

저온숙성마늘의 라디칼 소거 활성을 통한 산화스트레스 억제 효과

황경아 · 김가람 · 황유진 · 황인국 · 송진

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과

Oxidative Stress Inhibitory Effects of Low Temperature-Aged Garlic (*Allium sativum* L.) Extracts through Free Radical Scavenging Activity

Kyung-A Hwang, Ga Ram Kim, Yu-Jin Hwang, In-Guk Hwang, and Jin Song

Department of Agrofood Resources, National Academy of Agricultural Science, RDA

ABSTRACT Garlic has drawn attention as a food material for its anti-oxidative and anti-inflammatory properties as well as for prevention and treatment of cancer. In order to increase efficiency, various aging methods for garlic have been attempted. In particular, thermally processed garlic is known to have higher biological activities due to its various chemical changes during heat treatment. Therefore, in this study, we investigated the anti-oxidative effects of garlic extracts aged at low temperature (60~70°C). In the results, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and 2,2-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonate) radical scavenging activities and ferric reducing ability of low temperature-aged garlic (LTAG) were similar to those of raw garlic. LTAG also showed decreased lipopolysaccharide (LPS)-induced production of reactive oxygen species, although there were not significant differences among samples. In addition, xanthine oxidase activity was inhibited by LTAG; the 15 days and 60°C extract showed outstanding inhibition compared with the others. To understand the molecular mechanisms behind the anti-oxidative activity of LTAG, we performed quantitative real-time PCR analysis. The 30 days and 70°C extract upregulated mRNA expression of antioxidant enzymes such as Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD), Mn-SOD, glutathione peroxidase, and catalase in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. This result indicates that LTAG can be a functional food as a nature antioxidant and antioxidant substance.

Key words: low temperature aged garlic, radical scavenging activity, reactive oxidative stress, RAW 264.7 cell

서론

생체 내에서는 활성산소 및 활성질소를 포함하는 자유라디칼이 생성되면 이를 제거하기 위해 항산화 방어 시스템이 작동되며, 정상적 상태에서는 이 시스템을 통해 외부의 자극으로부터 신체를 보호한다. 그러나 항산화 방어시스템의 작동에 이상이 생기면 신체는 활성산소를 제거하지 못하는 산화스트레스 상태로 빠지게 되며, 세포와 조직을 구성하는 단백질, 지질, 세포막과 DNA 등의 손상을 초래하여 이로 인한 돌연변이 및 염증, 발암 등 각종 질병을 유발시킨다(1-3). 최근 건강수명 연장에 관심이 높은 현대인들의 산화스트레스와 질병에 효과적인 기능성 소재를 의약품보다 식품을 섭취하고자 하는 욕구가 증대되어 기능성 식품 시장 확대 및 활성화를 불러왔고, 또한 관련 연구도 활발히 진행되고 있다(4,5). 그중 마늘이 대표적으로 생리활성이 높은 기능성 소재로 알려져 있다. 마늘은 *Allium* 속 식물로 백합

과의 다년초 식물이며 향균, 향암, 향노화, 항산화 활성(6), 혈압 강화(7)와 면역 증강 등의 다양한 생리활성이 알려지면서 기능성 식품 및 의약품의 원료로 다방면에 이용되고 있다(8,9). 마늘의 주요한 생리활성 기능은 플라보노이드와 황화합물의 영향에 의한 것이지만(10), 생마늘 특유의 강한 향과 매운맛으로 인해 섭취 시 거부감을 준다. 이러한 요인을 극복하기 위해 마늘이 지니고 있는 생리활성 기능은 유지하면서 강한 향과 매운맛을 보완시키기 위한 연구 방법이 개발되고 있는데, 그 대표적인 방법으로 마늘에 열처리를 하거나 숙성기간의 변화를 주는 것이다. 이 과정을 통해 가공된 제품이 흑마늘과 홍마늘로 이들은 일정한 온도에서 숙성을 거쳐 원하는 색을 띠게 되며, 가공 정도에 따라 화학적 성분 변화 및 풍미, 생리활성 기능의 차이를 나타낸다(11). 숙성마늘은 생마늘을 40~90°C의 온도에서 수십 일간 숙성시킴으로써 allicin 감소 및 폴리페놀과 플라보노이드 증가 등의 성분 변화가 일어난다. 이로 인해 마늘의 강한 냄새를 감소시키고, 높아진 과당 함량으로 인한 단맛 증가와 더불어 식감도 한결 부드러워진다(12,13). Cho 등(14)에 따르면 생마늘을 온도별로 숙성시켰을 때 마늘의 탄수화물이 과당으로 변환되고 탈수반응을 거쳐 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde

(HMF)라는 물질이 생성되었고, 이는 75°C, 7일간의 고온숙성 과정을 거치며 급격히 증가하기 시작하였으나, 60°C의 저온숙성에 의해서는 HMF의 생성이 거의 이루어지지 않았음을 보고하였다. 최근 연구에 의하면 HMF는 tyrosinase 활성을 억제시켜 피부 미백 효능을 가지고 있으며(15), 적혈구의 세포 겸상화를 억제하는 기능이 있다는 것이 보고되고 있지만(16), 돌연변이성 물질인 5-sulfoxymethylfurfural로 활성화되면 독성 또는 돌연변이성원 및 발암성을 나타낼 수도 있음이 보고되고 있다(17). 따라서 최근 마늘의 기능성을 증진시키되 HMF 함량을 낮추는 저온숙성마늘의 개발이 이루어지고 있으나, 항산화 등의 생리활성에 관한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 생마늘을 저온에서 기간별 숙성을 통해 제조한 저온숙성마늘 추출물의 항산화 활성을 평가하고, 향후 이들 소재를 활용한 기능성 식품 개발 및 이를 통한 농산물 부가가치 창출에 기여하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

