

품종별 렌틸 추출물의 폴리페놀화합물 함량 및 항산화 활성

이소희 · 이승욱

계명대학교 식품가공학과

Polyphenol Contents and Antioxidant Activities of Lentil Extracts from Different Cultivars

So-Hee Lee and Syng-Ook Lee

Department of Food Science and Technology, Keimyung University

ABSTRACT Lentils (*Lens culinaris*) have been gaining increasing attention recently as a top five superfood, as they are high in protein and other essential nutrients, including folate, iron, potassium, and various antioxidants. In the present study, phenolic extracts from four different lentil cultivars (green, red, French, and beluga) were evaluated for their total phenolic contents and *in vitro* antioxidant activities. Total polyphenol and flavonoid contents of four different lentil extracts were 27.30~30.30 mg tannic acid equivalents (TAE)/g and 13.14~16.29 mg quercetin equivalents (QUE)/g, respectively. Beluga and red lentil extracts showed higher polyphenol contents than others ($P<0.05$), whereas there was no significant difference in flavonoid contents among the four lentil cultivars. RC_{50} values of the lentil extracts for DPPH radical, ABTS radical, and H_2O_2 were 57.42~64.49 $\mu\text{g/mL}$, 66.11~75.69 $\mu\text{g/mL}$, and 59.72~72.86 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Among the four lentil extracts, beluga lentil extract showed the most potent scavenging effect in all three reactive oxygen species (ROS) scavenging assays, and thus beluga extract was further tested for its inhibitory effect on early peroxidation of linoleic acid. The results showed that beluga lentil extract significantly inhibited linoleic acid peroxidation in a dose-dependent manner (concentration required for 50% reduction=222.76 $\mu\text{g/mL}$). In addition, beluga lentil extract showed a significant protective effect against alcohol-induced cytotoxicity in AML-12 cells (normal mouse hepatocyte cell line). Taken together, these results suggest that lentil extracts represent potential sources of natural antioxidants, and further studies will be necessary to determine their protective effects against oxidative stress *in vivo*.

Key words: lentil, polyphenols, antioxidant, reactive oxygen species

서 론

최근 들어 인간의 수명이 증가하고 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 노화 억제와 건강 유지를 위한 천연물 유래 생리활성 물질에 대한 연구가 광범위하게 진행되고 있다(1,2). 인체에는 산화 촉진물질(pro-oxidants)과 산화 억제 물질(anti-oxidants)들이 균형을 이루고 있으나 이 균형이 깨져서 세포 내에 산화 촉진물질이 과도하게 생기게 되면 세포에 해로운 영향을 끼치게 되는데, 이런 유해한 작용을 산화적 스트레스(oxidative stress)라 한다. 산화적 스트레스는 주로 산소에서 유래하는 superoxide anion radical, hydroxy radical, singlet oxygen 및 H_2O_2 등의 활성산소 종(reactive oxygen species; ROS)들에 의해 발생하며, 이들 활성산소는 산화력이 강하여 세포막 분해, 단백질 변성,

지방 산화 및 DNA 변형 등 생체 내에서 심각한 생리적인 장애를 유발한다(3). 저농도의 ROS는 세포 증식, 분화 그리고 신호전달에 중요한 역할을 하지만 여러 가지 환경적 요인이나 병리적 요인에 의해 ROS 생성과 이를 제거하는 항산화 반응 간의 균형이 무너져 ROS 생성 작용이 우세하게 되면 산화 스트레스를 유발하게 되고, 그로 인해 동맥경화, 당뇨병, 만성 염증, 자가면역질환 및 노화 등의 각종 질병이 유발 되는 것으로 알려져 있다. 생체 내에서는 superoxide dismutase(SOD), catalase 및 glutathione reductase 등의 항산화 효소와 glutathione과 thioredoxin 등과 같은 천연항산화제가 존재하여 산소 상해에 대한 방어기능을 하고는 있지만(4,5), 과도한 스트레스에 노출된 현대인의 복잡한 생활 속에서 더욱 효과적이고 안전한 식이성 항산화제의 필요성이 커지고 있다.

