

가열처리에 의한 심황색소의 화학적 특성, 산화방지 활성 및 세포독성 변화

송이슬 · 강스미 · 홍정일*

서울여자대학교 자연과학대학 식품응용시스템학부

Changes in chemical properties, antioxidant activities, and cytotoxicity of turmeric pigments by thermal process

Eiseul Song, Smee Kang, and Jungil Hong*

Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University

Abstract Turmeric oleoresin, extracted from the rhizome of *Curcuma longa* L., is a widely-used natural food colorant. Curcuminoids, the major pigments in turmeric, which include curcumin, demethoxycurcumin (DMC), and bisdemethoxycurcumin (BMC), possess various physiological activities. In the present study, changes in the chemical properties, antioxidant activities, and cytotoxicity of turmeric pigments upon heating were investigated. Color intensity of turmeric was significantly reduced after heating. Residual levels of curcumin, DMC, and BMC after 15 min of heating at 95°C were 11.9, 37.4, and 77.3% respectively. Scavenging activities of turmeric against 2,2'-azobis-3-ethyl-benz-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH) peroxy radicals, and nitrite were significantly enhanced after heating, while 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity remained unaffected. Generation of H₂O₂ from turmeric was increased via thermal decomposition. Cytotoxicity of turmeric pigments against colon cancer and normal intestinal cells was reduced significantly after heating. The results indicate that thermal processing affects chemical properties and bioactivities of turmeric pigments. These effects should be considered during the processing of foods containing turmeric pigments.

Keywords: turmeric, curcuminoid, heating, antioxidant activity, cytotoxicity

서 론

심황색소(oleoresin turmeric)는 건조된 심황(*Curcuma longa* L.)의 뿌리 또는 뿌리줄기로부터 유기용매로 추출한 식용색소이다. 심황색소의 원료인 심황(강황 또는 turmeric)의 뿌리에는 diaryl-heptanoid, phenylpropanoid, monoterpene, sesquiterpene, triterpene, sterol 등의 물질이 함유되어 있으며(1) 이 중 diarylheptanoid의 일종인 쿠쿠미노이드가 심황의 노란색을 나타내는 주요 색소성분으로 알려져 있다(2).

심황색소 중의 쿠쿠미노이드류로서 쿠쿠민, 디메톡시쿠쿠민(demethoxycurcumin, DMC), 비스디메톡시쿠쿠민(bisdemethoxycurcumin, BMC) 등이 주요성분으로 알려져 있다(3). 이중 가장 많이 함유된 성분인 쿠쿠민은 세포신호전달체계에 관여하여 암세포 성장을 저해하고 세포사멸을 유도하는 결과를 비롯하여(4-6) 알츠하이머병의 예방효과를 포함한 다양한 생리활성에 대한 연구가 다수 보고되었다(7,8). DMC와 BMC 또한 항염효과, 항암효과 등의 연구가 활발히 진행됨에 따라(9-11) 심황색소의 생리활성을 기반으로 한 다양한 식품들이 개발되고 있다. 특히 심황색

소는 실제 절임 류, 소스 류, 카레 분 등에 첨가되는 천연 식품 원료로서 가공식품에 빈번히 사용되며, 최근에는 숙취해소제 및 건강 기능성식품에도 이용되고 있다.

심황색소 중의 노란색 결정성분인 쿠쿠미노이드는 구조적으로 2개의 페놀고리구조가 α , β -unsaturated carbonyl group에 의해 연결되어 있으며, 2개의 페놀고리구조에 각각 메톡실(methoxy)기를 가진 쿠쿠민, 하나만을 가진 DMC와 이를 가지고 있지 않은 BMC로 분류된다. 이들은 공통적으로 반응성이 강한 다이케톤(diketone)과 페놀고리구조로 인해 pH, 온도, 빛 조건 등 다양한 요인에 의해 안정성에 영향을 받는다고 보고되었다(12,13). 지금까지 여러 가공조건에 의한 쿠쿠민의 발색도의 감소 및 가열산물의 산화방지활성 평가 등에 대한 선행연구들이 보고 되었으나(14-16), 심황 자체 또는 쿠쿠민 화합물에 대한 직접적인 처리가 대부분이며 실제 식품에 빈번히 적용되는 심황색소에서의 가열처리에 의한 안정성을 비롯한 화학적 특성 변화 및 생리활성의 변화는 거의 연구된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 심황색소를 이용하여 식품 가공공정이나 조리과정 중에 빈번히 적용되는 가열처리를 통하여 3종의 쿠쿠미노이드인 쿠쿠민, DMC 및 BMC의 안정성의 변화를 측정하였으며 이에 따른 산화방지활성과 세포독성 등의 생리활성 변화를 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 세포주