실험에 사용한 마늘은 2015년 경상북도 의성군에서 재배된 통마늘을 구입하여 사용하였다. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)(ABTS), potassium peroxodisulfate, hydrochloric acid(HCl), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ), sodium acetate anhydrate, acetic acid, iron(III) chloride hexahydrate($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), iron(II) sulfate heptahydrate($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), lipopolysaccharide(LPS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin(P/S), phosphate buffered saline(PBS)은 Gibco(Waltham, MA USA) 제품을 사용하였고, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular probe(Waltham, MA USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 이외에 분석을 위한 시약은 필요에 따라 특급 또는 1급을 구입하여 사용하였다.

저온숙성마늘 추출물 제조

밀폐용기에 통마늘을 각각 20통씩 밀봉하여 15일 60°C(1560), 15일 70°C(1570), 30일 60°C(3060), 30일 70°C(3070), 60일 60°C(6060)의 조건으로 배양기에서 숙성시킨 후, 동결 건조(Lyoph-pride Series Freeze Dryer, ilShinBioBase, Dongducheon, Korea)하여 믹서기(HR 2860, Phillips Co., Eindhoven, Netherlands)로 10분간 분쇄하였다. 분쇄한 저온숙성마늘 5 g에 70% 주정 200 mL를 넣어 30분간 초음파 추출하고, 상온에서 1시간 방치한 후 상등액을 회수하였다. 동일한 과정을 3회 반복하여 여과

지(Whatman No. 2, GE Healthcare Ltd., Little Chalfont, UK)로 여과한 후 감압 농축(EYELA CCA-1110, Tokyo Rikakikai Co.)한 다음, 동결건조기를 이용하여 분말화해 시료로 사용하였다. 이렇게 얻어진 저온숙성마늘 에탄올 추출물 분말은 -70°C deep freezer에 보관하였으며, 분말시료는 DMSO에 녹여 각각 50, 100, 250 µg/mL 농도로 PBS에 희석하여 실험에 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Mensor(18)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 0.3 mM DPPH 용액에 2.5배의 저온숙성마늘 추출물을 혼합한 후 실온에서 30분간 반응시킨 다음, 분광광도계(SpectraMax M5, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 518 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군은 시료 대신 PBS로 실험하였고, 라디칼 소거능은 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{ABS}_{\text{sample}}}{\text{ABS}_{\text{control}}}\right) \times 100$$

ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능 측정은 Re(19)의 방법에 따라 수행하였으며, 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하고 실온의 어두운 곳에서 12~16시간 보관하여 ABTS 라디칼을 생성시켰다. ABTS 라디칼은 732 nm에서 흡광도가 0.7 ± 0.02 가 되도록 조정하여 사용하였다. 농도를 조정된 ABTS 용액 1.8 mL에 저온숙성마늘 농도별 추출물 0.2 mL를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 분광광도계(Molecular Devices, LLC.)를 이용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군은 시료 대신 PBS로 실험하였고, 라디칼 소거능은 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{ABS}_{\text{sample}}}{\text{ABS}_{\text{control}}}\right) \times 100$$

환원력 측정

환원력 측정은 FRAP법(20)을 이용하여 수행하였다. 반응액은 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl에 녹인 10 mM TPTZ와 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 10:1:1 (v:v:v)의 비율로 실험 직전에 만들어 사용하였다. 저온숙성마늘 농도별 추출물 10 µL에 반응액 300 µL를 혼합하여 4분간 실온에서 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 환원력은 FeSO_4 를 표준물질로 하여 얻은 검량선으로 계산하여 나타내었다.

세포 배양

RAW 264.7 마우스 대식세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. RAW 264.7 세포는 10% FBS와 1% P/S를 포함한 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 2일에 한

번 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

세포 독성 측정

RAW 264.7 세포를 1×10^4 cell/well로 96 well plate에 분주하여 2시간 배양한 후 시료를 농도별(50, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 5 mg/mL의 MTT 용액을 각 well에 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 재배양한 후 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Intracellular reactive oxygen species(ROS) 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포를 1×10^6 cell/well로 6 well plate에 분주하여 2시간 동안 배양한 후 저온숙성마늘 추출물을 처리하였으며, 산화스트레스 유발을 위해 추출물 처리 1시간 뒤에 LPS를 각 well에 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 no phenol-DMEM 배지에 10 μM DCFH-DA를 첨가하여 빛을 차단한 상태에서 37°C에서 30분 반응 후 PBS에 0.1% BSA를 첨가하여 제조한 buffer로 2회 세척한 후 flow cytometry(BD FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