최근 슈퍼 푸드로 알려진 렌틸(*Lens culinaris* 또는 *L. esculenta*)은 콩과(Fabaceae)의 한해살이풀로 낮은 강수량과 건조한 기후에서도 잘 자라며, 주로 아프리카, 중동 및 남아시아에서 섭취하는 식품 중 하나로 씨앗의 색깔과 꽃의

Received 7 March 2016; Accepted 13 May 2016

Corresponding author: Syng-Ook Lee, Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea
E-mail: synglee@kmu.ac.kr, Phone: +82-53-580-5570

색깔은 품종에 따라 다르다(6). 저렴한 가격이지만 엽산, 티아민, 인, 철 및 다양한 종류의 비타민을 골고루 함유하고 있으며, 단백질과 섬유질의 함량이 높고 지방이 거의 없는 것으로 알려져 있다(7). 렌틸은 특히 높은 식이섬유소 함량으로 인해 혈당 유지에 도움을 줄 뿐만 아니라 혈압조절로 인한 심장혈관 기능의 조절이 보고되었으며(8), 이외에도 flavanol, flavonol, soybean saponins, phytic acid 및 condensed tannin 등의 유용성분들을 다량 함유하고 있다. 콩과 식물의 페놀산 함유량 및 항산화 활성의 비교 연구에서 완두콩, 렌틸, 병아리콩, 강낭콩 및 대두와 비교하였을 때 렌틸이 가장 높은 페놀산 함유 및 항산화 활성을 나타내는 것으로 확인되었다(9). 이처럼 렌틸의 영양성분 및 생리활성에 대한 연구는 종종 보고되고 있으나, 이들 결과는 대체로 특정 렌틸 품종에 제한적이다.

따라서 본 연구에서는 세계적으로 소비량이 많은 렌틸 품종 중 기존에 항산화 활성에 대한 연구가 이루어졌던 레드 렌틸과 그린 렌틸을 포함한 총 4종의 렌틸 품종으로부터 80% 메탄올(0.2% HCl 함유) 추출물을 제조하고, 이들 추출물의 *in vitro* 항산화 활성을 비교 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

DMEM/F-12 medium, insulin-transferrin-selenium (ITS)은 Gibco BRL사(Grand island, NY, USA)에서 구입하였으며, fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA와 antibiotics(penicillin/streptomycin)는 Welgene사(Gyeong-san, Korea)에서 구입하였다. 특별한 언급이 없는 한 그 밖의 분석용 시약 및 유기용매는 Sigma Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

시료 제조

본 실험에 사용한 렌틸은 (주)바른에프엔비(Yongin, Korea)에서 그린(green), 레드(masoor dal red), 프렌치(French) 렌틸을 구입하였으며, 벨루가(beluga) 렌틸은 Zürsun Idaho Heirloom Beans(Twin Falls, ID, USA)에서 구입하였다. 각 렌틸은 페놀화합물의 함량을 높이기 위해 Aguilera 등(10)의 방법을 응용하여 추출하였으며 제조과정은 다음과 같다. 렌틸을 세척, 건조, 분쇄하여 0.2% HCl이 함유된 80%(w/v) 메탄올을 10배량 가하고 24시간 동안 진탕 배양하여 3회 반복한 후 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 3, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA)를 사용하여 여과하고 55°C에서 rotary vacuum evaporator(UNI TRAP UT-1000, Eyela, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후에 동결 건조하였으며, 건조물은 분말 상태로 -20°C에서 보관하면서 각 실험에 사용하였다.

총폴리페놀 함량

총폴리페놀 함량 분석방법으로 널리 사용되고 있는 Folin-Denis법(11)을 응용하여 측정하였다. 즉 적절히 희석한 각 추출물 시료 용액에 2배로 희석한 Folin 시약을 동량 첨가하고 잘 혼합하여 3분간 방치한 후 시료와 동량의 10% Na₂CO₃를 서서히 가하였다. 이 혼합액을 1시간 동안 방치한 후 UV/visible spectrophotometer(UVIKON 922, Kontron, Augsburg, Germany)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총폴리페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하여 tannic acid equivalents(mg TAE/g extract)로 나타내었다.

총플라보노이드 함량

총플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등(12)의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료 용액 100 µL를 80% 에탄올 900 µL에 희석한 후 100 µL를 취하고, 10% aluminum nitrate와 1 M potassium acetate를 함유하는 80% 에탄올 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하여 quercetin equivalents(QUE mg/g extract)로 나타내었다.

α, α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거 활성

DPPH 라디칼의 소거 활성은 Blois(13)의 방법에 따라 각 시료의 DPPH 라디칼에 대한 환원력을 측정하였다. 각 추출물을 농도별로 99% 메탄올에 녹인 후 800 µL를 취하여 메탄올에 녹인 DPPH 용액(0.15 mM) 200 µL와 혼합하여 30분 경과 후에 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 라디칼 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는 데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위하여 Trolox를 사용하였다.