심황색소(oleoresin turmeric, 심황색소로서 100%, 색가 6500 CU, 쿠쿠미노이드 40%)은 ES ingredients (Gunpo, Korea)에서 구

*Corresponding author: Jungil Hong, Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 01797, Korea
Tel: +82-2-970-5639
Fax: +82-2-970-5977
E-mail: hjil@swu.ac.kr
Received August 28, 2017; revised October 10, 2017;
accepted October 10, 2017

입하였다. HPLC 분석용 용매 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran; THF)은 J.T. Baker Co. (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Amresco (Solon, OH, USA)에서 구입하였다. 인간 형질전환 정상장관계 세포주 INT 407과 인간 대장암 세포주 HCT 116는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 분양 받았다. 이 외에 실험에 사용한 모든 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

심황색소 가열처리

심황색소를 증류수에 각 농도별로(40-640 µg/mL) 희석하고 0.5 mL씩 1.5 mL e-tube에 분주한 후 95°C의 블록히터(Block heater Type 17600, Thermoylone, Dubuque, IA, USA)에서 가열시간을 달리하여 처리하였다. 시료는 처리 후 즉시 얼음 위에서 냉각시켰고, 가열 중에 증발되는 수분을 고려하여 가열 전과 가열 후 무게 차이를 구한 후 이에 해당하는 증류수를 가하여 농도를 일정하게 유지하였다. 농도에 따른 색소의 파괴속도 변화를 평가하기 위해 모든 농도의 시료는 가열처리 후 40 µg/mL이 되도록 증류수로 희석하여 측정하였으며, 화학적 변화 및 산화방지 활성 변화에 대한 평가는 40 µg/mL의 농도에서 가열처리한 색소를 희석하여 사용하였다. 세포독성 평가를 위해서는 500 µg/mL 심황색소를 위와 동일한 방법으로 약 50% 파괴될 때까지 가열처리하였고 이를 무혈청(serum free) 배지에 농도별로 희석하여 세포에 처리하였다.

심황색소의 화학적 변화 분석

심황색소의 발색특성 변화는 마이크로플레이트판독기(Microplate reader Spectra Max M3, Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도와 400-800 nm에서 흡수 스펙트럼으로 분석하였다. 형광특성은 excitation 440 nm와 emission 535 nm 파장에서 분석하였으며 530 nm 이하의 빛은 차단하였다. 형광방출 스펙트럼의 변화는 각 시료를 440 nm에서 excitation 시킨 후 350-750 nm에서 측정하였다. 가열에 의한 쿠쿠민, DMC, BMC 등 각각의 쿠쿠미노이드량의 변화는 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)로 분석하였다. 이동상은 1% citric acid를 첨가한 THF-water (40:60, v/v)를 포화 수산화포타슘(KOH) 용액으로 pH 3으로 조절한 후 여과와 기포 제거처리를 하여 제조하였다. 분석컬럼은 HPLC packed column C18 (4.6 mm ID, 150 mm×5 µm, Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였으며, 30°C로 컬럼온도를 고정하고 20 µL의 시료를 주입하여 1 mL/min 유속으로 분석하였다.

심황색소의 산화방지활성 분석

DPPH 라디칼 소거활성을 측정하기 위해 각 조건에서 처리한 색소시료 100 µL와 0.8±0.1의 흡광도를 갖는 DPPH 메탄올 용액 100 µL를 혼합하여 상온의 암소에서 30분 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼을 생성시키기 위해 10 mM ABTS와 10 mM potassium persulfate를 각각 7.4:2.6 (v/v) 비율로 혼합한 후 상온의 암소에서 24시간 방치시켰다. 이후 734 nm에서 흡광도가 0.8±0.1이 되도록 증류수로 희석하고 각 시료 50 µL를 ABTS 용액 150 µL에 가해 상온의 암소에서 30분 동안 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염(nitrite) 소거활성은 0.1 N HCl로 희석한 NaNO₂ 25 µL에 시료 125 µL에 가한 후 37°C의 암소조건에서 60분 반응시킨 후 감소된 아질산염 양의 차이로 평가하였다. 이 반응액에 5% H₃PO₄로 희석한 1%

