

Research Report

국내 육성 참다래의 항산화능 및 PC-12 신경세포 보호 효과

이인일^{1,2}, 이봉한^{1,2}, 엄석현^{2,3}, 오창식³, 강 희⁴, 조운섭⁵, 김대옥^{1,2*}¹경희대학교 생명공학원²경희대학교 피부생명공학센터³경희대학교 원예생명공학과⁴경희대학교 동서의료학과⁵전라남도 농업기술원 과수연구소

Antioxidant Capacity and Protective Effects on Neuronal PC-12 Cells of Domestic Bred Kiwifruit

Inil Lee^{1,2}, Bong Han Lee^{1,2}, Seok Hyun Eom^{2,3}, Chang-Sik Oh³, Hee Kang⁴, Youn-Sup Cho⁵, and Dae-Ok Kim^{1,2*}¹Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 446-701, South Korea²Skin Biotechnology Center, Kyung Hee University, Suwon 443-766, South Korea³Department of Horticultural Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 446-701, South Korea⁴Department of East-West Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Yongin 446-701, South Korea⁵Fruit Research Institute, Jeollanam-do Agricultural Research and Extension Services, Wando 537-807, South Korea

Abstract: This study was conducted to comparatively evaluate antioxidant capacity (AC) of seven cultivars of kiwifruit (*Actinidia* spp.) and their protective effects on neuronal PC-12 cells. The contents of total phenolics (TP) and total flavonoids (TF) of kiwifruits were also examined. Five cultivars of kiwifruit, *Actinidia chinensis* (cv. Haehyang and cv. Haegeum), *A. eriantha* (cv. Bidan), *A. arguta* × *A. deliciosa* (cv. Mansoo), and *A. arguta* (cv. Chiak), were bred in Korea, while two cultivars, *A. deliciosa* (cv. Hayward) and *A. linguensis* (accession number 041AE), originated from New Zealand and China, respectively. Skin extracts of kiwifruit showed higher TP, TF, and AC than flesh extracts. The highest levels of TP and AC were found in cv. Bidan flesh extract among cultivars studied, but the TF content of cv. Bidan flesh extract was the lowest. The kiwifruit bred in Korea had higher AC than their counterparts. AC of kiwifruit had a highly positive linear correlation with TP and TF. The flesh extracts from cv. Hayward, cv. Haehyang, and cv. Haegeum significantly ($p < 0.05$) prevented PC-12 cells from oxidative stress induced using H₂O₂ compared to a control with H₂O₂ only. Overall, our results suggest that kiwifruit bred in Korea may offer a good source of antioxidants and serve as functional materials.

Additional key words: *Actinidia arguta*, *A. chinensis*, *A. deliciosa*, *A. eriantha*, *A. linguensis*, oxidative stress

서 언

일중항산소(¹O₂), 과산화수소(H₂O₂), 슈퍼옥사이드(O₂^{·-}), 하이드록실 라디칼(·OH) 같은 활성산소(ROS, reactive oxygen species)는 산소 대사과정 중 정상적 또는 비정상적으로 발

생한다(Apel and Hirt, 2004). 활성산소는 생체 내 항산화제 또는 항산화효소 등의 방어 기작에 의해 대부분 소거된다. 하지만 활성산소의 생성과 소거의 균형이 깨어질 경우에 유발된 산화적 스트레스(oxidative stress)는 단백질, DNA, 지질과 같은 생체 고분자 물질들의 산화적 변형을 초래한다.

*Corresponding author: dokim05@khu.ac.kr

※ Received 23 July 2014; Revised 2 December 2014; Accepted 3 December 2014. 본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ00932604)의 지원에 의해 이루어진 것임.

© 2015 Korean Society for Horticultural Science

장기적인 산화적 스트레스는 암, 심혈관질환, 퇴행성뇌질환 등 노화 관련 질병들의 원인이 되며, 이들 질병의 발생을 항산화제가 감소시킬 수 있다고 알려져 있다(Ames et al., 1993; Apel and Hirt, 2004). 과채류에는 비타민 A, C, E, 페놀성 화합물(phenolic phytochemicals) 등과 같은 항산화물질이 풍부하고, 과채류의 섭취가 심혈관질환, 암과 같은 만성질환의 위험을 줄인다(Liu et al., 2000; Arts and Hollman, 2005).

*Actinidia*속 식물인 참다래(kiwifruit)는 다래나무과(*Actinidiaceae*)에 속하며, 좋은 풍미를 갖는 과일로서 전세계적으로 섭취되고 있다(Harker et al., 2009; Latocha et al., 2010). *Actinidia*속에는 60여 종 이상이 존재하며, 뉴질랜드에서 경작되는 그린키위(green kiwi)인 헤이워드(*A. deliciosa* cv. Hayward)와 골드키위(gold kiwi)인 Hort16A(*A. chinensis* cv. Hort16A)가 상업적으로 가장 많이 재배되고 있는 품종이다(Fiorentino et al., 2009). 최근에는 헤이워드, Hort16A 품종 이외에도 서리에 대한 저항성을 가지며, 낮은 온도에서도 재배가 가능한 *A. arguta*, *A. eriantha*, *A. kolomikta* 품종들에 대한 관심이 증가하고 있으며, 많은 나라에서 재배가 이루어지고 있다(Latocha et al., 2010). 우리나라에서는 1977년 참다래가 처음으로 도입이 되었으며, 1981년 이후에 시중에서 참다래 판매가 이루어졌다(Jung et al., 2005). 국내의 독자적인 참다래 품종을 개발하려는 연구의 결과, 그린키위 품종인 해원, 골드키위 품종인 해향, 해금, 제시골드, 한라골드, 대홍 등 다양한 국내 품종들이 개발, 육성되었으며, 이들 품종의 국내 소비가 증가하고 있는 추세이다(Rural Development Administration, 2013).