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) 라디칼 소거 활성

ABTS 라디칼 소거 활성은 ABTS⁺· cation decolorization assay 방법(14)에 따라 시행하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺·을 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이 0.70(±0.02)이 되게 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)으로 희석하였다. 희석된 용액 990 µL에 추출물 10 µL를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 라디칼 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는 데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위하여 Trolox를 사용하였다.

Hydrogen peroxide 소거 활성

Lee 등(15)의 방법에 따라 96 well micro plate에 PBS 100 μ L와 물에 녹인 시료 20 μ L를 넣고 1 mM H₂O₂를 가하여 5분 방치한 다음, 1.25 mM ABTS 30 μ L와 PBS에 녹인 1 U/mL peroxidase 30 μ L를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성 비교를 위하여 ascorbic acid를 사용하였다.

Linoleic acid 산화방지 효과

우선 linoleic acid(25.2 mg/mL in absolute alcohol), 30% ammonium thiocyanate 및 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 각각 조제하여 반응기질로 사용하였다. Linoleic acid 기질용액 4 mL와 물에 녹인 각 시료용액 4 mL를 tube에 넣고 혼합한 후 phosphate buffer 8 mL와 absolute alcohol 4 mL를 가하여 cap을 한 후 40°C에서 100 rpm으로 24시간 incubation 하여 ferric thiocyanate (FTC) 법으로 각 시료의 linoleic acid에 대한 산화방지 효과를 측정하였다. 이때 활성의 비교를 위하여 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxyanisole)를 시료농도의 1/10이 되도록 첨가하여 같은 방법으로 항산화 효과를 측정하였다. FTC법에 의한 항산화 효과는 Nakatani와 Kikuzaki(16)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 linoleic acid 반응기질용액 100 μ L를 시험관에 취하고 75% 에탄올 9.7 mL, 30% ammonium thiocyanate 100 μ L, 20 mM ferrous chloride 100 μ L를 순서대로 혼합하여 정확히 3분간 방치한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포배양 및 알코올에 대한 간세포 보호 효과

마우스 유래의 정상 간세포인 AML-12(ATCC CRL-2254) 세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였으며, 세포는 10% FBS, 1% ITS, 1% antibiotics(penicillin/streptomycin), dexamethasone(40 ng/mL)을 함유하는 DMEM/F-12 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다. 알코올로 인한 세포독성으로부터 렌틸 추출물의 간세포 보호 효과를 알아보기 위하여 AML-12 세포를 2 \times 10⁴ cells/well의 밀도로 96-well plate에 분주하고 24시간 배양 후, 680 μ M 알코올과 농도별 렌틸 추출물을 24시간 처리하였다. 그 후 MTT 시약(2.5 μ g/mL)을 각 well에 20 μ L씩 첨가하여 3시간 배양한 다음, 상층액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan 결정을 dimethyl sulfoxide로 용해해 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 간세포 보호 효과는 알코올 무처리군의 생존율을 기준으로 각 처리군의 상대적인 세포생존율(cell viability)을 평가하여 계산하였다.

통계 처리

모든 데이터는 최소 3번 반복하여 평균과 표준오차(mean \pm SEM)로 나타내었으며, 통계 분석에는 SPSS Statistics

22(Ver. 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)가 사용되었다. 또한, 그룹 간의 유의성 차이 검증에는 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 사용하였으며, Scheffe's multiple range test 방법을 통한 사후 검증을 시행하였다. 두 그룹 사이의 비교에는 t-test를 사용하였으며, 유의확률(P value)이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량

천연 폴리페놀성 화합물은 식물체에 널리 분포된 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxyl(OH) 기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하며, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 이 중 플라보노이드류 화합물은 2개의 방향족 고리를 포함한 3개의 링이 결합한 구조(C6-C3-C6)로 각 링 내부의 작용기에 의해 항산화 활성을 가지는 화합물이다. 플라보노이드류 화합물은 다양한 과채류뿐만 아니라 완두콩, 대두 및 강낭콩과 같은 콩과류에서도 다량 발견되며, 항산화제로의 역할뿐만 아니라 항균, 항알레르기 및 항혈전 등의 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(17).