Xanthine oxidase 저해 활성 측정

Xanthine oxidase 저해 활성은 xanthine oxidase assay kit(Abcam plc., Cambridge, UK)을 이용하여 측정하였다. 먼저 RAW 264.7 세포를 5×10^5 cell/well로 12 well plate에 분주하여 2시간 동안 배양한 후 저온숙성마늘 추출물을 처리하였으며, 산화스트레스 유발을 위해 추출물 처리 1시간 뒤에 LPS를 각 well에 처리하여 24시간 배양하였다. 배양한 세포를 PBS로 2회 세척한 다음, PBS를 이용하여 세포를 분리하였다. 분리한 세포에 assay buffer를 첨가하여 16,000 rpm에서 10분간 원심분리 하고 상등액만 취하였다. 상등액 50 μL 와 반응액 50 μL 를 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항산화 효소의 유전자 발현

RAW 264.7 세포를 5×10^5 cell/well로 12 well plate에 분주하여 2시간 동안 배양한 후 저온숙성마늘 추출물을 처리하였으며, 산화스트레스 유발을 위해 추출물 처리 1시간 뒤에 LPS를 각 well에 처리하여 24시간 배양하였다. 배양한 세포의 total RNA는 RNeasy mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)으로 추출하였고, reverse transcription system kit(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 cDNA를 합성한 다음, SYBR Green mix(Qiagen)를 사용하여 mRNA 발현 정도를 Real-Time PCR Detection System(CFX96™, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 분석하였다. Endogenous control은 GAPDH를 사용하였으며, 유전자 발현에 이용된 Cu/Zn-superoxide dismutase(SOD), Mn-SOD, glutathione peroxidase(GPx), catalase의 primer는 Table 1에 나타내었다.

통계분석

모든 실험은 3회 이상 실시하여 얻은 결과들을 mean \pm standard error of mean(SEM)으로 나타내었고, 각 실험 결과로부터 Student's *t*-test를 구한 후 $P < 0.05$ 인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다(SPSS 12.0, IBM Co., Armonk, NY, USA).

결과 및 고찰

저온숙성마늘의 라디칼 소거능

DPPH, ABTS, FRAP 방법은 가장 널리 이용되는 항산화 활성 측정 방법 중 하나이다. 그중 DPPH와 ABTS는 라디칼의 일종으로 DPPH는 자유라디칼이지만 ABTS는 양이온 라디칼이라는 것에서 차이를 보이며, 항산화 물질의 종류에 따라 라디칼에 대한 결합도가 각기 다르므로 이를 통해 항산화능의 차이를 판단할 수 있다(21). 저온숙성마늘 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 비교한 결과는 Fig. 1A와 같으며, 처리 농도가 증가할수록 라디칼 소거능은 증가하였다. 생마늘 추출물의 경우 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 약 20%의 소거능을 나타내었으나, 대부분의 저온숙성마늘 추출물은 250 $\mu\text{g}/$

Table 1. Primers used for semi-quantitative RT-PCR of the antioxidant enzymes

Target gene	Primer	Sequence (5'→3')
Mn-SOD	Forward	GGGTTGGCTTGGTTTCAATAAGGAA
	Reverse	AGGTAGTAAGCGTGCTCCCACACAT
Cu/Zn-SOD	Forward	CAGCATGGGTTCCACGTCCA
	Reverse	CACATTGCCACACCGTCTCT
Catalase	Forward	AAGACAATGTCACTCAGGTGCGGA
	Reverse	GGCAATGTTCTCACACAGGCGTTT
Glutathione peroxidase	Forward	CTCGGTTTCCCGTGCAATCAG
	Reverse	GTGCAGCCAGTAATCACCAAG
GAPDH	Forward	GAGCCAAAAGGGTCATCATC
	Reverse	TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG

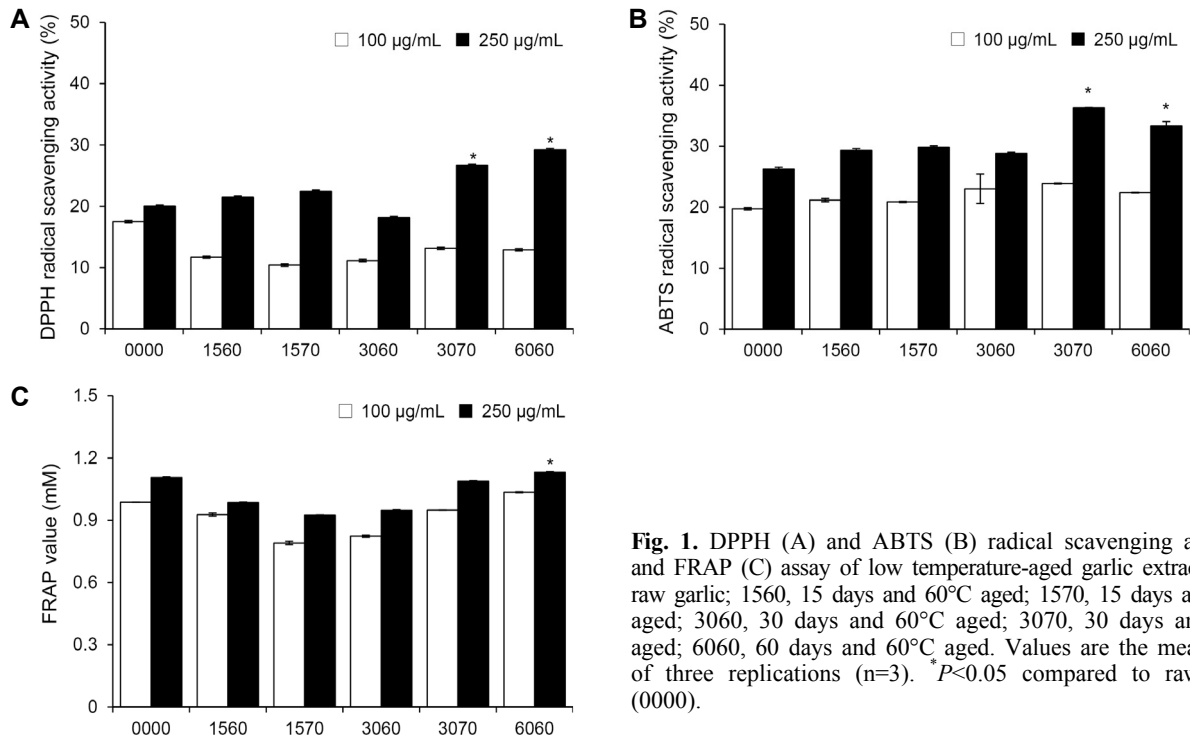


Fig. 1. DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activities and FRAP (C) assay of low temperature-aged garlic extract. 0000, raw garlic; 1560, 15 days and 60°C aged; 1570, 15 days and 70°C aged; 3060, 30 days and 60°C aged; 3070, 30 days and 70°C aged; 6060, 60 days and 60°C aged. Values are the mean±SEM of three replications (n=3). **P*<0.05 compared to raw garlic (0000).

mL 농도에서 생마늘 추출물보다 더 높은 소거능을 보였다. 특히 60일 60°C 추출물은 약 30%의 소거능을 보였으며, 30일 70°C 추출물도 우수한 소거능을 보였다. Shin 등(22)의 연구에 따르면 온도를 다르게 하여 숙성한 마늘 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 숙성온도가 높을수록 그 활성이 우수하다고 보고하였으며, 이는 본 실험의 결과와 유사한 것을 확인할 수 있었다. 또한 Moreno 등(23)의 연구에서는 14일 동안 50°C에서 숙성시킨 마늘 추출물의 항산화 활성은 amadori 화합물에 의한 것이고, 이 화합물은 maillard 반응의 첫 단계에서 주로 생성되며 이것이 라디칼 소거능에 기여하는 것으로 보고되고 있다. 본 연구의 저온숙성마늘도 숙성과정 중 maillard 반응으로 인해 amadori 화합물이 생성될 것으로 생각되며, 이 화합물이 항산화 활성에 영향을 줄 것으로 생각된다.

ABTS 라디칼 소거능은 항산화 물질이 ABTS 양이온과 반응하여 양이온이 소거되면서 특유의 청록색이 탈색되며 이의 흡광도를 측정하여 항산화능을 측정하는 방법이다 (18). Fig. 1B에 나타난 것과 저온숙성마늘 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 DPPH 라디칼 소거능 결과와 유사하게 추출물의 농도에 의존적으로 증가하였다. 100 µg/mL 농도에서 생마늘 추출물과 저온숙성마늘 추출물은 유사한 ABTS 라디칼 소거능을 보였으나, 250 µg/mL 농도에서는 모든 저온숙성마늘 추출물이 생마늘 추출물보다 더 높은 소거능을 나타내는 것을 확인하였다. 특히 30일 70°C 추출물은 약 40%의 소거능을 보였으며, 60일 60°C 추출물도 우수한 소거능을 보였다. Lee 등(24)은 생마늘에 비해 열처리한 마늘의 항산화능이 우수하였고, ABTS 라디칼 소거능의 경우 숙

성 기간과 정도에 따라 차이를 보였으며, 갈변물질이 많이 생성될수록 소거능이 더 증가함을 보고한 바 있다. 본 연구 결과 저온숙성마늘 추출물의 ABTS 라디칼 소거능이 DPPH 라디칼 소거능보다 더 높은 결과가 나타났는데, 그 이유는 ABTS의 경우 수소공여 항산화제와 연쇄결단형 항산화제로서의 능력을 모두 측정할 수 있고, 수용성, 지용성 물질 모두에 쓰이는 방법이기 때문에 ABTS 라디칼 소거능이 더 높게 나타난 것으로 판단된다.

환원력 측정법은 ferric ion이 ferrous로 전환되는 과정을 분석하여 추출물이 Fe³⁺을 Fe²⁺로 환원시킬 때 Fe²⁺이 나타내는 흡광도를 측정하여 환원력을 계산하는 방법으로 라디칼 소거능의 항산화 측정법과 다른 메커니즘의 측정법이다(25). 생마늘 추출물과 저온숙성마늘 추출물의 환원력을 측정된 결과는 Fig. 1C와 같다. 모든 추출물이 농도 의존적으로 환원력이 증가하였고 250 µg/mL 농도에서 생마늘 추출물과 30일 70°C 추출물이 비슷한 환원력을 보였으며, 60일 60°C 추출물은 더 높은 환원력을 나타냈다. Hwang 등(26)에 따르면 총 페놀 및 총 플라보노이드의 함량이 높은 추출물이 라디칼 소거능과 환원력도 높게 나타난다는 결과가 보고되어 있다. 생마늘을 숙성시켰을 때 총 페놀화합물 및 플라보노이드의 함량이 증가된다는 결과(24)로 봤을 때 본 연구의 저온숙성마늘 추출물의 항산화 활성은 페놀 화합물과 많은 연관이 있는 것으로 판단된다.