페놀성 화합물은 식품의 맛, 향미, 영양적 가치에 영향을 미칠 뿐만 아니라, 다양한 생리활성 때문에 건강 증진에 기여한다고 알려져 있다(Drewnowski and Gomez-Carneros, 2000). 참다래에는 페놀성 화합물 뿐만 아니라, 비타민 C, 미네랄, 엽록소, 카로티노이드와 같은 건강에 유익한 다양한 생리활성물질이 함유되어 있다(Tavarini et al., 2008; Latocha et al., 2010). 참다래의 페놀성 화합물이 활성산소에서 야기되는 산화적 스트레스에 의한 신경세포 손상을 보호했다(Kim et al., 2010). 국내 육성 참다래 품종들이 뉴질랜드 기원 품종들보다 acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase 활성을 더 억제하였다(Lim et al., 2014). 또한, 참다래의 섭취는 암, 심혈관질환 등과 같은 퇴행성 질환의 예방에 도움이 될 수 있다(Motohashi et al., 2002). 참다래의 유전형(genotype), 품종(cultivar)에 따라 미네랄, 비타민, 페놀성 화

합물의 함량 및 조성이 다르다고 보고되었다(Samadi-Maybodi and Shariat, 2003; Nishiyama et al., 2004; Nishiyama et al., 2005; Du et al., 2009; Kim et al., 2009).

하지만 국내에서 육성된 새로운 참다래 품종들에 대한 연구는 여전히 미비한 실정이다. 본 연구의 목적은 국내에서 개발되어 재배되는 5가지 참다래 품종(해향, 해금, 비단, 만수, 치악)과 외래 2품종(뉴질랜드 헤이워드, 중국 041AE) 등 총 7가지 품종 참다래의 과육과 껍질의 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 항산화능을 정량적으로 비교 분석하고, 산화적 스트레스에 의한 PC-12 신경세포 보호 효과를 평가하였다. 본 연구는 국내 육성 참다래 품종에 함유된 생리활성 물질의 정량적 분석을 통해 기능성이 우수한 과일 및 식품 소재로서 가치를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

시험에 사용한 참다래 7가지 품종은 Table 1에 제시하였다. 7품종의 참다래는 헤이워드(cv. Hayward), 해향(cv. Haehyang), 해금(cv. Haegeum), 비단(cv. Bidan), 만수(cv. Mansoo), 치악(cv. Chiak), 041AE(accession number)로서 전라남도 광양(위도: 35.0114, 경도: 127.5862)에서 재배하였다. 참다래는 모두 2012년 10월 하순에 수확하였으며, 수확된 참다래는 실험 전까지 -20°C에서 보관하며, 실험 전 과육과 과피를 분리하여 사용하였다.

시약

본 연구에서는 Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride(AAPH),

Table 1. Origins of seven cultivars of kiwifruit (*Actinidia* spp.).

Samples	Species	Origins
Hayward	<i>A. deliciosa</i>	New Zealand
Haehyang	<i>A. chinensis</i>	Korea
Haegeum	<i>A. chinensis</i>	Korea
Bidan	<i>A. eriantha</i>	Korea
Mansoo	<i>A. arguta</i> × <i>A. deliciosa</i>	Korea
Chiak	<i>A. arguta</i>	Korea
041AE	<i>A. linguensis</i>	China

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), gallic acid, catechin, ascorbic acid, hydrogen peroxide, dimethyl sulfoxide(DMSO), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)를 Sigma Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배지, fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin은 Welgene(Daegu, Korea)에서 구입하였다.

페놀성 화합물 추출

참다래 페놀성 화합물의 추출을 위해 메탄올과 함께 미세 분쇄를 위해 균질화(homogenization)를 활용한 방법을 사용하였다(Kim and Lee, 2002). 참다래를 과피와 과육으로 분리하였다. 무수 메탄올(absolute methanol)에 100mL에 과피 10g 또는 과육 50g을 넣고 3분간 호모제나이저(homogenizer, Polytron RT-2100, Kinematica AG, Littau-Luzern, Switzerland)로 15,000rpm에서 균질화 후, Whatman No. 2 여과지(Whatman International Limited, Kent, England)를 이용하여 여과하였다. 여과 후 여과박(filter cake)을 회수하여 100mL의 80%(v/v) 메탄올을 이용하여 1회 더 반복 추출하였고, 여과된 추출물을 감압회전농축기(N-1000, Eyla, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하였다. 최종 추출물은 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다. 모든 시료에 대해서 독립적으로 3회 추출하였다.

총페놀 함량 측정

총페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 이용한 발색법(Singleton and Rossi, 1965)을 변형하여 이용하였다. 추출물 200μL에 증류수 2.6mL와 200μL의 Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 혼합 후 6분간 상온에서 반응시켰다. 혼합한 용액에 7%(w/v) Na₂CO₃ 용액 2mL를 첨가하였다. 총 90분 동안 반응시킨 후 750nm에서 흡광도를 측정하고, gallic acid를 이용하여 표준곡선(standard curve)의 검량선을 작성하였다. 총페놀 함량은 mg gallic acid equivalents(GAE)·100g⁻¹ fresh weight로 나타내었다.

총플라보노이드 함량 측정

총플라보노이드 함량의 측정은 AlCl₃ 용액을 이용한 발색법(Jia et al., 1999)을 이용하였다. 추출물 0.5mL에 증류수 3.2mL를 첨가한 후, 5%(w/v) NaNO₂ 용액 0.15mL을 더하여 5분간 반응시켰다. 10%(w/v) AlCl₃ 용액 0.15mL을 첨가

하여 다시 1분간 반응시킨 후 1M NaOH를 넣고 혼합하여 510nm에서 흡광도를 측정하였다. 총플라보노이드 함량은 mg catechin equivalents(CE)·100g⁻¹ fresh weight로 나타내었다.