본 실험에서는 품종별 렌틸 추출물에 존재하는 총폴리페놀의 함량과 총플라보노이드 함량을 각각 tannic acid와 quercetin을 기준물질로 하여 측정하였다(Table 1). Tannic acid로 환산한 4종 렌틸의 총폴리페놀 함량은 27.30~30.30 mg TAE/g 범위로 나타났으며, 벨루가와 레드 렌틸 추출물이 다른 두 종에 비해 유의적으로 높은 함량을 보인 반면에 그린 렌틸 추출물이 가장 낮은 폴리페놀 함량을 보였다. Khan 등(18)의 연구에 따르면 유전자형별 faba bean의 총폴리페놀 함량은 5.84~11.43 mg TAE/g으로 나타났으며, 아세톤을 이용하여 추출물을 제조한 Fratianni 등(19)의 연구에서는 렌틸(Colliano 품종) 추출물이 1.59 mg GAE/g, grass pea는 0.21 mg GAE/g, chickpea는 0.18 mg GAE/g으로 나타났다. 한편, 본 연구와 유사한 추출방법을 사용하

Table 1. Content of total polyphenols and flavonoids in phenolic extracts from four lentil cultivars

Cultivar	Total polyphenols (mg TAE ¹⁾ /g extract)	Total flavonoids (mg QUE ²⁾ /g extract)
Green lentil	27.30 \pm 0.01 ^{c3)}	16.29 \pm 0.71
Red lentil	30.30 \pm 0.55 ^a	14.75 \pm 0.93
French lentil	28.91 \pm 0.25 ^b	13.14 \pm 0.81
Beluga lentil	30.21 \pm 0.42 ^a	15.99 \pm 1.11

¹⁾Tannic acid equivalent.

²⁾Quercetin equivalent.

³⁾Each value is mean \pm SEM (n \geq 3) and different superscripts (a-c) in the same column are significantly different at P<0.05 by Scheffe's multiple range test.

여 다양한 품종의 레드 렌틸 추출물을 제조한 Zhang 등(20)의 연구 결과에서는 본 연구 결과와 비슷한 총폴리페놀 함량을 보였다.

Quercetin으로 환산한 4종 렌틸의 총플라보노이드 함량은 13.14~16.29 mg QUE/g으로 나타났다. Khan 등(18)의 연구에 따르면 유전자형별 faba bean의 총플라보노이드 함량은 0.083~0.168 mg QUE/g으로 보고되었으며, Oomah 등(21)은 품종별 메밀 씨앗과 깍지의 플라보노이드 함량을 각각 371.5~407.5 mg/100 g과 1,212.8~1,463.7 mg/100 g으로 보고하였다. Amarowicz 등(22)과 Zhang 등(20)은 레드 렌틸로부터 catechin, epicatechin, quercetin 및 kaempferol 등 다양한 플라보노이드류를 포함한 많은 종류의 폴리페놀성 화합물들을 분리하였으며, 이 중 quercetin, kaempferol, catechin 및 이들의 배당체가 특히 많이 존재하는 것으로 나타났다.

이들 결과를 종합해 볼 때 여러 콩과 식물보다 렌틸의 폴리페놀 함량이 상대적으로 높은 것을 알 수 있으며, 추출용매에 따라 폴리페놀화합물의 함량에 있어 큰 차이를 보인다는 것을 알 수 있었다. 또한, 여러 가지 콩류 및 곡물류의 플라보노이드 함량과 비교해 볼 때 4종 렌틸의 플라보노이드 함량은 비교적 높은 것으로 확인되었다.

DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성

DPPH는 비교적 안정한 자유 라디칼(free radical)로 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 짙은 자색의 라디칼 수용액이 탈색되는데, 이것은 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는 데 많이 이용되고 있다. ABTS 또한 potassium persulfate를 암소에 방지하면 $ABTS^+ \cdot$ 이 생성되는데 추출물의 항산화력에 의해 $ABTS^+ \cdot$ 이 소거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색된다. 이처럼 $ABTS^+ \cdot$ 탈색 반응은 이미 생성된 자유 라디칼의 제거 정도를 흡광도 값으로 나타내어 $ABTS^+ \cdot$ 의 소거 활성능을 측정하는 방법으로, $ABTS^+ \cdot$ 탈색 반응이 1분 안에 종료되므로 단시간에 측정할 수 있고 소수성과 친수성 모두에 적용 가능하다는 장점이 있다.

DPPH 라디칼 소거 활성은 50% 라디칼 소거율을 나타내는 RC_{50} 과 Trolox equivalent(TE)로 나타내었으며, 4종 렌틸 추출물의 소거 활성은 Table 2에 나타내었다. RC_{50} 값을 기준으로 벨루가 렌틸(57.42 μ g/mL), 레드 렌틸(61.11 μ g/mL), 프렌치 렌틸(62.60 μ g/mL), 그린 렌틸(64.49 μ g/mL) 순으로 라디칼 소거 활성이 높음($P < 0.05$)을 확인할 수 있었으며, 이는 총폴리페놀 함량 결과에서 품종 간 차이를 보였던 경향과 같은 경향이였다. TE 결과 역시 벨루가 렌틸 추출물이 가장 높은 값을 보여 DPPH 라디칼 소거 활성이 가장 큰 것으로 나타났다. 반면, RC_{50} 값 결과와는 달리 나머지 3종의 렌틸 품종 간의 유의적인 차이는 없었다. 총폴리페놀 함량에서 차이를 보인 것과 같이 DPPH 라디칼 소거 활성 역시 레드 렌틸 아세톤 추출물($RC_{50} > 100$ μ g/mL)에 비해