세포독성 평가

저온숙성마늘 추출물이 RAW 264.7 세포에 대한 독성 여부를 확인하기 위하여 저온숙성마늘 추출물을 농도별로 처

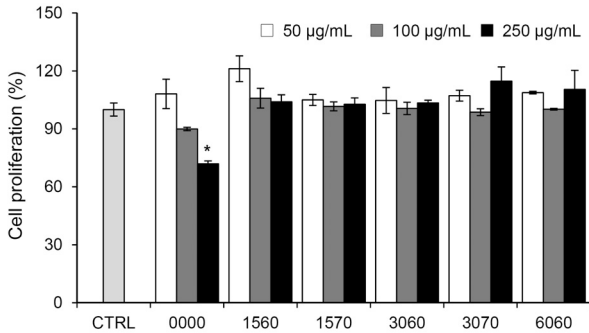


Fig. 2. Effects of low temperature-aged garlic extracts on cell viability in RAW 264.7 cells. 0000, raw garlic; 1560, 15 days and 60°C aged; 1570, 15 days and 70°C aged; 3060, 30 days and 60°C aged; 3070, 30 days and 70°C aged; 6060, 60 days and 60°C aged. Values are the mean±SEM of three replications (n=3). *P<0.05 compared to CTRL.

리하여 24시간 후에 세포생존율을 측정 한 결과 대조군의 세포생존율을 기준으로 50, 100, 250 µg/mL 농도에 따른 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 2). 생마늘 추출물은 250 µg/mL 농도에서 약 30% 정도의 세포독성을 나타내었으나, 저온숙성마늘 추출물은 농도에 상관없이 세포독성을 보이지 않았다. 따라서 RAW 264.7 세포에 대한 추출물의 항산화 활성 연구를 위한 적정 농도를 100 µg/mL 농도로 설정하고 실험에 사용하였다.

ROS 억제 활성 평가

산화스트레스의 주요인자인 ROS는 생체 내 조직에 손상을 주고 변형을 유발하여 여러 대사과정 및 생화학적 변화를 일으키는 원인 물질로(27) 생체 내에서는 이러한 ROS를 제

거하는 항산화 방어계가 항상 균형을 이루고 있으며(28), 항산화 연구에서 ROS 소거능은 중요한 지표로 사용된다. 실험에 사용한 LPS는 그람 음성 세균의 세포 외벽 물질로 산화스트레스를 유발시키는 인자로 잘 알려져 있다(29). Fig. 3에 나타낸 바와 같이 LPS를 처리하였을 때 대조군에 비해 ROS가 많이 생성되는 것을 확인할 수 있었다. ROS가 생성된 세포에 생마늘 추출물과 저온숙성마늘 추출물을 처리하였을 때 모든 시료에서 높은 ROS 생성 억제 효과를 나타내었으나 추출물 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다.

Xanthine oxidase 저해 활성 측정

생마늘 추출물과 저온숙성마늘 추출물의 xanthine oxidase 저해 활성을 측정 결과는 Fig. 4와 같다. 생마늘 추출물의 xanthine oxidase 활성은 약 55%가 저해되었으며, 대부분의 저온숙성마늘 추출물도 xanthine oxidase 활성을 저해시키는 것을 확인하였다. 특히 15일 60°C 추출물이 약 69%의 높은 저해 효과를 보였으며, 15일 70°C 추출물도 47%의 저해 효과를 보였다. 마늘의 숙성 기간이 길어지고, 온도가 높아짐에 따라 xanthine oxidase 활성이 감소함을 확인할 수 있었다.

여러 연구에 의하여 플라보노이드가 xanthine oxidase의 활성을 저해하는 물질로 잘 알려져 있으며(30), Kang 등(31)의 연구에서 황마늘 에탄올 추출물에서 플라보노이드의 함량이 증가한다고 보고하였다. 또한 xanthine oxidase는 hydroxy기가 methyl화되면 저해 효과가 감소된다고 보고되고 있고(32), 이는 마늘의 숙성 기간이 길어지고 고온에서 처리할 경우 HMF의 생성량이 증가한다는 연구 결과에 따라(33) xanthine oxidase의 저해 활성능은 HMF의 영향