항산화능 측정

ABTS 법

ABTS를 이용한 참다래의 항산화능 측정은 다음과 같다(Kim and Lee, 2004). 1.0mM AAPH에 2.5mM ABTS와 완충용액인 phosphate buffered saline(PBS) 100mL를 섞어서 70°C 항온수조에서 ABTS 용액을 만든 후, PBS 용액을 이용하여 734nm에서 0.650 ± 0.020의 흡광도로 ABTS 용액을 희석하였다. ABTS 용액 980μL와 시료 20μL를 10분간 반응 후 37°C에서 734nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 참다래의 항산화능은 mg vitamin C equivalents(VCE)·100g⁻¹ fresh weight로 나타내었다.

DPPH 법

DPPH를 활용한 라디칼 소거능에 기반한 항산화능은 Brand-Williams et al.(1995)의 방법을 변형하여 측정하였다. 80%(v/v) 메탄올을 사용하여 100μM의 DPPH 용액을 제조한 후에, 80%(v/v) 메탄올을 이용하여 517nm에서 0.650 ± 0.020의 흡광도로 희석하였다. 각 시료 50μL와 DPPH 용액 2.95mL를 첨가하여 23°C에서 30분간 반응시킨 후 흡광도 감소량을 517nm에서 측정하였다. 참다래의 항산화능은 mg VCE·100g⁻¹ fresh weight로 나타내었다.

ORAC 법

과산화 라디칼(peroxy radical)의 생성과 소멸에 의한 형광 감소율을 측정하는 Huang et al.(2002)의 방법을 사용하였다. 참다래 추출물 시료 및 비타민 C 표준용액의 제조에는 phosphate buffer(75mM K₂HPO₄, 75mM KH₂PO₄)를 사용하였다. 96 well에 시료 또는 표준용액 25μL와 81.6nM 형광 용액 150μL를 혼합하고 37°C에서 3분간 교반(shaking) 후, 10분간 배양(incubation)시켰다. 이 혼합용액에 153mM의 AAPH 25μL를 첨가한 뒤 형광광도계(microplate reader, Tecan infinite M200, San Jose, CA, USA)로 90분간 매분 측정하였다. 형광광도계는 excitation은 485nm, emission은 520nm로 설정하였다. 비타민 C의 곡선하면적(area under the curve) 표준곡선을 이용하여 참다래 항산화능은 mg VCE·100g⁻¹ fresh weight로 나타내었다.

세포 배양

본 실험에서 사용한 PC-12 신경세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양을 위하여 RPMI 1640 배지에 10% FBS, penicillin(100units·mL⁻¹), streptomycin(100µg·mL⁻¹)을 첨가하였으며, 37°C, 5% CO₂를 유지하는 이산화탄소 배양기(CO₂ incubator BB 15, Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Germany)에서 배양하였다.

신경세포 보호능 측정

참다래 페놀 추출물의 신경세포 보호 효과를 알아보기 위해 세포 생존율을 측정하는 MTT 법은 Heo et al.(2001)의 방법에 근거하여 실행하였다. PC-12 세포주는 RPMI 1640 배지에 희석하여 96-well plates에 2 × 10⁴ cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양하였다. 500mg·L⁻¹ 농도의 참다래 페놀 추출물을 전처리하여 24시간 동안 더 배양시켰다. 산화적 스트레스로 300µM H₂O₂를 첨가해 1시간 동안 반응시킨 후, 각 well에 MTT 용액을 첨가해 3시간 동안 반응시켰다. 50µL의 DMSO를 첨가하여 보라색의 포르마잔(formazan)을 용해시킨 후, 형광광도계(Tecan infinite M200)를 이용해 570nm와 630nm에서 측정하였다.

세포 내 산화적 스트레스 측정

세포 내 산화적 스트레스는 DCFH-DA를 이용한 형광분석법(Wolfe and Liu, 2007)으로 측정하였다. PC-12 세포주는 RPMI 1640 배지에 희석하여 96-well plates에 2 × 10⁴ cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양하였다. 500mg·L⁻¹ 농

도의 참다래 페놀 추출물로 전처리하고 24시간 동안 배양한 뒤, 각 well에 PBS 완충액에 녹인 50µM DCFH-DA를 넣어 30분 동안 반응시켰다. 산화적 스트레스로 300µM H₂O₂를 첨가하고 1시간 후에 형광광도계(Tecan infinite M200)를 이용하여 excitation은 485nm, emission은 530nm에서 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3반복한 결과를 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 통계학적 분석은 SAS 프로그램(version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하였다. 각 평균값의 유의적 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 95%의 신뢰구간에서 사후 검정하였다.

결과 및 고찰

총페놀 및 총플라보노이드 함량

국내 재배 참다래 7품종의 껍질과 과육의 총페놀 함량과 총플라보노이드 함량은 Table 2와 같다. 각 품종 100g 당 껍질의 총페놀 함량은 해향 > 해금 > 비단 > 치악 > 만수 > 041AE > 헤이워드 순으로 낮아졌고, 과육의 경우에는 비단 > 해금 > 해향 > 041AE > 치악 > 만수 > 헤이워드 순으로 감소하였다. 총페놀 함량은 껍질의 경우 241.2mg GAE(헤이워드)에서 1,028.6mg GAE(해향), 반면에 과육의 경우 56.3mg GAE(헤이워드)에서 437.3mg GAE(비단)로 큰 폭의 범위에 걸쳐 있었다. Du et al.(2009)의 연구에 의하면 헤이워드 품종의 총페놀 함량은 41.7mg GAE로 본 연구결과보다 낮은 함량을 보였다. 이러한 총페놀 함량의 차이는 토양,

Table 2. Contents of total phenolics and total flavonoids from seven cultivars of kiwifruit (*Actinidia* spp.).