Table 2. Scavenging effects of Trolox and phenolic extracts from four lentil cultivars on α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl radicals (DPPH \cdot)

Cultivar	RC_{50}^1 (μ g/mL)	mmol TE 2 /g extract
Green lentil	64.49 \pm 0.90 ^{b3)}	82.16 \pm 0.34 ^b
Red lentil	61.11 \pm 1.71 ^c	83.36 \pm 0.85 ^b
French lentil	62.60 \pm 1.49 ^a	83.50 \pm 0.51 ^b
Beluga lentil	57.42 \pm 0.81 ^d	88.86 \pm 0.25 ^a
Trolox	5.53 \pm 0.02	—

¹⁾Concentration required for 50% reduction of DPPH \cdot at 30 min after starting the reaction.

²⁾Trolox equivalent.

³⁾Each value is mean \pm SEM ($n \geq 3$) and different superscripts (a-d) in the same column are significantly different at $P < 0.05$ by Scheffe's multiple range test.

본 연구에서 사용된 추출물들이 높은 활성을 보였다(22). Kim 등(23)은 DPPH 라디칼 소거에 대한 서리태 추출물의 RC_{50} 값을 1.5 mg/mL로 보고하고 있으며, 이는 벨루가 렌틸의 소거 활성보다 약 26배나 낮은 활성이다.

ABTS 라디칼 소거 활성 또한 50% 라디칼 소거를 나타내는 RC_{50} 과 TE로 나타내었으며, 그 결과를 Table 3에 표시하였다. RC_{50} 값을 기준으로 벨루가 렌틸(66.11 μ g/mL), 레드 렌틸(67.97 μ g/mL), 프렌치 렌틸(70.82 μ g/mL), 그린 렌틸(75.69 μ g/mL) 순으로 라디칼 소거 활성이 높았으며, TE 결과도 같은 경향을 보였다. 4종의 렌틸 중 특히 벨루가 렌틸이 두 가지 형태의 라디칼에 대한 소거 활성이 가장 뛰어나며, 레드 렌틸이 다음으로 높은 소거 활성을 보였다. Ademiluyi와 Oboh(24)의 연구에서 캐롭, 땅콩 및 대두의 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정된 결과, 각각 6.82 mM TE/100 g, 6.78 mM TE/100 g, 6.17 mM TE/100 g으로 나타났다. 같은 방법으로 환산했을 때 벨루가 렌틸의 ABTS 라디칼 소거 활성은 45.04 mM TE/100 g으로 확인되며, 이것은 캐롭에 비해 약 7배 높은 활성인 것을 알 수 있다.

Hydrogen peroxide 소거 활성

산소의 환원 대사물질인 H_2O_2 는 다양한 외부요소나 정상 세포의 미토콘드리아와 peroxisome에서 형성되는데, DNA

Table 3. Scavenging effects of Trolox and phenolic extracts from four lentil cultivars on 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radicals ($ABTS^+ \cdot$)

Cultivar	RC_{50}^1 (μ g/mL)	mmol TE 2 /g extract
Green lentil	75.69 \pm 2.71 ^{a3)}	0.40 \pm 0.01 ^c
Red lentil	67.97 \pm 2.08 ^b	0.44 \pm 0.01 ^{ab}
French lentil	70.82 \pm 2.01 ^{ab}	0.42 \pm 0.01 ^{bc}
Beluga lentil	66.11 \pm 1.71 ^b	0.45 \pm 0.01 ^a
Trolox	7.67 \pm 0.23	—

¹⁾Concentration required for 50% reduction of $ABTS^+ \cdot$ at 30 min after starting the reaction.

²⁾Trolox equivalent.

³⁾Each value is mean \pm SEM ($n \geq 3$) and different superscripts (a-c) in the same column are significantly different at $P < 0.05$ by Scheffe's multiple range test.

