

제스프리 그린 키위의 주요 영양성분 및 헥산 분획물의 신경세포 보호효과

진동은 · 김현주 · 정지희 · 조유나 · 권오준¹ · 최성길 · 허호진*

경상대학교 응용생명과학부, ¹경북지역사업평가단

Nutritional Components of Zespri Green Kiwi Fruit (*Actinidia deliciosa*) and Neuronal Cell Protective Effects of the *n*-hexane fraction

Dong Eun Jin, Hyeon Ju Kim, Ji Hee Jeong, Yu Na Jo, O-Jun Kwon¹, Sung-Gil Choi, and Ho Jin Heo*

Division of Applied Life Science, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University

¹Daegyong Institute for Regional Program Evaluation, Regional Industry Evaluation Agency for Gyeongbuk

Abstract The physiological characteristics of kiwi (*Actinidia deliciosa*) fruit were analyzed, which included its nutritional composition, *in vitro*-antioxidant activities, and neuronal cell protective effects. The most abundant components of mineral, amino acid, and fatty acid were found to be potassium (K), glutamic acid, and α -linolenic acid, respectively. The major free sugars were fructose, glucose, and sucrose. In addition, β -carotene and vitamin C contents were 1.35 μ g/100 mL and 29.21 mg/100 g, respectively. The 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical-scavenging activity of the *n*-hexane fraction obtained from the kiwi extract was 10.52% at a concentration of 1000 μ g/mL. The malondialdehyde (MDA) inhibition of the *n*-hexane fraction was found to increase in a dose-dependent manner. The intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation after hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment of PC12 cells was significantly reduced in the presence of the *n*-hexane fraction compared to PC12 cells treated with H₂O₂ only. Moreover, in the a MTT assay, the *n*-hexane fraction showed *in vitro*-protective effects against H₂O₂-induced neurotoxicity.

Keywords: Green kiwi fruit, *Actinidia deliciosa*, neuronal protection, PC12 cell, antioxidant

서 론

현대 사회의 눈부신 발달과 더불어 생체조직의 노화를 비롯한 퇴행성 신경질환이 사회적인 문제로까지 크게 대두되고 있다. 특히 이러한 질환의 주된 원인이 활성산소(reactive oxygen species: ROS)에 기인 한다는 것이 인정됨(1,2)에 따라 활성산소를 조절할 수 있는 천연 항산화제에 대한 연구와 개발이 활발히 진행되고 있다(3,4). Superoxide anion radical, singlet oxygen, 및 H₂O₂ 등과 같은 활성산소 유도체들은 산화력이 매우 강하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화적 스트레스를 유발하게 되며(5), 이러한 산화적 스트레스는 지질과산화물을 유도하고 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 암을 비롯한 다양한 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다(6). 퇴행성 신경질환의 대부분을 차지하는 노인성 치매(Alzheimer's disease; AD)는 기억과 인지에 손상을 주는 특징을 가지고 있으며, AD 환자의 뇌에서 free radical과 같은 산화적 스트레스로 인한 뇌신경세포들의 기능장애가 AD와 같은 퇴행성 신경질환의 원인으로 알려져 있다(7). 퇴행성 신경질환의 대표적인 치료방법으로는 항산화제 처리, 세포이식 및 외

과적 수술 등 다양한 치료 방법이 제시되고 있지만, 대부분의 치료법이 여러 가지 위험요소, 부작용 및 손상 기전의 복잡성 등으로 인하여 신경세포의 신경 보호에 적합한 치료제는 아직까지 개발되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 안전성이 입증된 다양한 식품과 천연자원으로부터 보다 안전하고 신경세포 보호 효과가 뛰어난 예방 효과를 나타낼 수 있는 천연 화합물들 연구가 절실히 요구되고 있다(8).

키위(*Actinidia deliciosa*)는 다래나무과(Acinidiaceae) 다래나무속(*Actinidia*) 고부가가치 식품자원으로 온대지역에서 자라는 자웅이주의 덩굴성 낙엽과수로서 원산지는 중국 양자강 유역으로 과수의 재배지역은 연 최저 기온이 15°C 이하로 내려가지 않는 지역이면 가능한 것으로 알려져 있다(9). 키위는 유기산에서 기인되는 향에 의한 취식 기호성이 뛰어나며 과육 중 단백질 가수분해 효소인 actinidain이 함유되어 있어 소화를 돕고, vitamin C와 칼륨 등이 풍부하여 영양학적으로도 우수한 식품으로 보고되고 있다(10). 특히 미네랄 함량이 사과, 포도 등과 비교하여 2-3배 정도 높으며, 키위의 식용부위에는 항산화 활성 등 다양한 생리활성효과를 유도하는 유용 성분이 존재하는 것으로 알려져 있다. 특히 chlorophyll, carotenoids 등의 색소 성분이 함유되어 있으며, quinic acid, malic acid, citric acid 등의 유기산이 다량 존재하고 있어 키위 특유의 풍미를 가진다(11). 현재까지 키위에 관한 주요 연구로서 단백질 가수분해 효소인 actinidain을 연육제로 이용하기 위한 분리·정제 및 특성구명에 관한 연구, 키위를 이용한 식품의 품질개선 효능 및 식품첨가물로서의 식품의 품질 향상에 관한 연구, 그 외 키위의 향기성분 분석, 변비개선 연구 등이 주로 이루어져 왔으며, 또한 키위의 항산화 작용 및 항암작용에 대

*Corresponding author: Ho Jin Heo, Division of Applied Life Science, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea
Tel: 82-55-772-1907
Fax: 82-55-772-1909
E-mail: hjher@gnu.ac.kr
Received December 24, 2013; revised February 19, 2014;
accepted February 25, 2014

한 연구 역시 시도되고 있다(12).