Samples	Total phenolics (mg gallic acid eq·100 g ⁻¹ fresh weight)		Total flavonoids (mg catechin eq·100 g ⁻¹ fresh weight)	
	Skin	Flesh	Skin	Flesh
Hayward	241.2 ± 22.2 e ^z	56.3 ± 1.0 d	90.7 ± 6.0 d	3.7 ± 1.1 cd
Haehyang	1,028.6 ± 71.6 a	107.0 ± 2.4 bc	438.3 ± 32.4 a	6.8 ± 0.6 c
Haegeum	749.6 ± 80.5 b	119.4 ± 9.1 b	279.9 ± 35.7 b	11.1 ± 1.5 b
Bidan	575.6 ± 18.0 c	437.3 ± 25.5 a	32.1 ± 4.9 e	1.1 ± 0.1 d
Mansoo	381.3 ± 14.6 d	87.4 ± 5.2 c	130.9 ± 21.8 c	5.9 ± 0.1 c
Chiak	382.2 ± 23.5 d	97.6 ± 2.4 c	143.4 ± 15.1 c	5.9 ± 0.4 c
041AE	248.8 ± 52.3 e	100.1 ± 11.7 bc	110.6 ± 14.5 cd	15.2 ± 4.3 a

^zData are presented as mean ± standard deviation (n = 3). Different letters in the same column indicate significant difference based on Duncan's multiple range test (p < 0.05).

기후 등 재배환경, 추출법에 기인하는 것으로 여겨진다. 국내 육성 해향, 해금, 비단 품종들이 높은 총페놀 함량을 보인 반면에, 뉴질랜드 산인 헤이워드 품종의 경우 껍질과 과육 모두에서 가장 낮은 총페놀 함량을 보였다. 참다래 7품종 전부에서 과육보다는 껍질에서 더 높은 총페놀 함량을 보였다. 이 같은 결과는 참다래의 껍질 추출물이 과육 추출물보다 더 높은 총페놀 함량을 갖는다는 연구 결과와 유사하였다(Kim et al., 2009). 참다래 품종에 따라 총페놀 함량이 차이가 났으며, 이는 과채류의 종류 및 품종이 총페놀 함량에 영향을 미치기 때문으로 생각된다(Kähkönen et al., 1999; Scalzo et al., 2005).

참다래 품종의 총페놀 함량의 측정 결과와 비슷하게, 과육보다는 껍질에 더 많은 총플라보노이드 함량이 존재하는 것으로 확인되었다(Table 2). 각 참다래 품종 100g 당 껍질의 총플라보노이드 함량은 해향 > 해금 > 치악 = 만수 > 041AE > 헤이워드 > 비단 순으로 감소하였으며, 과육의 경우에는 041AE > 해금 > 해향 > 치악 = 만수 > 헤이워드 > 비단 순으로 낮아졌다. 각 품종 100g당 총플라보노이드 함량이 껍질의 경우 32.1mg CE(비단)에서 438.3mg CE(해향), 과육의 경우 1.1mg CE(비단)에서 15.2mg CE(041AE)를 가졌다. 해향과 해금의 껍질과 과육에서 높은 총페놀 함량을 가졌다는 결과와 마찬가지로, 이들 품종들이 높은 총플라보노이드 함량을 보였다. 하지만, 껍질과 과육에서 높은 총페놀 함량을 보였던 비단 품종은 총플라보노이드 함량이 가장 낮았다. 이는 비단 품종의 높은 총페놀 함량은 플라보노이드 이외의 페놀성 화합물 또는 높은 비타민 C 함량(Lim et al., 2014) 때문인 것으로 여겨진다.

항산화능

7품종 참다래의 껍질과 과육의 항산화능을 ABTS 법, DPPH 법, ORAC 법을 사용하여 측정한 결과는 Table 3과 같다. 총페놀 함량 및 총플라보노이드 함량의 결과와 유사하게 3가지 항산화능 평가법에서 과육보다는 껍질에서 항산화능이 더 높았다. ABTS 법으로 평가한 결과에서, 각 품종 100g 당 껍질의 경우 273.5mg VCE(041AE)에서 1,719.6mg VCE(해향), 과육의 경우 62.0mg VCE(헤이워드)에서 638.2mg VCE(비단)로 넓은 범위의 항산화능을 보였다. 껍질에서는 해향, 해금, 비단 품종이 다른 품종에 비하여 높은 항산화능을 보였다. 과육의 경우 비단 품종의 항산화능이 가장 낮은 항산화능을 보인 헤이워드 품종보다 약 10.2배 더 높았다. 본 연구에 사용된 여러 참다래 품종 간의 상이한 항산화능은 과채류의 품종에 따라 항산화능이 다르다는 결과와 유사하였다(Kähkönen et al., 1999; Scalzo et al., 2005).

DPPH 법을 이용하여 측정한 항산화능은 ABTS 법으로 측정한 결과와 유사한 경향성을 보였다(Table 3). 각 품종 100g 당 껍질의 경우 135.6mg VCE(헤이워드)에서 1,125.4mg VCE(해향), 과육의 경우 32.4mg VCE(치악)에서 524.3mg VCE(비단)로 비교적 넓은 범위의 항산화능을 보였다. ABTS 법으로 측정한 항산화능 결과와 비슷하게, DPPH 법에서도 해향, 해금, 비단 품종의 껍질에서 대체로 다른 품종들에 비해 더 높은 항산화능을 보였다. 과육의 경우에는 항산화능이 가장 높은 비단 품종이 가장 낮은 치악 품종에 비해서 약 16.2배 높은 수치를 가졌다.

각 품종의 참다래를 ORAC 법을 사용하여 측정한 항산화능 역시 ABTS 법과 DPPH 법을 사용하여 평가한 항산화능

Table 3. Antioxidant capacity of seven cultivars of kiwifruit (*Actinidia* spp.).