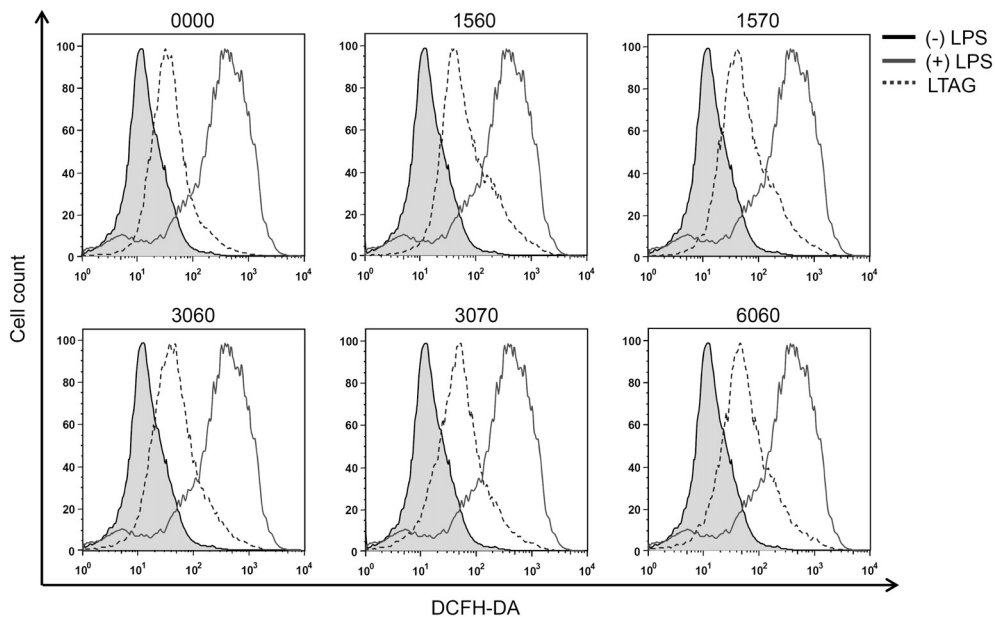


Fig. 3. Effect of low temperature-aged garlic extracts on the production of reactive oxygen species in RAW 264.7 cells. 0000, raw garlic; 1560, 15 days and 60°C aged; 1570, 15 days and 70°C aged; 3060, 30 days and 60°C aged; 3070, 30 days and 70°C aged; 6060, 60 days and 60°C aged.

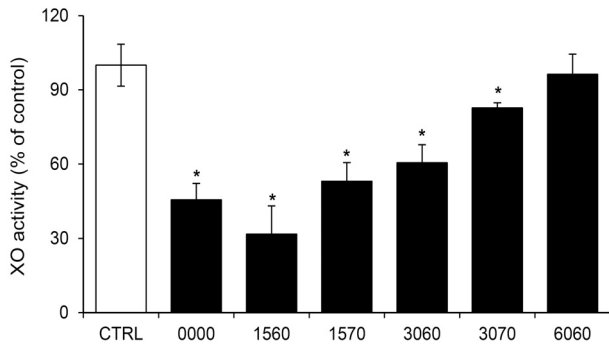


Fig. 4. Effect of xanthine oxidase inhibition by low temperature-aged garlic extracts in RAW 264.7 cells. 0000, raw garlic; 1560, 15 days and 60°C aged; 1570, 15 days and 70°C aged; 3060, 30 days and 60°C aged; 3070, 30 days and 70°C aged; 6060, 60 days and 60°C aged. Values are the mean±SEM of three replications (n=3). **P*<0.05 compared to CTRL.

을 받는 것으로 생각된다.

항산화 효소의 유전자 발현

LPS로 유도된 산화스트레스를 억제하기 위한 기전을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 저온숙성마늘 추출물을 처리한 후 LPS로 자극하여 항산화 효소의 mRNA를 RT-PCR로 측정된 결과(Fig. 5), Cu/Zn-SOD와 Mn-SOD의 mRNA 발현은 LPS로 자극한 세포에 비해 30일 70°C 추출물의 유전자 발현이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. GPx와 catalase 유전자 발현도 30일 70°C 추출물과 60일 60°C

추출물에서 역시 증가하는 것을 확인하였다. Superoxide dismutase(SOD), GPx, catalase, glutathione reductase 등은 세포 내의 효소성 항산화제로 이들의 활성을 증가시키기 위한 많은 연구가 진행되고 있다(34). SOD는 세포 내외로부터 발생하는 다량의 superoxide(O_2^-)를 과산화수소(H_2O_2)로 전환시켜 superoxide(O_2^-)를 제거하는 중요한 역할을 하는 효소로 알려져 있다(35). 정상적인 상황에서는 세포 내에 존재하는 Cu/Zn-SOD와 Mn-SOD로 O_2^- 를 비활성화시킬 수 있으나(36), 염증, 질병 등과 같은 특수상황에서는 다량의 O_2^- 가 존재하게 되므로 SOD 활성이 잘 이루어지지 않아 조직 손상을 초래할 수 있다(37). 또한 GPx는 glutathione과 SOD에 의해 생성된 H_2O_2 를 이용하여 물 분자로 전환시키는 효소이며(38) catalase는 dismutation 반응을 통해 H_2O_2 를 물과 산소로 분해시키는 효소로, 두 효소 모두 생체 내에서 활성산소로부터 생체를 보호하는 역할을 한다(39). 따라서 30일 70°C 숙성 마늘 추출물은 항산화 효소의 활성을 증가시킴으로써 산화스트레스를 감소시켜 세포 손상을 낮출 수 있을 것으로 생각되며, Kim 등(40)의 논문에서 약용식물에 의해 SOD, catalase, GPx의 활성이 증가함으로써 자유라디칼 생성 억제 및 활성산소에 의한 산화적 손상으로부터 생체를 보호하였다는 결과와 유사한 것을 확인하였다.