우리나라는 키위를 연중 소비하고 있어 수요가 매년 증가하고 있으며 키위가 생산되지 않는 시기에는 수입 할 수밖에 없고, 결국 이에다라 수입량이 매년 지속적으로 증가하고 있다. 따라서 본 연구에서는 세계적으로 많은 양이 생산되고 국내 소비자를 통해 대량 소비되고 있는 뉴질랜드산 'Zespri green kiwi fruit'에 대해 재배 및 수입 과정 등에서 발생할 수 있는 다양한 환경 변화 요인에 따른 주요 영양·화학적 특성을 재검토하고 더불어 *in vitro* 신경세포 보호효과를 밝혀 산업화 소재로서의 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 뉴질랜드산 Zespri green kiwi (*Actinide deliciosa*)는 경남 진주시 농산물 도매시장에서 2012년 7월에 구매하여 냉장보관(4°C)하여 사용하였다. Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic-acid) (ABTS), potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate (DCF-DA), H₂O₂, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetra-zolium bromide (MTT) assay kit은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였다. 신경세포배양을 위해 필요한 RPMI1640 medium과 fetal bovine serum은 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, penicillin, streptomycin, sodium bicarbonate와 HEPES 및 나머지 시약은 Sigma-Aldrich 제품을 구입하여 사용하였다.

추출물의 제조

80% 에탄올을 용매로 하여 환류냉각 방법으로 추출하여 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, distilled water를 활용하여 용매 계통 추출을 실시하여 실험을 진행하였다. 동결건조 시료 5g에 80% 에탄올 100 mL을 첨가하여 환류 냉각 하에 2시간 동안 추출하였으며, 이 추출액을 여과하여 감압 농축하였다. 그 후 이 추출물을 극성 차를 이용해 서로 성질이 다른 용매를 첨가하여 단계적으로 분획하였다. 키위 과육 에탄올 추출물에 헥산과 물을 1:1 비율로 분획깔때기에 넣고 헥산 층과 물 층을 분획하였고, 물 층을 다시 클로로포름과 1:1 비율로 분획깔때기에 넣고 클로로포름과 물 층을 분획하였다. 이 과정과 동일하게 에틸아세테이트를 추가하여 물 층과 분획을 실시한 후 농축하여 동결건조 시킨 후 -20°C 냉동고에 보관하면서 각 실험에 사용하였다.

무기성분 분석

무기성분 분석은 각 시료 0.1g에 분해용액 (HClO₄:H₂SO₄:H₂O₂=9:2:5) 25 mL를 가하여 열판(hot plate)에서 무색으로 변할 때까지 분해한 후 100 mL로 정용하여 여과(Whatman No. 2)한 후 inductively coupled plasma (Aton scan 25, Thermo Jarrell Ash Co., France)로 분석하였다. 분석조건 중 RF power는 1,300 W이며, analysis pump flow rate는 1.5 mL/min으로 하였고, gas flows는 plasma: 15, auxiliary: 0.2, nebulizer: 0.8 L/min으로 하여 분석하였다(13).

아미노산 분석

시료를 일정량 취하여 6 N HCl 용액을 가하고 진공 밀봉하여 heating block (110±1°C)에서 24시간 동안 가수분해 시킨 후 glass filter로 여과한 여액을 회전진공농축기(EYLYA, N-N series, Tokyo,

Japan)를 이용하여 HCl을 제거하고 증류수로 3회 세척한 다음 감압 농축하여 sodium citrate buffer (pH 2.2) 2 mL로 용해한 후 0.22 µm membrane filter로 여과한 여액을 아미노산 동분석기 (Biochrom 30, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다. 분석에 필요한 column은 ultrapac 11 cation exchange resin (11 µm±2 µm)를 사용하고, flow rate와 buffer는 각각 ninhydrin 25 mL/h와 pH 3.20-10.0으로 하며, column 온도와 reaction 온도는 각각 46°C와 88°C로 44분 동안 분석하였다(13).

지방산 분석

조지방 추출은 분쇄된 시료 2 g을 원통여지(Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Tokyo, Japan)에 넣고 ethyl ether를 가하여 Soxhlet 추출법으로 약 16시간 추출하여 조지방을 얻고 이에 0.5 N NaOH-MeOH을 각각 첨가한 후 80°C에서 10분간 methyl ester화 시킨 다음 *n*-heptane 4 mL를 첨가하여 4-5분간 방치하고, NaCl 포화용액 2 mL와 ether 20 mL을 첨가한 후 ether층을 감압·농축하여 GC (GC 5890, Hewlett-packard Co., Avondale, PA, USA)로 분석하였다. 분석조건은 column은 Supelco wax 10 (60 m×0.32 mm I.D.)를 사용하고, injector temp와 column oven temp는 각각 250°C와 260°C로 하며, detector temp와 carrier gas는 280°C와 N₂로 하고, split ratio는 30:1로 맞추어 수행하였다(13).