Samples	Antioxidant capacity (mg vitamin C eq·100 g ⁻¹ fresh weight)					
	ABTS		DPPH		ORAC	
	Skin	Flesh	Skin	Flesh	Skin	Flesh
Hayward	307.2 ± 6.0 e ^z	62.0 ± 1.1 d	135.6 ± 11.1 d	38.0 ± 0.5 d	1,839.8 ± 96.8 c	284.5 ± 21.9 d
Haehyang	1,719.6 ± 32.4 a	142.3 ± 0.6 b	1,125.4 ± 81.2 a	113.6 ± 5.5 b	7,050.8 ± 838.9 a	506.4 ± 52.8 c
Haegeum	985.5 ± 35.7 b	161.3 ± 1.5 b	547.1 ± 69.2 b	92.0 ± 2.0 c	4,220.8 ± 595.8 b	655.5 ± 80.3 b
Bidan	751.9 ± 4.9 c	638.2 ± 0.1 a	557.5 ± 18.3 b	524.3 ± 31.2 a	2,044.7 ± 281.8 c	1,088.0 ± 41.5 a
Mansoo	514.7 ± 21.8 d	86.8 ± 0.1 cd	300.6 ± 40.5 c	34.8 ± 5.1 d	2,514.2 ± 56.4 c	528.4 ± 33.2 c
Chiak	569.2 ± 15.1 d	100.6 ± 0.4 c	338.5 ± 30.3 c	32.4 ± 0.8 d	2,412.2 ± 67.3 c	597.6 ± 29.2 c
041AE	273.5 ± 14.5 e	90.6 ± 4.3 cd	173.8 ± 32.1 d	36.9 ± 5.2 d	1,988.6 ± 510.3 c	509.1 ± 85.0 c

^zData are presented as mean ± standard deviation (n = 3). Different letters in the same column indicate significant difference based on Duncan's multiple range tests (p < 0.05).

과 비슷한 경향을 보였다(Table 3). 각 품종 100g 당 ORAC 법으로 측정된 항산화능은 껍질에서 1,839.8mg VCE(헤이워드)에서 7,050.8mg VCE(해향)의 폭넓은 범위에 걸쳐있었으며, 과육에서도 역시 284.5mg VCE(헤이워드)에서 1,088.0mg VCE(비단)의 넓은 범위에 걸쳐 항산화능을 보였다. 껍질의 항산화능이 ORAC 법에서도 역시 과육보다 더 높았다. 과육에서 가장 높은 항산화능을 보인 비단 품종이 가장 낮은 값을 보인 헤이워드 품종보다 약 3.8배 높았으며, 껍질에서는 가장 높은 항산화능을 갖는 해향 품종이 가장 낮은 항산화능을 갖는 헤이워드 품종보다 약 3.8배 더 높았다.

총페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 항산화능과의 상관관계를 비교 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 7품종 참다래의 총페놀

함량과 항산화능의 상관계수(correlation coefficient, r^2)는 0.88 이상의 양의 기울기를 갖는 직선의 상관관계를 보였다(Fig. 1). 상이한 3가지 항산화능 평가법에서 ABTS 법으로 측정된 항산화능이 총페놀 함량과 상관계수(r^2)가 가장 높은 0.98이었다(Fig. 1A). 참다래 추출물의 총플라보노이드 함량과 항산화능 사이의 상관계수는 0.65에서 0.96의 값을 가졌으며, ORAC 법에서 가장 높은 상관계수를 보였다(Fig. 1B). 이러한 양의 기울기를 갖는 1차 선형의 높은 상관관계는 참다래에 존재하는 페놀성 화합물이 항산화능에 많이 기여했다는 것을 의미한다. 본 연구의 결과는 항산화능이 총페놀 함량 또는 총플라보노이드 함량과 양의 기울기를 갖는 1차적 직선의 상관관계를 보고한 이전의 연구 결과와 유사하였다(Zheng and Wang, 2001; Moyer et al., 2002; Proteggente et al., 2002).

신경세포 보호 효과

국내에서 재배한 7품종 참다래의 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 항산화능 모두 과육보다는 껍질이 높았다. 하지만 대부분의 참다래의 경우, 껍질 부분은 털이 많고 거칠며 질긴 식감 때문에 섭취하지 않으므로, 실질적인 섭취 부위인 과육 부분을 PC-12 신경세포 보호 효과의 평가에 사용하였다. 참다래 과육 추출물의 산화적 스트레스로부터 신경세포 보호 효과를 MTT 법으로 평가한 결과는 Fig. 2와 같다. 산화적 스트레스로 300 μ M의 H₂O₂를 1시간 동안 세포에 처리 시, H₂O₂를 처리하지 않은 대조군(100%)과 비교하여 세포가 74%까지 사멸하였다. 반면, 해금 과육 추출물을 500mg·L⁻¹의 농도로 전처리 시세포 생존률이 104%로 대조군 수준으로 증가하였고, 동일 농도에서 해향 과육 추출물은 95%, 헤이워드 과육 추출물은 91%로 세포생존률이 증가하였다(Fig. 2). 하지만 비단, 만수, 치약, 041AE의 과육 추출물은 유의적인 세포생존률 증가를 확인할 수 없었다. 비단 과육 추출물의 경우 높은 총페놀 함량과 항산화능을 보였음에도 불구하고 오히려 세포생존률을 감소시킨 결과를 보였다(Fig. 2). 국내 육성 참다래인 비단 품종은 타 품종에 비해 비타민 C 함량이 높다고 보고 되었다(Lim et al., 2014). 비타민 C는 항산화제의 역할을 하는 물질이지만, 특정한 환경 조건에서는 산화촉진제의 역할을 하기도 한다(Deutsch, 1998). U937 세포주를 이용한 *in vitro* 세포 실험에서 비타민 C 첨가 시 배지 내의 H₂O₂ 농도가 증가하여 세포 사멸을 유도했다(Sestili et al., 1996). 따라서 본 연구에 사용된 비단 품종의 과육 내 높은 비타민 C 함량으로 인하여 생성된