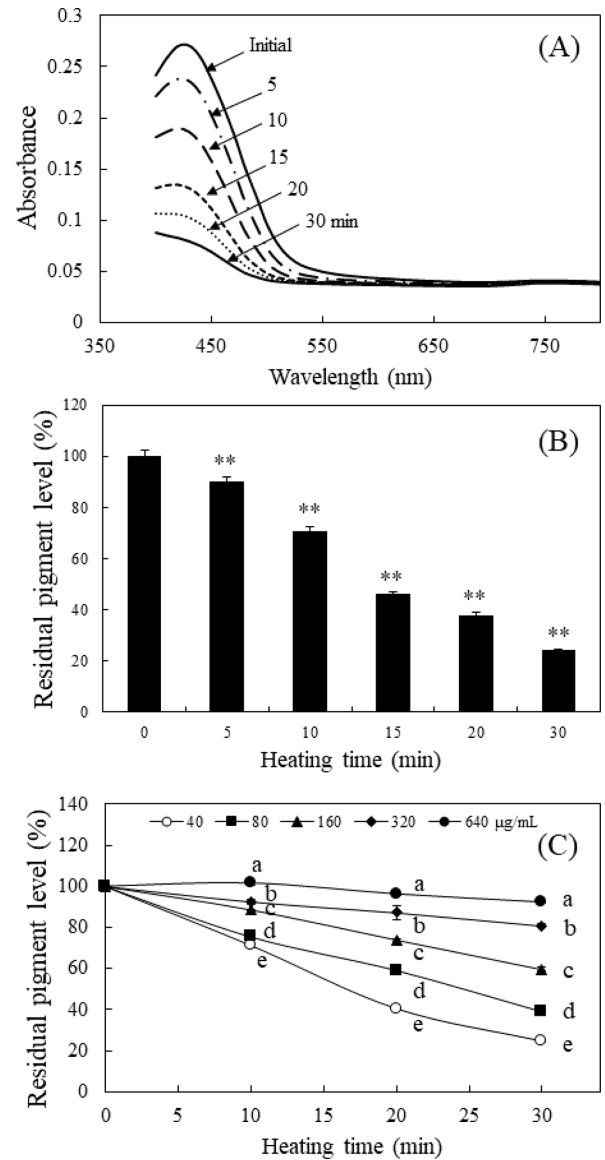


Fig. 1. Changes in absorbance properties of turmeric pigments by heating. Absorbance spectrum (A) and color intensity at 405 nm (B) of turmeric pigments (40 µg/mL) after heating at 95°C with different time (0-30 min) were analyzed. Effect of heating on different concentrations of turmeric pigments were also analyzed (C). Each value represents the mean±SD ($n=3-5$). Significant differences from control were determined by Student's *t*-test (** $p<0.01$). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test (in C).

설파닐아마이드(sulfanilamide) 50 µL를 가해 실온의 암소조건에서 5분간 반응시키고 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride 50 µL를 추가로 가해 10분간 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. AAPH peroxy 라디칼 소거활성 측정을 위하여, 인산완충생리식염수(phosphate buffered-saline, PBS, pH 7.4)로 희석한 1 µg/mL의 시료 60 µL와 0.5 µM fluorescein sodium salt 100 µL를 혼합한 후 20 mM AAPH peroxy 라디칼 40 µL를 가하여 반응을 개시 하였다. 각 시간별로 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 반응액의 형광변화를 측정하였으며 530 nm 이하의 차단 하였다. 모든 반응은 마이크로플레이트 판독기(Spectra Max M3)를 이용하여 측정하였다.