유리당 분석

유리당 분석은 각 시료를 마쇄한 후 Choi 등(14)의 방법으로 유리당 희분을 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 Sep-pak C₁₈로 색소 및 단백질 성분을 제거한 다음 HPLC (U3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)로 분석하였다. Column은 ZORBAX Carbohydrate (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하고, solvent와 flow rate는 80% acetonitrile과 1.0 mL/min, detector는 RI로 하였고, injection volume은 20 µL로 하였다.

Vitamin C 분석

시료 2g에 20 mL의 10% metaphosphoric acid를 가하여 10분간 현탁시킨 후 적당량의 5% metaphosphoric acid를 넣어 균질화한 다음 100 mL mass flask에 옮기고 소량의 5% metaphosphoric acid액으로 용기를 씻은 후 mass flask에 합하여 100 mL로 정용한 다음 0.22 µm syringe filter로 여과하여 HPLC (U3000, Dionex)로 분석하였다. Column은 Dionex C₁₈ (4.6×250 mm, 5 µm)를 사용하고, solvent와 flow rate는 각각 0.05 M KH₂PO₄:acetonitrile (60:40)과 1.0 mL/min으로 하였으며, UV과장과 injection volume은 254 nm와 20 µL로 하였다(11).

β-Carotene 분석

시료 0.5 g을 22 mL cap vial에 넣은 후 10 mL의 1 N KOH가 함유되어 있는 무수에탄올과 0.02 g의 BHT를 첨가한다. Cap vial을 heat block에 넣은 후 100°C에서 30분 동안 saponification시켰다. Saponification시킨 후 cap vial을 실온에서 식힌다. 식힌 시료를 250 mL 용량의 갈색 분액 여두로 옮겨 포화 식염용액 20 mL과 석유에테르 40 mL를 첨가하여 격렬하게 섞는다. 석유에테르 층만을 회수하여 40°C 이하에서 농축한 후 여과하여 HPLC (U3000, Dionex)로 분석하였다. Column은 Dionex C₁₈ (4.6×250 mm, 5 µm)를 사용하였고, 이동상은 0.22 mM BHT를 함유시킨 ethyl acetate:acetonitrile:acetic acid (30:68:2, v/v/v)를 사용하였다. 유속은 0.8 mL/min, 주입량은 20 µL, 검출기는 photo diode array 검출기 및 과장은 450 nm에서 분석 하였다(13).

Total phenolics

추출 시료 용액 1 mL에 3차 증류수 9 mL를 첨가한 후 Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1 mL를 넣고 혼합하여 실온에서 5 분간 반응시켰다. 반응용액에 7% Na₂CO₃ 용액 10 mL를 넣어 다시 혼합한 다음 3차 증류수로 25 mL로 정용하였다. 이 혼합용액을 23°C에서 2시간 동안 정치한 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 gallic acid를 이용하여 작성된 검량선으로 총 페놀화합물 함량을 계산하였다(15).

ABTS radical 소거활성

1.0 mM 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)HCl (AAPH)와 2.5 mM ABTS를 150 mM NaCl이 더해진 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)와 함께 혼합하여 68°C water bath에서 30분 동안 열을 가하고 실온에서 10분 동안 식힌다. ABTS 용액은 734 nm에서 흡광도 값이 0.65±0.02이 나오도록 buffer로 희석시켜 사용 하였다. 시료용액 20 µL에 흡광도 값을 맞춘 ABTS 용액 980 µL를 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시키고, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다(15).

지질 과산화 억제활성

뇌 조직을 이용한 지질 과산화 억제활성 측정은 Chang 등(16)의 방법을 변형하여 사용하였다. 4주령의 ICR-male mouse를 실험동물 공급업체(Samtako, Osan, Korea)로부터 구입하여 7일간의 환경 적응 기간을 유지했다. 모든 실험동물은 2마리씩 한 개의 사육케이스에 넣어 항온(22±2°C), 항습(50-55%)을 일정하게 유지하였고, 12시간 간격으로 낮과 밤을 교대시키는 동일한 환경에서 충분한 양의 식수와 사료를 공급하며 사육하였다(동물실험인가번호 GNU-120831-M0037). 상기 환경에서 4주간 사육한 ICR mouse brain을 적출하여 실험에 사용하였다. 뇌 부위 조직에 10 volume의 ice cold Tris-HCl buffer (20 mM, pH 7.4)에 균질화 시켜 원심분리 하였다. 상등액 0.1 mL에 10 µM FeSO₄ 0.1 mL, 0.1 mM ascorbic acid 0.1 mL 및 시료 0.2 mL를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양 하였다. 그 후 25% trichloroacetic acid 0.1 mL를 첨가하여 80°C에서 30분간 가열한 후 532 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