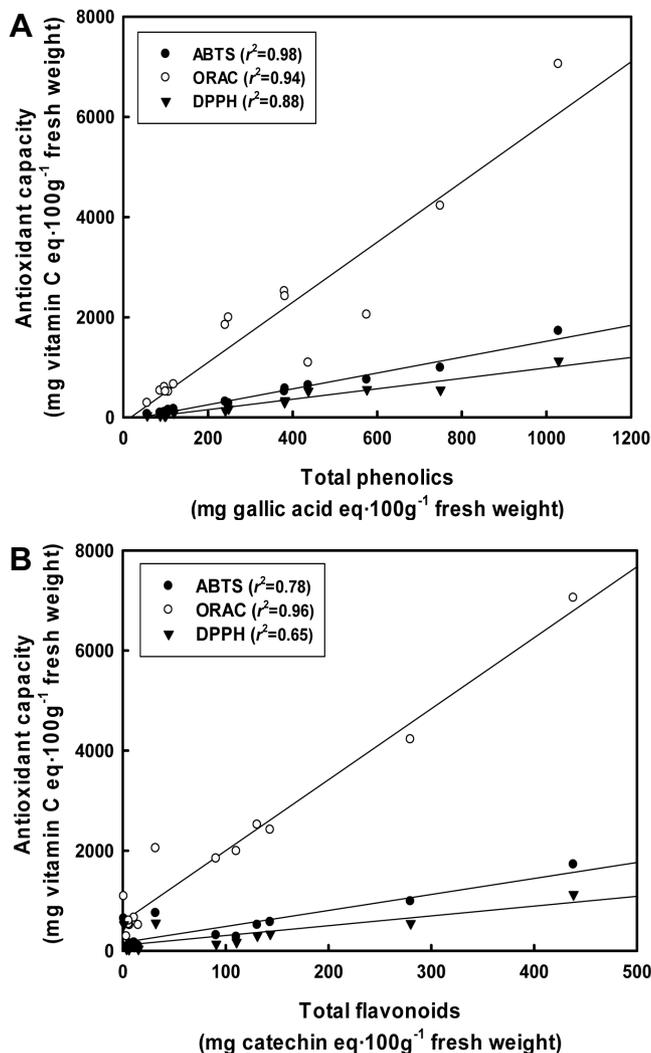


Fig. 1. Relationship between antioxidant capacity and total phenolics (A) and total flavonoids (B) of seven cultivars of kiwifruit (*Actinidia* spp.).

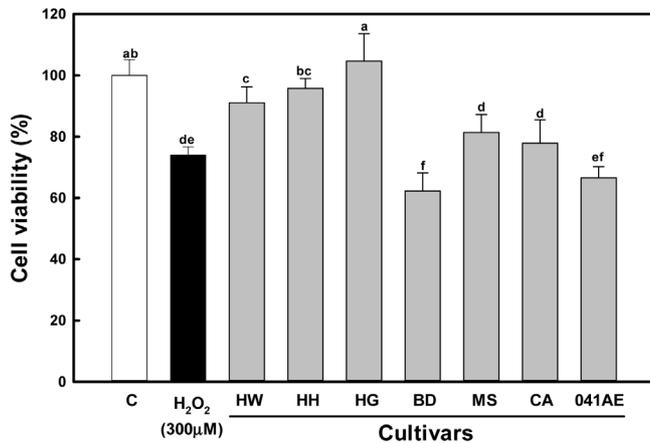


Fig. 2. Protective effects of the methanol extracts of seven cultivars of kiwifruit (*Actinidia* spp.) on the viability of neuronal PC-12 cells upon H₂O₂-induced oxidative stress, measured using the MTT assay. 'C' represents control group. Letters above bars indicate significant differences according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). Data are presented as the mean \pm standard deviation of three replicates. HW, HH, HG, BD, MS, CA, and 041AE stand for cv. Hayward, cv. Haehyang, cv. Haegeum, cv. Bidan, cv. Mansoo, cv. Chiak, and 041AE, respectively.

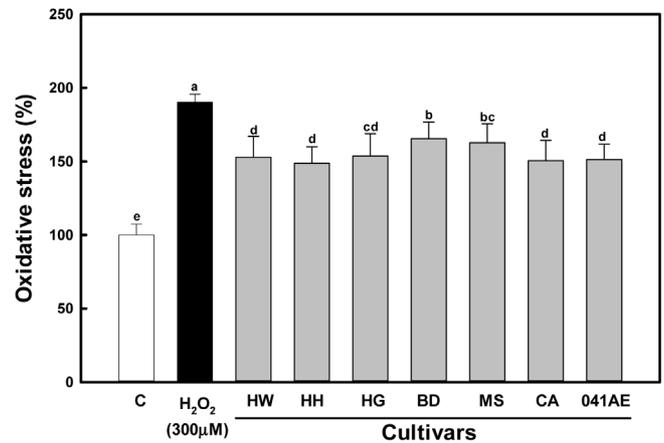


Fig. 3. Effects of the methanol extracts of seven cultivars of kiwifruit (*Actinidia* spp.) on intracellular oxidative stress in neuronal PC-12 cells measured using the DCFH-DA assay. Fluorescence was measured at 485 nm for excitation and 530 nm for emission. 'C' represents control group. Letters above bars indicate significant differences according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). Data are presented as the mean \pm standard deviation (bar) of three replicates. HW, HH, HG, BD, MS, CA, and 041AE stand for cv. Hayward, cv. Haehyang, cv. Haegeum, cv. Bidan, cv. Mansoo, cv. Chiak, and 041AE, respectively.

H₂O₂가 세포독성물질로 작용하여 신경세포 사멸이 유도되었을 것으로 추정한다.

세포 내 산화적 스트레스 완화

참다래 과육 추출물이 세포 내 산화적 스트레스에 미치는 영향을 평가하기 위해 DCFH-DA 법으로 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. DCFH-DA는 세포 내에서 에스테라아제(esterase)에 의해 2',7'-dichlorofluorescin(DCFH)로 가수분해 되고, 산화적 스트레스에 의해 형광을 띄게 된다(Keston and Brandt, 1965). H₂O₂를 처리하지 않은 대조군(100%)과 비교하여, H₂O₂를 처리시 PC-12 세포 내의 산화적 스트레스는 약 190%까지 증가하였다(Fig. 3). 그러나, 실험에 사용한 7품종 참다래 과육 추출물은 165%(비단)에서 148%(해향)까지 세포 내 산화적 스트레스를 유의적인 수준으로 감소시켰다(Fig. 3). 이 결과는 참다래가 세포 내에서 산화적 스트레스를 완화시켜 세포의 생존율을 높이는 데 기여했다는 것을 의미한다.