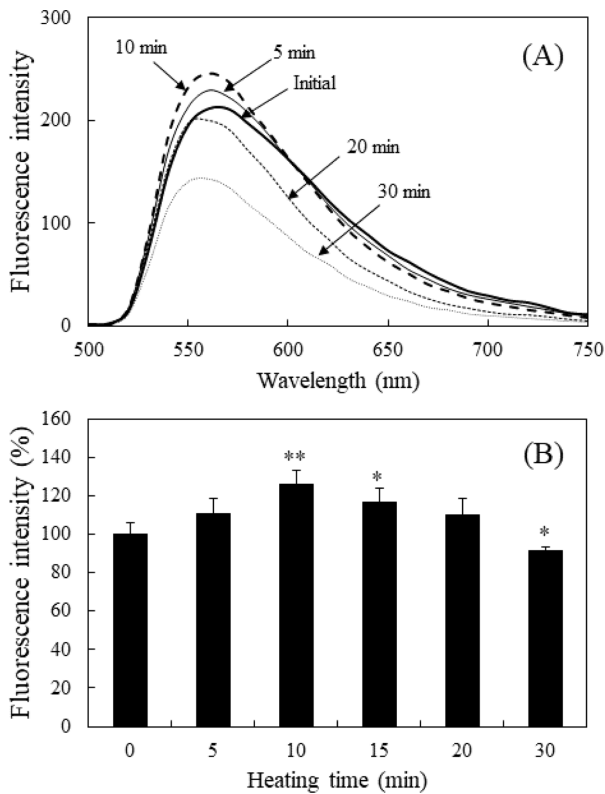


Fig. 2. Changes in fluorescence properties of turmeric pigments by heating. Changes in fluorescence spectrum (A) and fluorescence intensity (excitation 440 nm and emission 535 nm) (B) of turmeric pigments (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) after heating with different time at 95°C were analyzed. Each value represents the mean \pm SD ($n=3-5$). Significant differences from fresh control were determined by Student's *t*-test (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

과산화수소(H₂O₂) 측정

가열처리에 의한 심황색소로부터의 H₂O₂ 생성량 변화는 ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) assay를 일부 변형하여 측정하였다(17). 각 조건에서 처리된 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 심황색소를 PBS에 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 희석하고 37°C 암소에서 3시간동안 방치한 후 측정하였다. 세포배양액 상의 H₂O₂ 생성량은 각 시료를 세포주 HCT 116과 INT 407에 처리하고 정규배양 조건에서 24시간 배양한 후, 배지를 거두어 분석하였다. 각 반응액 또는 배양액 160 μL 에 100 μM xylenol orange, 200 mM D-소비톨(sorbitol), 및 500 μM ammonium ferrous sulfate이 혼합된 반응용액 40 μL 를 가해 상온에서 45분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포독성평가

심황색소의 세포독성은 인간 대장암 세포주인 HCT 116과 인간 정상장관계 세포주인 INT 407세포를 이용하여 평가하였다. 각 세포를 96 well plate에 well당 1.5×10^4 이 되게 분주하여 5% CO₂, 37°C, 습도 95% 조건의 배양기에서 24시간 배양한 후, serum free 배지에 희석된 시료용액 200 μL 로 교체하여 24시간 더 배양하였다. 이후 serum free 배지에 희석한 0.5 mg/mL MTT를 well당 100 μL 씩 가하여 약 30-40 분간 반응시키고, 살아있는 세포에 의해 생성된 MTT formazan을 DMSO 100 μL 로 용해시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(Spectra Max M3).

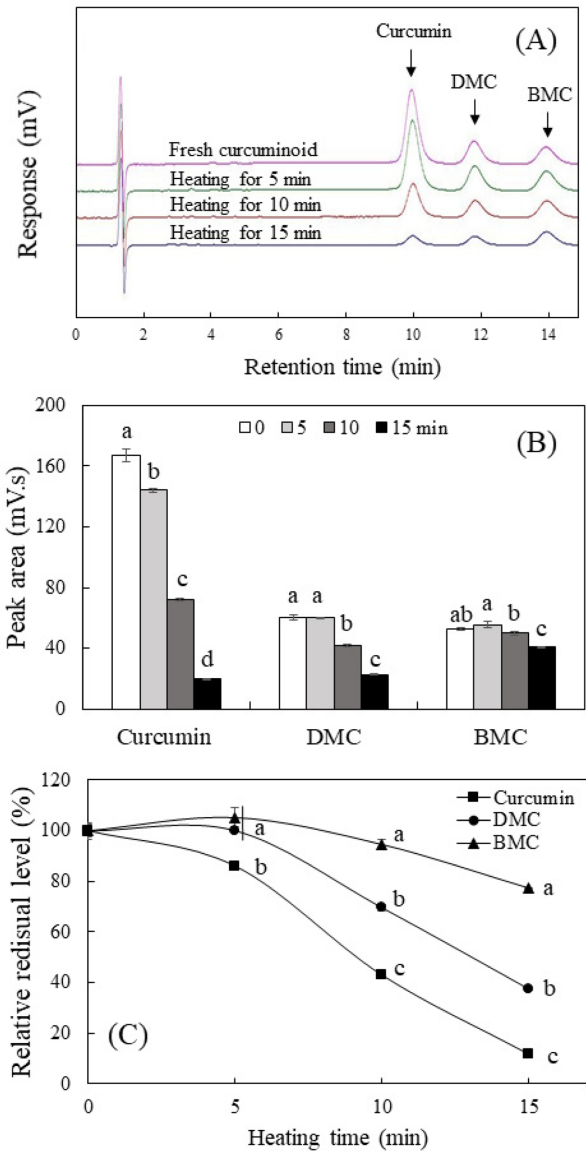


Fig. 3. Effect of heating on stability of individual curcuminoid in turmeric pigments. Changes in chromatograms (A) and residual levels (B) of each curcuminoid by heating at 95°C with different treatment time were analyzed using HPLC. Relative residual levels of each curcuminoid after heating were also calculated (C). Each value represents the mean \pm SD ($n=3$). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test.