신경세포 배양

본 실험에서 사용한 PC12 세포(KCLB 21721, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)는 신경세포의 특성을 나타내는 세포로 쥐의 pheochromocytoma로부터 유도된 것을 사용하였다. PC12세포를 25 mM HEPES, 25 mM sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, 50 units/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin이 포함된 RPMI 1640 배지에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

신경세포 내 산화적 스트레스 생성률 측정

H₂O₂에 의해 유도된 PC12 세포내 산화적 스트레스 생성률을 측정하기 위하여 DCF-DA assay를 이용하여 측정하였다. 먼저 세포를 96 well plate에 2×10⁶ cells/well로 분주하고, 키위 핵산 분획물을 농도별로 처리한 후 37°C, 5% CO₂의 조건에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음, phosphate buffered saline (PBS) buffer로 세척한 다음 200 µM H₂O₂를 2시간 처리한다. 50 µM DCFH-DA를 넣어 50분간 배양하여 fluorescence microplate reader (Infinite 200, Tecan Co., San Jose, CA, USA)를 사용하여 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서

형광강도를 측정하였다(17).

신경세포 생존율 측정

H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에서 PC12 세포에 대한 보호효과를 MTT reduction assay로 측정하였다. 키위 핵산 분획물을 PC12 세포에 처리하여 48시간 동안 pre-incubation한 후, 200 µM H₂O₂를 3시간 동안 처리하였다. 이 상태의 PC12 세포에 MTT stock solution을 처리하여 37°C에서 3시간 incubation한 후, DMSO 100 µL를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 마지막으로 흡광도는 microplate reader (680, Bio-rad, Tokyo, Japan)에서 570 nm와 690 nm에서 측정하였다. Positive control은 200 µM vitamin C를 사용하였고, cell viability는 control에 대한 % concentration으로 나타냈다(15).

통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하여 평균±표준편차로 나타내었으며, 각 평균값에 대한 검증은 SAS version 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 Duncan's multiple range test로 검증 하였다.

결과 및 고찰

무기성분 함량

Zespri green kiwi fruit에 함유되어 있는 무기성분을 분석한 결과(Table 1) 총 8종이 분리되었으며, 그중 K이 129.36 mg/100 g으로 가장 많이 함유되어 있었고, 다음으로 P 70.30 mg/100 g, Ca 35.82 mg/100 g, Mg 26.19 mg/100 g순으로 높은 함유를 나타냈으며, Fe과 Na 함유량은 각각 Fe 1.23 mg/100 g, Na 0.57 mg/100 g으로 비교적 낮은 함유량을 나타내었다. 한국산 골드키위(*Actinidia chinensis* PI.)의 함유량과 비교하였을 때 K, P, Ca의 함유량은 Zespri green kiwi와 마찬가지로 가장 높게 나타난 반면 Na의 함유량은 국내산 골드키위와 비교할 때 상당히 낮은 함유량을 나타내었다(11). 또한 제스프리스 홈페이지를 통해 공개되고 있는 분석 결과는 K 312 mg/100 g, Ca 34 mg/100 g, P 34 mg/100 g, 그리고 Mg 17 mg/100 g으로 본 실험결과와는 다소 차이가 있는 것으로 나타났다(18).

아미노산 함량

총 아미노산을 분석한 결과는(Table 2)와 같이 총 17종이 분리, 동정되었으며, 총 아미노산의 함유량은 869.84 mg/100 g이었고, 필수 아미노산 함유량은 298.84 mg/100 g로 나타났다. 분리·동정된 17종의 총 아미노산 중 주요 아미노산으로는 glutamic acid

Table 1. Mineral contents in Zespri green kiwi (*Actinidia deliciosa*)
Unit: mg/100 g

Minerals	Contents	%
K	129.36±5.83	54.60
Ca	35.82±6.42	15.12
Mg	26.19±2.85	11.05
Na	0.57±0.11	0.24
Mn	0.12±0.02	0.05
Zn	0.29±0.04	0.12
Fe	1.23±1.01	0.51
P	70.30±4.74	29.67
Total	236.88±21.02	100.00

Table 2. Contents of amino acids in Zespri green kiwi (*Actinidia deliciosa*) Unit: mg/100 g

Amino acids	Contents	%
Aspartic acid	105.30±20.11	12.10
Threonine	44.38±6.10	5.10
Serine	41.10±9.27	4.72
Glutamic acid	165.83±46.00	19.06
Proline	44.99±12.42	5.17
Glycine	51.16±11.94	5.88
Alanine	46.82±12.50	5.38
Cystine	11.09±2.63	1.27
Valine	47.84±12.97	5.49
Methionine	13.38±7.92	1.53
Isoleucine	41.61±10.43	4.78
Leucine	59.96±17.90	6.89
Tyrosine	38.81±11.40	2.60
Phenylalanine	21.98±6.35	4.46
Histidine	52.86±12.63	2.25
Lysine	52.86±12.63	6.07
Arginine	0.09±22.32	6.90
Total E.A.A ¹⁾	298.84±82.35	
Total A.A ²⁾	869.84±228.57	100.00

¹⁾E.A.A: Essential amino acid²⁾A.A: Amino acid

165.83 mg/100 g, aspartic acid 105.30 mg/100 g, arginine 60.09 mg/100 g, leucine 59.96 mg/100 g 순으로 나타났다. Walton 등(19)은 *A. deliciosa* 품종 키위의 아미노산 조성 및 함유량을 측정할 결과 총 12종의 아미노산이 분리·동정되었으며, 특히 키위에 함유되어 있는 주요 아미노산으로는 glutamic acid, aspartic acid 및 arginine으로 본 실험의 결과와 유사한 결과를 보였다.