항산화제로 작용하는 페놀성 화합물을 함유하는 식물체와 그 추출물은 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다(Guan et al., 2006; Pavlica and Gebhardt, 2010). 하지만 식물체가 높은 항산화능을 가졌다고 하여, 세포 내 활성산소 소거능이 비례하여 높아지는 것만은 아니다. ORAC 법으로 측정된 브로콜리와 당근의 항산화능은 높았지

만, DCFH-DA 법을 이용하여 측정 시에 세포 내 산화적 스트레스에는 큰 효과가 없었고, 오히려 산화촉진제로서 역할을 하였다(Girard-Lalancette et al., 2009). DCFH-DA 법으로 측정된 세포 내 활성산소 소거능은 퀘서틴(quercetin) > 캄페롤(kaempferol) > 갈산(gallic acid) > 비타민 C > 카페산(caffeic acid) > 카테킨(catechin) > 에피카테킨(epicatechin) 순으로 감소하는 연구 결과처럼(Wolfe and Liu, 2007), 식물체에 존재하는 다양한 생리활성물질은 각기 다른 세포 내 산화적 스트레스 제거능을 갖는다는 것을 알 수 있다. 참다래에는 탄닌산(tannic acid), 클로로겐산(chlorogenic acid), 퀘서틴, 카테킨, 하이드록시벤조산(hydroxybenzoic acid), 디하이드록시벤조산(dihydroxybenzoic acid), 에피카테킨 등 다양한 페놀성 화합물뿐만 아니라, 엽록소(chlorophyll), 베타카로틴(β -carotene), 루테인(lutein) 같은 생리활성물질이 존재하며, 그 함량과 조성은 참다래의 유전형과 품종에 따라 다르다고 알려져 있다(Nishiyama et al., 2005; Latocha et al., 2010). 이는 각 참다래 품종에 내재하는 생리활성물질들의 조성 및 함량이 서로 다르기 때문에 세포 내 산화적 스트레스 소거능에 차이가 발생한 것으로 판단한다.

해금, 해향, 비단, 만수, 치악 같은 국내 육성 참다래 품종이 뉴질랜드 헤이워드 및 중국 041EA 참다래보다 총페놀

인용문헌

함량, 총플라보노이드 함량, 항산화능이 높은 것으로 확인되었다. 또한, 참다래가 세포 내 산화적 스트레스를 제거해 신경세포인 PC-12 세포주의 생존률을 증가시켰다. 이러한 결과는 국내 육성 참다래가 천연 항산화 식품 소재로서 활용이 가능하다는 것을 의미한다. 하지만 참다래 추출물의 항산화능과 세포보호효과를 좀 더 명확하게 밝히기 위해서는 참다래에 존재하는 개별 생리활성물질의 분리, 정량 분석 그리고 각 개별 물질의 항산화능과 세포보호효과에 대한 연구가 더 필요할 것으로 보인다. 이상의 연구 결과를 통하여 국내 육성 품종인 해금, 해향, 비단 등의 참다래가 항산화 물질의 공급원 및 기능성 식품 소재로서 잠재적 가능성을 갖는 것으로 확인하였다.

초 록

본 연구는 참다래의 항산화능을 측정하고, 참다래 과육 추출물의 PC-12 세포주에 대한 보호 효과를 비교 평가하였다. 또한, 참다래의 총페놀 함량 및 총플라보노이드 함량을 측정하였다. 국내에서 육성 재배 중인 참다래인 해향(*Actinidia chinensis* cv. Haehyang), 해금(*A. chinensis* cv. Haegeum), 비단(*A. eriantha* cv. Bidan), 만수(*A. arguta* × *A. deliciosa* cv. Mansoo), 치악(*A. arguta* cv. Chiak) 등 5품종과 뉴질랜드 유래 헤이워드(*A. deliciosa* cv. Hayward), 중국 유래 041AE(*A. linguensis* accession number 041AE) 포함 총 7품종을 시험에 사용하였다. 참다래의 껍질 추출물은 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 항산화능이 과육 추출물보다 더 높았다. 7품종 중에서 비단 품종 과육이 총페놀 함량과 항산화능이 가장 높았지만, 총플라보노이드 함량은 가장 낮았다. 참다래 추출물의 항산화능은 총페놀 함량과 총플라보노이드 함량과 양의 선형적 상관관계를 가졌다. 해향, 해금, 헤이워드 품종은 세포 내의 산화적 스트레스를 감소시켜 PC-12 세포를 유의적으로 보호하였다. 본 연구는 해금, 해향, 비단 등 국내 개발 육성 참다래가 외래 도입종에 비해 더 높은 항산화능을 갖는다는 결과를 보였다. 이는 국내 육성 참다래가 높은 생리활성물질을 제공하는 기능성 소재로 활용 가능하다는 것을 시사한다.