Table 4. Scavenging effects of ascorbic acid and phenolic extracts from four lentil cultivars on hydrogen peroxide (H₂O₂)

Cultivar	RC ₅₀ ¹⁾ (µg/mL)
Green lentil	72.86±4.00 ^{a2)}
Red lentil	61.65±4.58 ^{bc}
French lentil	68.51±2.40 ^{ab}
Beluga lentil	59.72±3.08 ^c
Ascorbic acids	8.27±0.10

¹⁾Concentration required for 50% reduction of H₂O₂ at 5 min after starting the reaction.

²⁾Each value is mean±SEM (n≥3) and different superscripts (a-c) in the same column are significantly different at P<0.05 by Scheffe's multiple range test.

및 단백질 손상을 유발하거나 불포화지방산과 같은 생체막의 구성성분을 공격하여 과산화지질을 생성하는 것으로 알려져 있다(25). Peroxidase의 기질인 ABTS를 이용하여 각 시료의 H₂O₂에 대한 소거 활성을 측정하였다.

각 추출물의 H₂O₂ 소거 활성은 RC₅₀값으로 표시하였으며, 그 결과 벨루가 렌틸(59.72 µg/mL), 레드 렌틸(61.65 µg/mL), 프렌치 렌틸(68.51 µg/mL), 그린 렌틸(72.86 µg/mL) 순으로 소거 활성이 높게 나타났으며, 이것 역시 벨루가 렌틸이 4종의 렌틸 중 유의적으로 가장 높은 소거 활성을 보였다(Table 4). Lee 등(15)은 앞선 연구에서 ROS 소거 활성과 폴리페놀 함량과의 비례적 상관관계가 있음을 보고하였으며, 본 연구에서도 총폴리페놀 함량에 비례하여 그 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

Linoleic acid에 대한 항산화 효과

지질산화 초기에 발생하는 과산화물은 ferrous chloride와 반응하여 빨간색에 가까운 ferric chloride 색소를 생성하게 되며, 지질산화가 계속 진행되면 malonaldehyde와 같은 저분자의 화합물이 생성되는데 이것은 TBA와 결합하여 빨간색의 화합물을 형성한다. 이처럼 FTC법은 산화 초기에 생성되는 과산화물의 양을 측정하여 지질산화의 정도를 측정하게 된다. 따라서 본 실험에서는 불포화지방산인 linoleic acid를 기질로 하여 렌틸 추출물의 산화방지 효과를 평가하였다.

상기 3가지 항산화 실험에서 4종의 렌틸 추출물 중 항산화 활성이 가장 높았던 벨루가 렌틸을 이용하여 linoleic acid 산화에 대한 산화방지 효과를 조사하였다. 초기 과산화물을 측정할 결과 대조군의 초기 과산화물 생성 정도를 100%로 보았을 때 합성 항산화제인 BHA를 처리하였을 때 22.59%의 생성을 보였으며, 벨루가 렌틸 추출물은 농도 유의적으로 초기 과산화물가의 생성을 저해시켰다(Fig. 1). 벨루가 렌틸 추출물 500 µg/mL에서는 대조군 대비 29.05%의 초기 과산화물이 생성되었으며, RC₅₀은 222.76 µg/mL로 확인되었다. 이 결과로부터 벨루가 렌틸 추출물이 linoleic acid의 초기산화를 효과적으로 억제하고 지연시키는 것을 알 수 있으나, 라디칼 소거 활성의 결과와 비교해 볼 때 상대

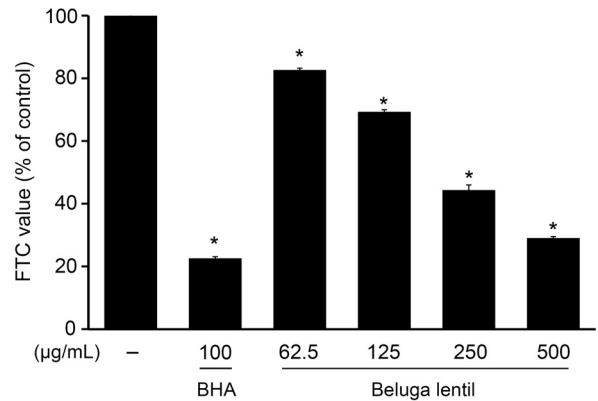


Fig. 1. Inhibitory effects of BHA and phenolic extracts from four lentil cultivars on linoleic acid peroxidation. Linoleic acid emulsion was incubated at 40°C for 24 h with or without beluga lentil extract and FTC value was measured. All results are expressed as mean±SEM (n≥3). *P<0.001 vs. the vehicle control.

적으로 높은 RC₅₀을 보이는 것으로 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 phenol기에 존재하는 OH기가 DPPH나 ABTS 라디칼과 linoleic acid의 산화로 인해 생성되는 라디칼에 작용하는 기작에서 차이를 보인다는 보고(26)와 유사한 결과이다.