지방산 함량

지방산을 분석한 결과는(Table 3)과 같다. 가장 많이 함유되어 있는 포화지방산으로는 palmitic acid로서 7.36%를 차지하고 있었으며, 불포화지방산으로는 a-linolenic acid로서 59.04%를 차지하였다. 그밖에도 oleic acid, linoleic acid의 함유량은 각각 16.10%, 14.11%로 함유되어 있었다. 또한 포화지방산과 불포화지방산의 비율은 10.73%와 89.25%로 불포화지방산이 높은 비율을 보였다. Piombo 등(20)은 키위 씨의 불포화 지방산의 함량이 78.4% 함유되어 있으며 이와 비교해 볼 때 본 실험에서 나온 불포화 지방산의 함량의 대부분이 키위 씨로부터 나온 것으로 사료된다.

유리당

Zespri green kiwi에는 fructose, glucose 및 sucrose 3종류의 유리당이 함유되어 있으며, 그 함량은 각각 2.32 mg/100 g, 2.17 mg/100 g, 0.62 mg/100 g로 나타났다(Table 4). 한국산 골드키위(*A. chinensis* PI.)의 경우 fructose, glucose, sucrose 3종류의 유리당은 각각 1.86%, 2.17%, 1.04% 함유되어 있어(11) fructose의 함량은 green kiwi에서 조금 높은 것으로 나타났다. Matsumoto 등(21)은

Table 3. Fatty acids composition of Zespri green kiwi (*Actinidia deliciosa*) Unit: %

Fatty acids	Peak area (%)
Palmitic acid	7.36±0.28
Stearic acid	3.37±0.53
Oleic acid	16.10±0.27
Linoleic acid	14.11±0.01
α-Linolenic acid	59.04±0.52
Saturated fatty acid	10.73±0.81
Unsaturated fatty acid	89.25±0.80

Table 4. Contents of free sugar in Zespri green kiwi (*Actinidia deliciosa*) Unit: mg/100 g

Sucrose	Glucose	Fructose
2.32±0.12	2.17±0.09	0.62±0.02

숙성기간 동안 Hayward (*A. deliciosa*) 품종 키위의 유리당 함량 변화를 측정할 결과 주요 유리당인 fructose, glucose 및 sucrose였으며, 초기 함량은 각각 2.77, 2.67, 0.42%였으나 저장 5일째에는 4.88, 5.00, 1.19%로 유리당의 함량이 증가하여 숙성기간이 경과함에 따라 유리당의 함량이 증가하는 것으로 보고하였다.

Vitamin C, β-carotene 및 total phenolics

Vitamin C와 β-carotene에 함유량을 측정할 결과는(Table 5)과 같다. 비타민 C 함유량과 β-carotene의 함유량은 각각 29.21 mg/100 g, 1.35 µg/100 g으로 나타났다. Vitamin C의 함유량은 *A. chinensis* var. Jecy Gold의 vitamin C 함유량과 유사하게 나타났지만, 제스프리키위에서 분석한 vitamin C 결과 92.7 mg/100 g과 다소 차이가 있는 것으로 나타났다(18). Vitamin C는 숙성 과정을 거치면서 그 함유량이 조금씩 달라질 수 있다는 연구 결과가 보고되었다(11).

Phenolic compounds는 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조를 갖는데, 특히 이 중 phenolic hydroxyl기가 단백질 및 기타 거대분자들과 결합하는 성질이 강하여 항산화 등과 같은 생리활성 기능을 나타낸다(22). 추출방법 정립을 위하여 80% 에탄올을 이용하여 환류냉각 추출을 실시하여 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, distilled water로 분획물을 얻어 total phenolics를 분석한 결과 80% 에탄올 3.16 mg GAE/g, *n*-hexane 11.8 mg GAE/g, chloroform 2.5 mg GAE/g, ethyl acetate 7.0 mg GAE/g, distilled water 1.3 mg GAE/g으로 *n*-hexane 분획물에서 가장 높은 함량을 보였다. 이에 반해 국내산 골드키위(*A. chinensis* PI.)의 총페놀 함량은 0.047 mg/g인 것(11)에 반해 본 실험에서는 보다 높은 총페놀 화합물의 함량이 나타났다.