통계처리

모든 실험결과는 3회 이상 분석하여 평균 \pm 표준편차로 나타냈고, 각 실험 군 별 유의차는 Student's *t*-test 또는 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)과 Tukey's HSD test를 실시하여 95와 99%의 유의수준에서 검정하였다. AAPH peroxy 라디칼의 반감기(half life)와 세포독성의 IC₅₀값은 각 결과로부터 직선부위에 대한 선형회귀식을 구하고 50% 라디칼 소거 또는 50% 세포가 생존하는 농도를 계산하였다.

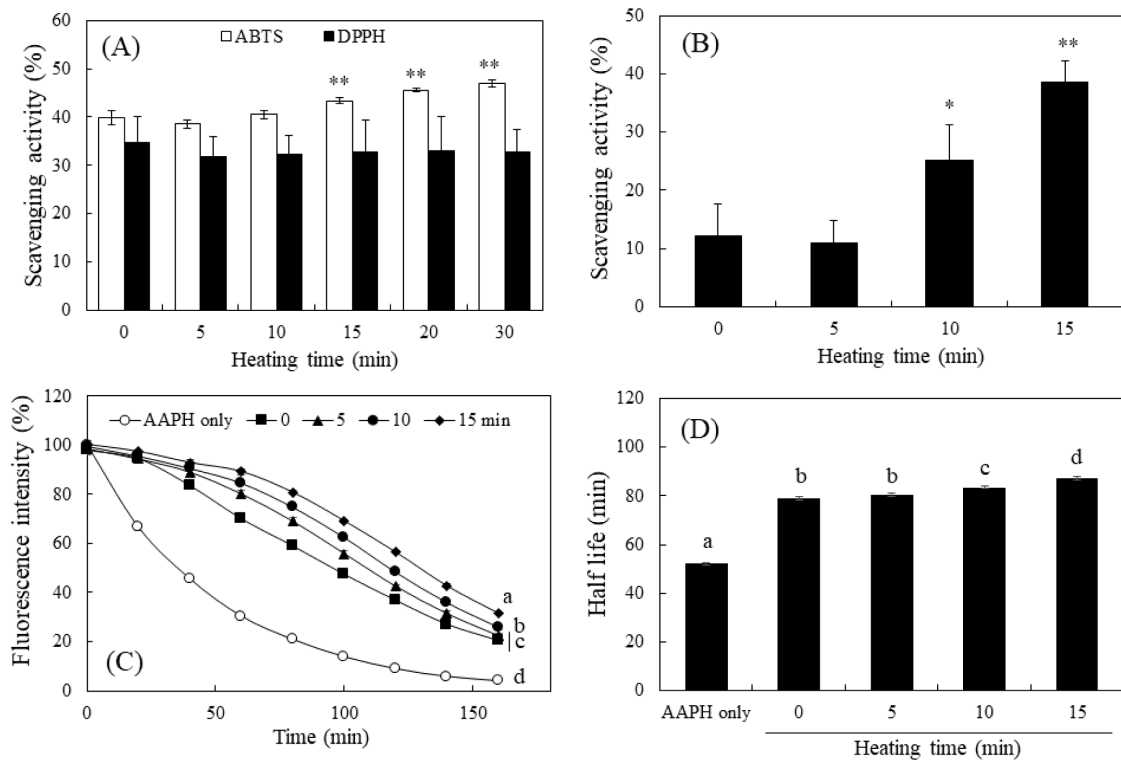


Fig. 4. Changes in antioxidant activities of turmeric pigments by heating. Scavenging activities against radicals of DPPH and ABTS (A), and nitrite (B) of turmeric pigments (40 $\mu\text{g/mL}$) after heating with different time at 95°C were analyzed. Changes in scavenging activities against AAPH radicals of turmeric pigments (1 $\mu\text{g/mL}$) (C) and half life of fluorescence (D) by heating were also analyzed. Each value represents the mean \pm SD ($n=5$ in A, $n=3$ in B-D). Significant differences from control were determined by Student's *t*-test (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ in A and B). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test (in C and D).