추가 주요어 : *Actinidia arguta*, *A. chinensis*, *A. deliciosa*, *A. eriantha*, *A. linguensis*, 산화적 스트레스

- Ames, B.N., M.K. Shigenaga and T.M. Hagen. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:7915-7922.
- Apel, K. and H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399.
- Arts, I.C. and P.C. Hollman. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:317S-325S.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28:25-30.
- Deutsch, J.C. 1998. Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* 255:1-7.
- Drewnowski, A. and C. Gomez-Carneros. 2000. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: A review. *Am. J. Clin. Nutr.* 72:1424-1435.
- Du, G., M. Li, F. Ma and D. Liang. 2009. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chem.* 113:557-562.
- Fiorentino, A., B. D'Abrosca, S. Pacifico, C. Mastellone, M. Scognamiglio and P. Monaco. 2009. Identification and assessment of antioxidant capacity of phytochemicals from kiwi fruits. *J. Agric. Food Chem.* 57:4148-4155.
- Girard-Lalancette, K., A. Pichette and J. Legault. 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chem.* 115:720-726.
- Guan, S., Y.-M. Bao, B. Jiang and L.-J. An. 2006. Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death. *Eur. J. Pharmacol.* 538:73-79.
- Harker, F., B. Carr, M. Lenjo, E. MacRae, W. Wismer, K. Marsh, M. Williams, A. White, C. Lund and S. Walker. 2009. Consumer liking for kiwifruit flavour: A meta-analysis of five studies on fruit quality. *Food Qual. Prefer.* 20:30-41.
- Heo, H.-J., H.-Y. Cho, B. Hong, H.-K. Kim, E.-K. Kim, B.-G. Kim and D.-H. Shin. 2001. Protective effect of 4',5-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against A β -induced oxidative stress in PC12 cells. *Amyloid-J. Protein Fold. Disord.* 8:194-201.
- Huang, D., B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J.A. Flanagan and R.L. Prior. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well

- format. *J. Agric. Food Chem.* 50:4437-4444.
- Jia, Z., M. Tang and J. Wu. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64:555-559.
- Jung, K.-A., T.-C. Song, D. Han, I.-H. Kim, Y.-E. Kim and C.-H. Lee. 2005. Cardiovascular protective properties of kiwifruit extracts *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* 28:1782-1785.
- Kähkönen, M.P., A.I. Hopia, H.J. Vuorela, J.-P. Rauha, K. Pihlaja, T.S. Kujala and M. Heinonen. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47:3954-3962.
- Keston, A.S. and R. Brandt. 1965. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* 11:1-5.
- Kim, D.-O. and C.Y. Lee. Extraction and isolation of polyphenolics. pp 11.2.1-11.2.12. In: *Current protocols in food analytical chemistry*. Wrolstad RE (ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York, USA (2002)
- Kim, D.-O. and C.Y. Lee. 2004. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44:253-273.
- Kim, J.G., K. Beppu and I. Kataoka. 2009. Varietal differences in phenolic content and astringency in skin and flesh of hardy kiwifruit resources in Japan. *Sci. Hortic.* 120:551-554.
- Kim, J.H., H. Yang, H.J. Hong, W.Y. Kang, D.G. Kim, S.C. Kim, K.J. Song, D. King, C.H. Han and Y.J. Lee. 2010. Neuroprotective effects of Korean kiwifruit against *t*-BHP-induced cell damage in PC12 cells. *Korean J. Plant Res.* 23:165-171.
- Latocha, P., T. Krupa, R. Wolosiak, E. Worobiej and J. Wilczak. 2010. Antioxidant activity and chemical difference in fruit of different *Actinidia* sp. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 61:381-394.
- Lim, Y.J., C.-S. Oh, Y.-D. Park, D.-O. Kim, U.-J. Kim, Y.-S. Cho and S.H. Eom. 2014. Physiological components of kiwifruits with *in vitro* antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Sci. Biotechnol.* 23:943-949.
- Liu, S., J.E. Manson, I.-M. Lee, S.R. Cole, C.H. Hennekens, W.C. Willett and J.E. Buring. 2000. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 72:922-928.
- Motohashi, N., Y. Shirataki, M. Kawase, S. Tani, H. Sakagami, K. Satoh, T. Kurihara, H. Nakashima, I. Mucsi, A. Varga and J. Molnár. 2002. Cancer prevention and therapy with kiwifruit in Chinese folklore medicine: A study of kiwifruit extracts. *J. Ethnopharmacol.* 81:357-364.
- Moyer, R.A., K.E. Hummer, C.E. Finn, B. Frei and R.E. Wrolstad. 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.* 50:519-525.
- Nishiyama, I., T. Fukuda and T. Oota. 2005. Genotypic differences in chlorophyll, lutein, and β -carotene contents in the fruits of *Actinidia* species. *J. Agric. Food Chem.* 53:6403-6407.
- Nishiyama, I., Y. Yamashita, M. Yamanaka, A. Shimohashi, T. Fukuda and T. Oota. 2004. Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other *Actinidia* species. *J. Agric. Food Chem.* 52:5472-5475.
- Pavlica, S. and R. Gebhardt. 2010. Protective effects of flavonoids and two metabolites against oxidative stress in neuronal PC12 cells. *Life Sci.* 86:79-86.
- Proteggente, A.R., A.S. Pannala, G. Paganga, L. Van. Buren, E. Wagner, S. Wiseman, F. Van De. Put, C. Dacombe and C.A. Rice-Evans. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radic. Res.* 36:217-233.
- Rural Development Administration. 2013. New fruit cultivars developed by governmental institutes of Korea. www.nihhs.go.kr accessed on July 18, 2014.
- Samadi-Maybodi, A. and M.R. Shariat. 2003. Characterization of elemental composition in kiwifruit grown in northern Iran. *J. Agric. Food Chem.* 51:3108-3110.
- Scalzo, J., A. Politi, N. Pellegrini, B. Mezzetti and M. Battino. 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition* 21:207-213.
- Sestili, P., G. Brandi, L. Brambilla, F. Cattabeni and O. Cantoni. 1996. Hydrogen peroxide mediates the killing of U937 tumor cells elicited by pharmacologically attainable concentrations of ascorbic acid: Cell death prevention by extracellular catalase or catalase from cocultured erythrocytes or fibroblasts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:1719-1725.
- Singleton, V.L. and J.A. Rossi, Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-158.
- Tavarini, S., E. Degl'Innocenti, D. Remorini, R. Massai and L. Guidi. 2008. Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food Chem.* 107:282-288.
- Wolfe, K.L. and R.H. Liu. 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 55:8896-8907.
- Zheng, W. and S.Y. Wang. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* 49:5165-5170.