ABTS radical 소거활성 및 지질 과산화 억제 활성

ABTS 라디칼 소거활성은 ABTS 라디칼이 시료의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 점을 이용한 측정방법이다. 이 방법의 장점은 hydrogen-donating

Table 5. Contents of vitamin C, β-carotene and total phenolics in Zespri green kiwi (*Actinidia deliciosa*)

kiwi fruit	Vitamin C (mg/100 g)	β-Carotene (µg/100 g)	Total phenols (mg GAE/g)				
			80% EtOH	Chloroform	<i>n</i> -Hexane	Ethyl acetate	DW
	29.21±1.12	1.35±0.36	3.16±0.62	2.5±1.0	11.83±0.14	7.0±0.11	1.33±0.14

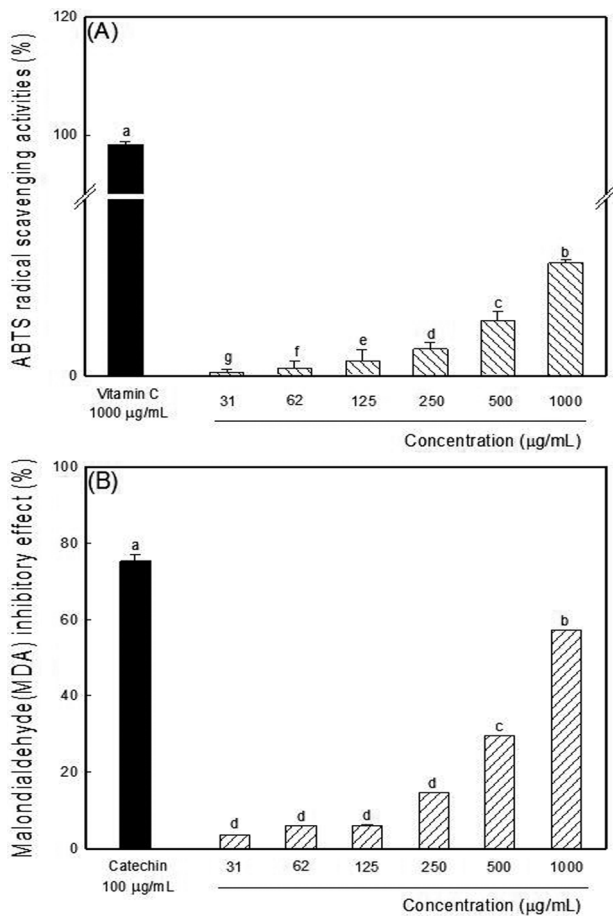


Fig. 1. Antioxidation activity of *n*-hexane extract from kiwi fruit. ABTS radical scavenging activity (A) and inhibitory effect of lipid peroxidation on mouse brain homogenates (B). Results are shown as mean±SD (*n*=3). Different superscript letters indicate significant difference among groups at *p*<0.05

antioxidants와 chain breaking antioxidants 모두를 측정할 수 있고, aqueous phase와 organic phase 모두에 적용이 가능하다는 점이다 (23). *n*-hexane 분획물을 이용하여 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정 한 결과는 Fig. 1A와 같다. 일반적으로 항산화력이 높아 positive control로 많이 사용되는 vitamin C보다는 활성이 낮지만 키위 *n*-hexane 분획물의 농도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거활성이 증가하는 경향을 나타내었다.

ROS와 같은 oxidative stress에 대한 *n*-hexane 분획물의 지질 과산화 억제활성을 분석하여 항산화효과를 확인하였다. 신경세포막을 구성하고 있는 지질성분은 산화적 스트레스에 취약한 특성을 가지고 있으며, 세포막 손상 및 기타 단백질 손상과도 관계가 있다고 알려져 있다(24). 따라서 본 연구에서는 *n*-hexane 분획물의 지질 과산화 억제활성을 살펴보았다. *n*-hexane 분획물의 농도가 증가함에 따라 malondialdehyde (MDA)저해활성이 증가하는 것으로 나타났고(Fig. 1B), positive control로 사용된 catechin 100 µg/mL보다는 저해 활성이 상대적으로 낮지만 *n*-hexane 분획물 1000 µg/mL의 농도에서는 약 60%의 MDA 저해활성을 보였다.

산화적 스트레스에 대한 뇌신경세포 보호효과

퇴행성 신경질환은 대부분 oxidative stress에 의한 뇌신경세포의 사멸에 의해 발생되며, natural antioxidants인 flavonoids를 포