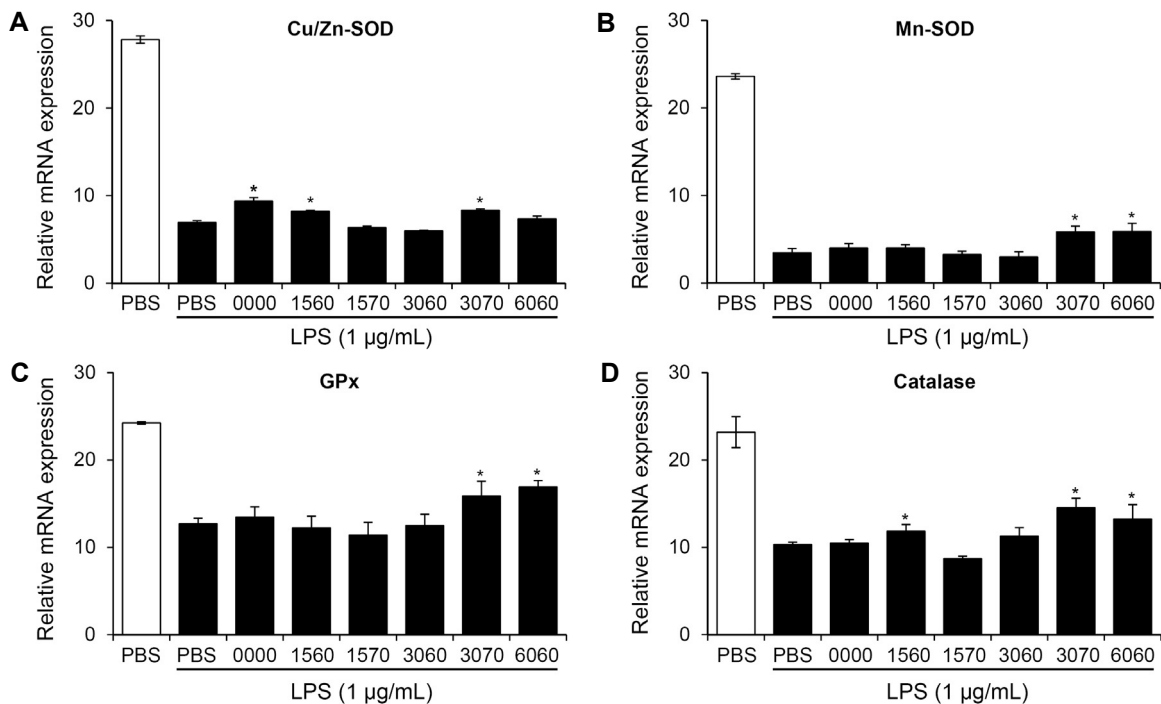


Fig. 5. Effect of low temperature-aged garlic extracts on expression of antioxidant mRNA in RAW 264.7 cells. 0000, raw garlic; 1560, 15 days and 60°C aged; 1570, 15 days and 70°C aged; 3060, 30 days and 60°C aged; 3070, 30 days and 70°C aged; 6060, 60 days and 60°C aged. Values are the mean±SEM of three replications (n=3). **P*<0.05 compared to LPS-stimulated.

요 약

본 연구에서는 마늘의 숙성 기간(15일, 30일, 60일)과 온도(60°C, 70°C)를 달리한 저온숙성마늘과 생마늘의 항산화 효과를 비교·분석하였다. DPPH와 ABTS의 라디칼 소거능과 FRAP법에 의한 환원력을 측정된 결과 250 µg/mL에서 생마늘 추출물보다 30일 70°C 추출물과 60일 60°C 추출물의 항산화 활성이 우수하였다. 세포 내 활성산소 생성은 15일 60°C 추출물과 30일 70°C 추출물에서 높은 억제 효과를 보였으며, xanthine oxidase에 대한 활성 저해 효과 역시 15일 60°C 추출물에서 우수하였다. 항산화 효소의 유전자 발현은 LPS를 처리한 군과 생마늘 추출물보다 30일 70°C 추출물에서 높은 효과를 보였다. 본 연구 결과를 통해 저온숙성마늘이 생마늘보다 항산화 활성이 우수하다는 것을 확인함으로써 차후 항산화 건강기능식품 소재로서의 활용이 가능할 것으로 판단되나, 저온숙성마늘 추출물의 체내 생리 활성 메커니즘 규명을 위해 동물실험 등의 추가적인 연구를 계속적으로 수행할 예정이다.