알코올에 대한 간세포 보호 효과

알코올 대사는 주로 마이크로솜과 미토콘드리아에서 일어나며, 이들 세포 소기관에서 진행되는 알코올 대사과정에서 많은 양의 활성산소종과 활성질소종, 즉 산화적 스트레스가 발생한다(27). 간은 알코올 대사의 대부분이 이루어지는 장기로 알코올과 그 대사산물들로 인해 발생하는 산화적 스트레스에 의해 특히 많은 손상을 받게 되며, 산화적 스트레스의 발생은 알코올에 의한 간 손상의 주요 기전으로 알려져 있다.

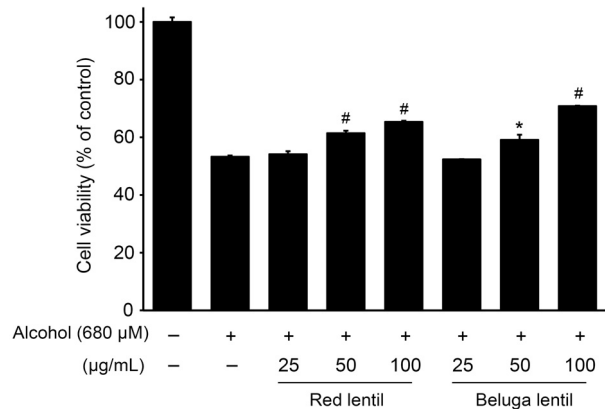


Fig. 2. Protective effect of phenolic extracts from red and beluga lentils against alcohol-induced cytotoxicity in AML-12 cells. After 24 h treatment with different concentrations of each lentil extract, the media were replaced with new media containing alcohol and the cells were incubated for another 24 h. Cell viability was then measured by an MTT assay. All results are expressed as mean±SEM (n≥3). *P<0.05 and #P<0.001 vs. the alcohol control.

따라서 앞서 항산화 효과가 우수했던 벨루가와 레드 렌틸 추출물을 이용하여 알코올의 세포독성에 대한 간세포 보호 효과를 조사하였다. 우선 AML-12 세포에 대한 각 렌틸 추출물의 세포독성 정도를 측정해 본 결과, 두 가지 렌틸 추출물 모두 본 실험에서 사용된 25~100 µg/mL 농도 범위에서 세포독성이 전혀 관찰되지 않았다(data not shown). 한편, 24시간 알코올 처리로 인해 AML-12 세포의 생존율은 52.54% 정도로 낮아졌으나, 각 렌틸 추출물을 50과 100 µg/mL로 처리한 세포의 경우 유의적인 세포생존율 증가를 보였다(Fig. 2). 그중 특히 간세포 보호 효과가 상대적으로 뛰어난 벨루가 렌틸은 100 µg/mL의 농도에서 71.02%의 세포생존율을 보였으며, 이 결과들을 통해 세포실험에서도 렌틸 추출물이 산화적 손상을 유발하는 것으로 알려진 알코올에 의한 세포독성으로부터 보호 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 렌틸을 이용한 새로운 기능성 소재의 개발에 우선하여 세계적으로 소비량이 비교적 많은 벨루가, 레드, 그린, 프렌치 렌틸을 연구 소재로 선정하고, 0.2% HCl을 함유한 메탄올을 이용하여 추출물을 제조한 후 이들의 항산화 활성을 조사하였다. 총폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 27.3~30.3 mg TAE/g과 13.14~16.29 mg QUE/g으로 다양하게 나타났으며, 그중 벨루가와 레드 렌틸이 상대적으로 높은 총폴리페놀 함량을 보였다. DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성 및 H₂O₂ 소거 활성은 총폴리페놀 함량이 상대적으로 높았던 벨루가와 레드 렌틸이 다른 품종에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였으며, 항산화 활성 및 폴리페놀 함량과의 비례적 상관관계가 있음을 확인할 수 있었다. ROS 소거 활성이 가장 높았던 벨루가 렌틸을 이용하여 linoleic acid에 대한 과산화 억제 효과를 FTC법으로 조사한 결과, 62.5~500 µg/mL에서 농도 의존적으로 유의적인 산화억제 효과를 보였으며 RC₅₀은 222.76 µg/mL로 확인되었다. 또한, 벨루가 및 레드 렌틸 추출물은 산화적 스트레스 발생을 통해 간세포 손상을 유발하는 것으로 알려진 알코올의 세포독성으로부터 우수한 간세포 보호 효과를 나타내었다. 따라서 향후 추가적인 세포실험과 동물실험을 통한 렌틸의 항산화 활성 검증 및 항산화 기전에 관한 연구가 필요할 것으로 생각되며, 이를 비롯한 다양한 생리활성에 대한 연구들이 이루어진다면 기능성 소재로서 렌틸의 산업적 응용이 활발해질 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부 기본연구지원사업의 지원에 의해 수행되었습니다(NRF-2014R1A1A2059385).