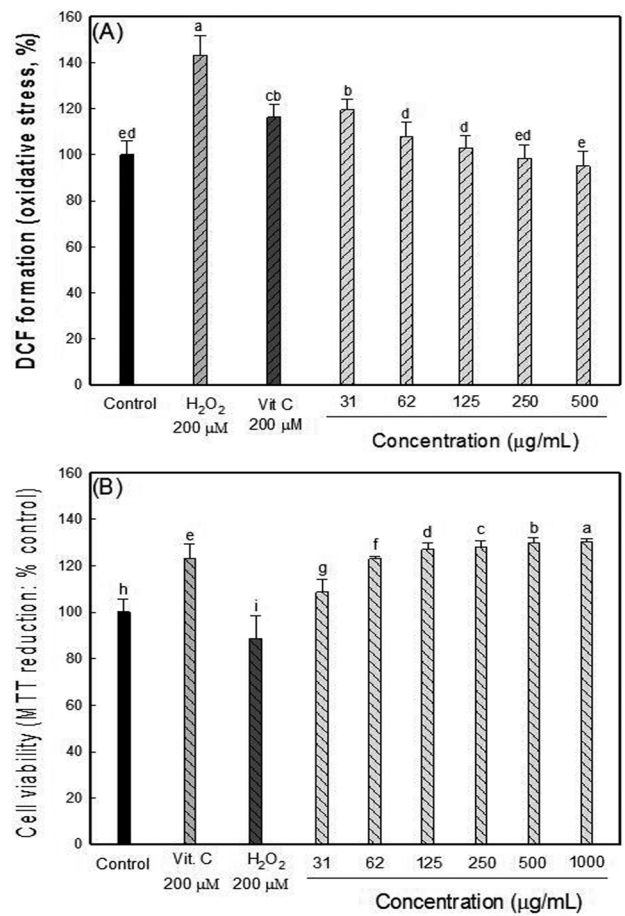


Fig. 2. Cytoprotective effects of the *n*-hexane extract from kiwi fruit. Impact on the oxidative stress (A) and the H₂O₂-induced cytotoxicity to the PC12 cell (B). PC12 cells were pretreated for 48 h with various concentrations. After 48 h cells were treated with 200 µM H₂O₂- for 2 h. Results are shown as mean±SD (*n*=3). Different superscript letters indicate significant difference among groups at *p*<0.05

함한 polyphenols 등은 oxidative stress로부터 신경세포 보호효과가 우수한 것으로 보고되고 있다(25). Oxidative stress로 인해 세포내 생성된 ROS는 비형광성을 나타내는 DCF-DA를 산화시켜 형광물질인 DCF로 전환시키는데 이렇게 전환된 형광물질의 양을 측정하여 세포내 형성된 ROS를 측정하는 방법이다. 먼저 앞선 *in vitro* 항산화 활성 측정을 통해 상대적으로 우수한 활성을 보여준 *n*-hexane 분획물을 전처리한 다음, H₂O₂로 세포의 산화적 손상을 유도하여 DCF 형광강도를 관찰한 결과 Fig. 2A와 같다. H₂O₂를 단독 처리한 군에서는 143%로 대조군 100% 대비하여 약 43%의 형광강도 증가를 보인 반면, *n*-hexane 분획물을 처리한 구에서는 농도 의존적으로 산화적 손상 보호효과를 보였다. 특히 농도 1000 µg/mL에서는 95%로 H₂O₂대비 약 48%정도의 ROS 감소율을 보여주어 뛰어난 신경세포 보호효과를 지니는 것으로 확인되었다. Hurst 등(26)에 의하면 phenolic compounds는 oxidative stress에 의한 세포 손상을 보호할 수 있다고 보고하였으며, 이에 따라 본 연구에서도 키위에 존재하는 phenolic compounds에 의해 oxidative stress가 감소하였을 것으로 판단된다. 이상의 결과를 종합해볼 때 키위의 *n*-hexane 분획물은 oxidative stress로 일어나는 신경세포의 사멸을 억제시킴을 알 수 있었다.

MTT reduction assay는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 노

란색의 수용성 기질을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan 으로 환원시키는 mitochondrial activity를 이용하는 측정방법이다 (27). *n*-hexane 분획물의 H₂O₂에 의해 유도된 oxidative stress 상태에서 PC12 신경세포에 대한 보호 효과를 측정 한 결과는 Fig. 2B와 같다. H₂O₂를 처리한 처리구에서는 control group 100% 대비 86%의 생존율을 나타냈고 H₂O₂와 vitamin C를 동시에 처리한 처리구에서는 117%로 약 31% 정도의 신경세포 보호효과를 보였다. *n*-hexane 분획물을 처리한 처리구에서는 62 µg/mL 이상의 농도에서 200 µM vitamin C와 유사한 보호효과를 보였으며, 특히 125 µg/mL 농도에서는 vitamin C보다 높은 신경세포 보호효과를 보였다.

요 약

Zespri green kiwi의 무기질은 K, P, Ca 순으로 많았으며, 아미노산은 glutamic acid, aspartic acid, arginine 순으로 많이 함유되어 있었다. 지방산 함량은 α-linolenic acid, oleic acid 순으로 많이 함유되어 있었으며, 유리당은 fructose 함량이 가장 높았다. Vitamin C와 β-carotene 함량은 각각 29.21 mg/100 g, 1.35 µg/100 g이었다. Total phenolics는 *n*-hexane 분획물이 11.83 mg GAE/g으로 가장 높았으며, ABTS radical 소거활성 및 지질 과산화 억제활성에서는 농도 의존적으로 *in vitro* 항산화 활성이 증가하는 경향을 보였다. 또한 oxidative stress에 대한 신경세포 보호효과 역시 농도 의존적 경향을 보여주었다. 본 연구 결과를 종합해볼 때, 생리활성 소재로서의 phenolics를 함유한 kiwi fruit (*A. deliciosa*)는 *in vitro* 항산화 활성과 함께 신경세포 보호효과를 기초로 한 고부가가치 건강기능식품 소재로서의 활용가치가 높다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단에 의해 지원된 연구(KRF-2011-0021664) 및 2013년 산림청 산림과학기술개발사업(2013-자유10)의 지원을 받아 수행된 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

