect of ethylacetate extract of radish leaves in spontaneously hypertensive rats. *Nutr. Res. Pract.* **6**: 308-314.
 8. Ghayur, M. N. and A. H. Gilani. 2005. Gastrointestinal stimulatory and uterotonic activities of dietary radish leaves extract are mediated through multiple pathways. *Phytother. Res.* **19**: 750-755.
 9. Han, J. S., J. S. Kim, M. S. Kim, and Y. H. Choi. 1999. Changes on mineral contents of vegetable by various cooking methods. *Korean J. Soc. Food Sci.* **15**: 382-387.
 10. Jang, H. S., J. M. Ahn, K. H. Ku, S. J. Rhee, S. K. Kang, and J. H. Choi. 2008. Effect of radish leaves powder on the gastrointestinal function and fecal triglyceride and sterol excretion in rats feed a hypercholesterolemic diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**: 1258-1263.
 11. Kim, J. I., H. S. Jang, J. S. Kim, and H. Y. Sohn. 2009. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of *Dioscorea batatas* Decne. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 133-139.
 12. Kim, B. R., J. H. Park, S. H. Kim, K. J. Cho, and M. J. Chang. 2010. Antihypertensive properties of dried radish leaves powder in spontaneously hypertensive rats. *Korean J. Nutr.* **43**: 561-569.
 13. Kim, W. K., J. H. Kim, D. H. Jeong, Y. H. Chun, S. H. Kim, K. J. Cho, and M. J. Chang. 2011. Radish (*Raphanus sativus* L. leaf) ethanol extract inhibits protein and mRNA expression of ErbB(2) and ErbB(3) in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutr. Res. Pract.* **5**: 288-293.
 14. Ku, K. H., K. A. Lee, and Y. E. Kim. 2008. Physiological activity of extracts from radish (*Raphanus sativus* L.) leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**: 390-395.
 15. Ku, K. H., K. A. Lee, Y. L. Kim, and M. G. Lee. 2006. Effects of

- pre-treatment method on the surface microbes of radish (*Raphanus sativus* L.) leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**: 649-654.
16. Ku, K. H., K. A. Lee, Y. L. Kim, and Y. W. Lee. 2006. Quality characteristics of hot-air dried radish (*Raphanus sativus* L.) leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 780-785.
17. Rhee, S. J., J. M. Ahn, K. H. Ku, and J. H. Choi. 2005. Effect of radish leaves powder on hepatic antioxidative system in rats fed high-cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 1157-1163.
18. Shimotoyodome, A., S. Meguro, T. Hase, I. Tokimitsu, and T. Sakata. 2001. Sulfated polysaccharides, but not cellulose, increase colonic mucus in rats with loperamide-induced constipation. *Digest. Dis. Sci.* **46**: 1482-1489.
19. Sim, J. G., J. H. Lee, T. Y. Shin, S. H. Jeong, M. H. Kim, H. H. Ku, and J. S. Park. 2010. Anti-inflammatory effects of vegetable soup in murine macrophage RAW 264.7 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 1097-1101.
20. Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**: 152-178.
21. Sohn, H. Y., H. Y. Ryu, Y. J. Jang, H. S. Jang, Y. M. Park, and S. Y. Kim. 2008. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of aerial part of *Saxifraga stolonifera*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 195-200.
22. Sohn, H. Y., K. H. Son, C. S. Kwon, G. S. Kwon, and S. S. Kang. 2004. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine* **11**: 666-672.
23. Valentina, U., J. Fabcic, and F. Stampar. 2007. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* **107**: 185-192.
24. Yim, H. B., G. Lee, and H. J. Chae. 2004. Cytotoxicity of ethanol extract of *Raphanus sativus* on human lung cancer cell lines. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**: 287-290.