REFERENCES

- Goldberg I. 1994. *Functional foods*. Chapman & Hall Press, New York, NY, USA. p 3-550.
- Nicoletti M. 2012. Nutraceuticals and botanicals: overview and perspectives. *Int J Food Sci Nutr* 63(S1): 2-6.
- Nam SY, Hong JT, Yun YW, Ahn B, Lee BJ. 2004. Occurrence and measurement of reactive oxygen species in biological systems. *J Vet Med Biotechnol* 5: 5-14.
- Choi DS, Go HY. 1995. *Chemistry of functional food*. Ji-Gu Publishing Co., Paju, Korea. p 78-79.
- Kim TS, Kang SJ, Park WC. 1999. Changes in antioxidant and antioxidant enzymes activities of soybean leaves subjected to water stress. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42: 246-251.
- Thavarajah D, Thavarajah P, Sarker A, Vandenberg A. 2009. Lentils (*Lens culinaris* Medikus Subspecies *culinaris*): a whole food for increased iron and zinc intake. *J Agric Food Chem* 57: 5413-5419.
- Hefhawry TH. 2011. Effect of processing methods on nutritional composition and anti-nutritional factors in lentils (*Lens culinaris*). *Ann Agric Sci* 56: 57-61.
- Galleano M, Pechanova O, Fraga CG. 2010. Hypertension, nitric oxide, oxidants, and dietary plant polyphenols. *Curr Pharm Biotechnol* 11: 837-848.
- Xu BJ, Yuan SH, Chang SKC. 2007. Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *J Food Chem* 72: S167-S177.
- Aguilera Y, Dueñas M, Estrella I, Hernández T, Benitez V, Esteban RM, Martín-Cabrejas MA. 2010. Evaluation of phenolic profile and antioxidant properties of Pardina lentil as affected by industrial dehydration. *J Agric Food Chem* 58: 10101-10108.
- Singleton VL. 1981. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv Food Res* 27: 149-242.
- Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- 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.
- Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung Island. *Korean J Food Sci Technol* 37: 233-240.
- Nakatani N, Kikuzaki H. 1987. A new antioxidative glucoside isolated from oregano (*Origanum vulgare* L.). *Agric Biol Chem* 51: 2727-2732.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* 46: 4113-4117.
- Khan MA, Ammar MH, Migdadi HM, El-Harty EH, Osman MA, Farooq M, Alghamdi SS. 2015. Comparative nutritional profiles of various faba bean and chickpea genotypes. *Int J Agric Biol* 17: 449-457.
- Fратиани F, Cardinale F, Cozzolino A, Granese T, Albanese D, Matteo MD, Zaccardelli M, Coppola R, Nazzaro F. 2014. Polyphenol composition and antioxidant activity of different

- grass pea (*Lathyrus sativus*), lentils (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*) ecotypes of the Campania region (Southern Italy). *J Funct Foods* 7: 551-557.
20. Zhang B, Deng Z, Ramdath DD, Tang Y, Chen PX, Liu R, Liu Q, Tsao R. 2015. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chem* 172: 862-872.
 21. Oomah BD, Mazza G. 1996. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. *J Agric Food Chem* 44: 1746-1750.
 22. Amarowicz R, Estrella I, Hernández T, Dueñas M, Troszyńska A, Agnieszka K, Pegg RB. 2009. Antioxidant activity of a red lentil extract and its fractions. *Int J Mol Sci* 10: 5513-5527.
 23. Kim JP, Yang YS, Kim JH, Lee HH, Kim ES, Moon YW, Kim JY, Chung JK. 2012. Chemical properties and DPPH radical scavenging ability of sword bean (*Canavalia gladiata*) extract. *Korean J Food Sci Technol* 44: 441-446.
 24. Ademiluyi AO, Oboh G. 2012. Attenuation of oxidative stress and hepatic damage by some fermented tropical legume condiment diets in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Asian Pac J Trop Med* 5: 692-697.
 25. Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
 26. Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (Omija) seed. *Korean J Food Sci Technol* 32: 928-935.
 27. Das SK, Vasudevan DM. 2007. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci* 81: 177-187.