References

1. Yoon MY, Kim JY, Hwang JH, Cha MR, Lee MR, Jo KJ, Park HR. Protective effect of methanolic extracts from *Dendrobium nobile* Lindl. on H₂O₂-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50: 63-67 (2007)
2. Sagara Y, Dargusch R, Chambers D, Davis J, Schubert D, Mater P. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radical Bio. Med.* 24: 1375-1389 (1988)
3. Lee YS. Antioxidative and physiological activity of extracts of *Angelica dahurica* leaves. *Korean J. Food Preserv.* 14: 78-86 (2007)
4. Kim DJ, Seong KS, Kim DW, Ko SR, Chang CC. Antioxidative effects of red ginseng saponins on paraquat-induced oxidative stress. *J. Ginseng Res.* 28: 5-10 (2004)
5. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221: 1256-1264 (1983)
6. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidant, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7915-7922 (1993)
7. Heo HJ, Choi SJ, Choi SG, Shin DH, Lee JM, Lee CY. Effects of banana, orange, and apple, on oxidative stress-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J. Food Sci.* 73: 28-32 (2008)
8. Yoon MY, Lee BB, Kim JY, Kim YS, Park EJ, Lee SC, Park HR. Antioxidant activity and neuroprotective effect of *Psoralea corylifolia* Linne extracts. *Kor. J. Pharmacoh.* 38: 84-89 (2007)
9. Lee SE, Kim DM, Kim KH, Rhee C. Several physico-chemical characteristics of kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch.) depend on cultivars and ripening stages. *J. Korean Food Sci. Technol.* 21: 863-868 (1989)
10. Morimoto K, Furuta E, Hashimoto H, Inouye K. Effects of high concentration of salts on the esterase activity and structure of a kiwifruit peptidase, actinidain. *J. Biochem (Tokyo).* 139: 1065-1071 (2006)
11. Jeong CH, Lee WJ, Bae SH, Choi SG. Chemical components and antioxidative activity of Korean gold kiwifruit. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 859-865 (2007)
12. Kim JH, Yang HK, Hong HJ, Kang WY, Kim DG, Kim SC, Song KJ, King D, Hna CH, Lee YJ. Neuroprotective effects of Korean kiwifruit against *t*-BHP-induced cell damage in PC12 cells. *Korean J. Plant Res.* 23: 165-171 (2010)
13. Jeong HR, JO YN, Jeong JH, Jin DE, Song BG, Jin YR, Kim MJ, Lee U, Heo HJ. Change in the chemical composition of chestnuts (*Castanea crenata*) from different periods. *J Korean Food Sci. Technol.* 44: 393-400 (2012)
14. Choi JH, Jang JG, Park Kil Dong, Park MH, Oh SK. High performance liquid chromatographic determination of free sugars in ginseng and its products. *J. Korean Food Sci. Technol.* 13: 107-113 (1981)
15. Kwak JH, Choi GN, Park JH, Kim JH, Jeong HR, Jeong CH, Heo HJ. Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. *J. Agric. Life Sci.* 44: 57-66 (2010)
16. Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS, Shyur LF. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J. Agr. Food Chem.* 49: 3420-3424 (2001)
17. Kim JK, Choi SJ, Cho HY, Hwang HJ, Kim YJ, Lim ST, Kim CJ, Kim HK, Peterson S, Shin DH. Protective effects of kempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone) against amyloid beta peptide (Aβ)-induced neurotoxicity in ICR mice. *Biosci. Biotech. Bioch.* 74: 397-401 (2010)
18. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. National Nutrient Database for Standard References Release 26. Statistics Report 09148 Available from: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2329>. Accessed June. 10, 2014.
19. Walton EF, Clark CJ, Bolding HL. Effect of hydrogen cyanamide on amino acid profiles in kiwifruit buds during budbreak. *Plant Physiol.* 97: 1256-1259 (1991)
20. Piombo G, Barouh N, Barea B, Boulanger R, Brat P, Pina M, Villeneuve P. Characterization of seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*). *Oleagineux Corps Gras Lipides* 195-199 (2006)
21. Matsumoto S, Obara T, Luh BS. Changes in chemical constituents of kiwifruit during post-harvest ripening. *J. Food Sci.* 48: 607-611 (1983)
22. Lee JH, Park KH, Lee MH, Kim HT, Seo WD, Kim JY, Baek IY, Jang DS, Ha TJ. Identification, characterisation, and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean perilla (*Perilla frutescens*) cultivars. *Food Chem.* 136: 843-852 (2013)
23. Re R, Pillegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
24. Uchida K, Stadtman ER. Covalent attachment of 4-hydroxynoneal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *J. Biol. Chem.* 268: 6388-6393 (1993)
25. Zhao B. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* 34: 630-638 (2009)
26. Hurst RD, Wells RW, Hurst SM, McGhie TK, Cooney JM, Jensen DJ. Blueberry fruit polyphenolics suppress oxidative stress-induced skeletal muscle cell damage *in vitro*. *Mol. Nutr. Food Res.* 54: 353-363 (2010)
27. Kim SS, Park RY, Jeon HJ, Kwon YS, Chun W. Neuroprotective effects of 3,5-dicaffeoylquinic acid on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Phytother. Res.* 19: 243-245 (2005)