감사의 글

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 저온숙성마늘의 피로개선 효능 평가 및 작용기전 규명, 세부과제번호: PJ01094202)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J Lab Clin Med* 119: 598-620.
- Jiang WY. 2005. Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: a perspective from modern science. *Trends Pharmacol Sci* 26: 558-563.
- Park DJ, Kim SG, Yoon MK, Park SY, Kim YH, Lee SJ, Choi YW. 2010. Effects of extracts from raw and black garlic on anticancer, antioxidant, antiinflammatory and whitening. *Korean J Hort Sci Technol* 28: 39-40.
- Kim JH, Ahn MS, Kim GH, Kang MH. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of *Pleurotus eryngii* extracts prepared from different aerial part. *Korean J Food Sci Technol* 38: 799-804.
- Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. 2005. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic propolis. *Food Chem* 89: 27-36.
- Kang MJ, Yoon HS, Shin JH. 2012. Chemical properties and biological activity of garlic (*Allium sativum* L.) shoots. *J Agric Life Sci* 46: 129-139.
- Chun HJ, Park JE. 1997. Effect of heat treatment of garlic added diet on the blood of spontaneously hypertension rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 103-108.
- Katsuzi N, Park M, Ha SD, Kim GH. 2000. Effects of garlic extract for protecting the infection of influenza virus. *J Korean Soc Food Nutr* 29: 128-133.
- Kim HK, Kwak HJ, Kim KH. 2002. Physiological activity and antioxidative effect of garlic (*Allium sativum* L.) extract. *Food Sci Biotechnol* 11: 500-506.
- Leelarungrayub N, Rattanapanone V, Chanarat N, Gebicki JM. 2006. Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition* 22: 266-274.
- Choi DJ, Lee SJ, Kang MJ, Cho HS, Sung NJ, Shin JH. 2008. Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 465-471.
- Lawson LD, Wang ZJ. 2005. Allicin and allicin-derived garlic compounds increase breath acetone through allyl methyl sulfide: use in measuring allicin bioavailability. *J Agric Food Chem* 53: 1974-1983.
- Choi YH, Shim YS, Kim CT, Lee C, Shin DB. 2007. Characteristics of thiosulfonates and volatile sulfur compounds from blanched garlic reacted with alliinase. *Korean J Food Sci Technol* 39: 600-607.
- Cho KJ, Cha JY, Yim JH, Kim JH. 2011. Effects of aging temperature and time on the conversion of garlic (*Allium sativum* L.) components. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 84-88.
- Sharma VK, Choi J, Sharma N, Choi M, Seo SY. 2004. *In vitro* anti-tyrosinase activity of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural isolated from *Dictyophora indusiata*. *Phytother Res* 18: 841-844.
- Abdulmalik O, Safo MK, Chen Q, Yang J, Brugnara C, Ohene-Frempong K, Abraham DJ, Asakura T. 2005. 5-Hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. *Br J Haematol* 128: 552-561.
- Monien BH, Frank H, Seidel A, Glatt H. 2009. Conversion of the common food constituent 5-hydroxymethylfurfural into a mutagenic and carcinogenic sulfuric acid ester in the mouse *in vivo*. *Chem Res Toxicol* 22: 1123-1128.
- Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, Leitão SG. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res* 15: 127-130.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
- Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
- Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, LaVoie EJ, Huang TC, Ho CT. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 46: 4869-4873.
- Shin JH, Choi DJ, Chung MJ, Kang MJ, Sung NJ. 2008. Changes of physicochemical components and antioxidant activity of aged garlic at different temperatures. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1174-1181.
- Moreno FJ, Corzo-martinez M, Casrillo MD, Villamiel M. 2006. Changes in antioxidant activity of dehydrated onion and garlic during storage. *Food Res Int* 39: 891-897.
- Lee SJ, Shin JH, Kang MJ, Jung WJ, Ryu JH, Kim RJ, Sung NJ. 2010. Antioxidants activity of aged red garlic. *J Life Sci* 20: 775-781.
- Yoo KM, Kim DO, Lee CY. 2007. Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci Biotechnol* 16: 177-182.
- Hwang CR, Kang MJ, Shim HJ, Sub HJ, Kwon OO, Shin JH. 2015. Antioxidant and antiobesity activities of various color resources extracted from natural plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 165-172.
- Kader KN, Coyle CH. 2007. Reactive oxygen and nitrogen species: implications for cardiovascular device engineering.

- J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 83: 138-144.
28. Freeman BA, Crapo JD. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426.
 29. Noworyta-Sokołowska K, Górska A, Gołombiowska K. 2013. LPS-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat striatum. *Pharmacol Rep* 65: 863-869.
 30. Iio M, Moriyama A, Matsumoto Y, Takaki N, Fukumoto M. 1985. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric Biol Chem* 49: 2173-2176.
 31. Kang JR, Hwang CR, Sim HJ, Kang MJ, Kang ST, Shin JH. 2015. Biological activities of yellow garlic extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 983-992.
 32. Hayashi T, Sawa K, Kawasaki M, Arisawa M, Shimizu M, Morita N. 1988. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J Nat Prod* 51: 345-348.
 33. Cho K, Cha J, Lim J, Kim J. 2011. Formation of 5-HMF in making aged garlic (*Allium sativum* L.) under different condition. *Planta Med* 77: PJ4.
 34. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 37: 949-962.
 35. Del Maestro R, Thaw HH, Björk J, Planker M, Arfors KE. 1980. Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand Suppl* 492: 43-57.
 36. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33: 337-349.
 37. Asimakis GK, Lick S, Patterson C. 2002. Postschismic recovery of contractile function is impaired in SOD2(+/-) but not SOD1(+/-) mouse hearts. *Circulation* 105: 981-986.
 38. Imai H, Nakagawa Y. 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 34: 145-169.
 39. Deisseroth A, Dounce AL. 1970. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* 50: 319-375.
 40. Kim HJ, Lee SG, Park SJ, Yu MH, Lee EJ, Lee SP, Lee IS. 2012. Antioxidant effects of extracts from fermented red ginseng added with medicinal herbs in STZ-induced diabetic rats. *Korean J Food Sci Technol* 44: 367-372.