결과 및 고찰

가열처리에 의한 심황색소의 화학적 특성 변화

가열처리에 의한 심황색소의 화학적 변화를 흡광도와 형광특성을 통해 분석하였다. 95°C에서 각 시간별로 가열처리한 시료 (40 $\mu\text{g/mL}$)의 흡수 스펙트럼은 노란색에 특이적인 400-450 nm 부근에서 최대 흡광영역을 나타냈으며 가열시간이 증가할수록 피크(peak)를 포함한 해당영역의 흡광도가 전반적으로 저하되었다 (Fig. 1A). 이러한 현상은 이 영역에서 최대흡광도를 나타내는 쿠쿠미노이드류가 가열처리에 의해 파괴되고, 가열시간이 증가함에 따라 그 잔류량이 감소하였기 때문으로 판단된다. 따라서 405 nm에서 흡광도를 통하여 심황색소의 발색도의 변화를 측정하고, 가열시간에 의존적으로 발색도가 감소하였으며 15분 및 30분 가열처리 된 시료에서 각각 46.1과 23.9%의 잔류 발색도를 나타내었다 (Fig. 1B). 한편 가열에 의한 색소의 파괴속도는 농도가 증가할수록 지연되는 현상을 나타냈는데, 30분간 가열 시 40 $\mu\text{g/mL}$ 의 시료에서 색소 잔류량은 24.6%인 반면 640 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 90% 이상이 잔류하였다 (Fig. 1C). 본 결과는 심황색소가 함유된 식품의 가열처리 시 색소농도를 증가시킬 경우 가열에 의한 손실을 상당 부분 방지할 수 있음을 시사한다.

쿠쿠미노이드는 자체의 광화학적 특성으로 인해 형광을 나타내는 것으로 보고되었는데(18), 이에 가열처리가 미치는 심황색소의 형광특성 변화를 분석하였다. 440 nm파장에서 자극시킨 심황색소는 510-650 nm의 비교적 넓은 파장에서 형광방출이 일어났으며, 가열시간의 증가에 따라 방출파장의 피크가 다소 단파장 쪽으로 이동되는 경향을 나타냈다. 가열시간에 따른 형광도를 535

nm의 방출파장에서 측정하고, 가열 후 10분간 형광이 증가하다가 그 이후부터는 다시 감소하는 2단계적 변화양상을 나타냈다 (Fig. 2A and B). 가열시간의 증가에 따라 심황색소의 발색도가 일관되게 저하된 결과로부터 쿠쿠미노이드의 지속적인 파괴를 알 수 있었으며, 반면에 형광의 2단계적 변화양상은 가열 초기에 형광성 구조물이 생성되다가 계속되는 가열에 의해 해당 구조가 다시 파괴되기 때문으로 예측된다.

본 실험에 사용된 심황색소는 총 40.34%의 쿠쿠미노이드를 함유하고 있었으며, 본 HPLC 시스템에서 3종의 쿠쿠미노이드는 쿠쿠민, DMC 및 BMC 순으로 검출되었고 쿠쿠민, DMC 및 BMC가 각각 59.7, 21.5 및 18.8% (w/w)의 함량을 나타내었다 (Fig. 3). 각 쿠쿠미노이드에 의한 피크는 전반적으로 가열시간이 증가함에 따라 높낮이와 면적이 감소하는 양상을 나타내었다 (Fig. 3A). 가열처리를 하지 않은 색소와 비교하였을 때, 95°C에서 10분과 15분간 가열 시 쿠쿠민이 각각 56.8와 88.1%가 파괴되어 가열처리에 가장 민감하였으며, 15분간 가열 시 DMC는 62.57%, BMC는 22.73%가 파괴되어 3종의 쿠쿠미노이드 중 BMC가 가열에 의한 화학안정성이 가장 뛰어났다 (Fig. 3B and C). 이상의 결과는 페놀고리 구조 상의 메톡실기가 가열처리에 대한 쿠쿠미노이드의 구조적 안정성을 저하시키는 요인으로 작용하며, 또한 쿠쿠미노이드 분자의 전반적인 소수성 성질의 증가가 수용액 상태에서의 가열에 대한 저항성을 갖게 하기 때문으로 판단된다.

가열처리에 의한 심황색소의 산화방지활성 변화

가열처리에 따른 심황색소의 산화방지활성 변화는 DPPH, ABTS, AAPH peroxy radical 및 아질산염에 대한 소거능으로 평가하였

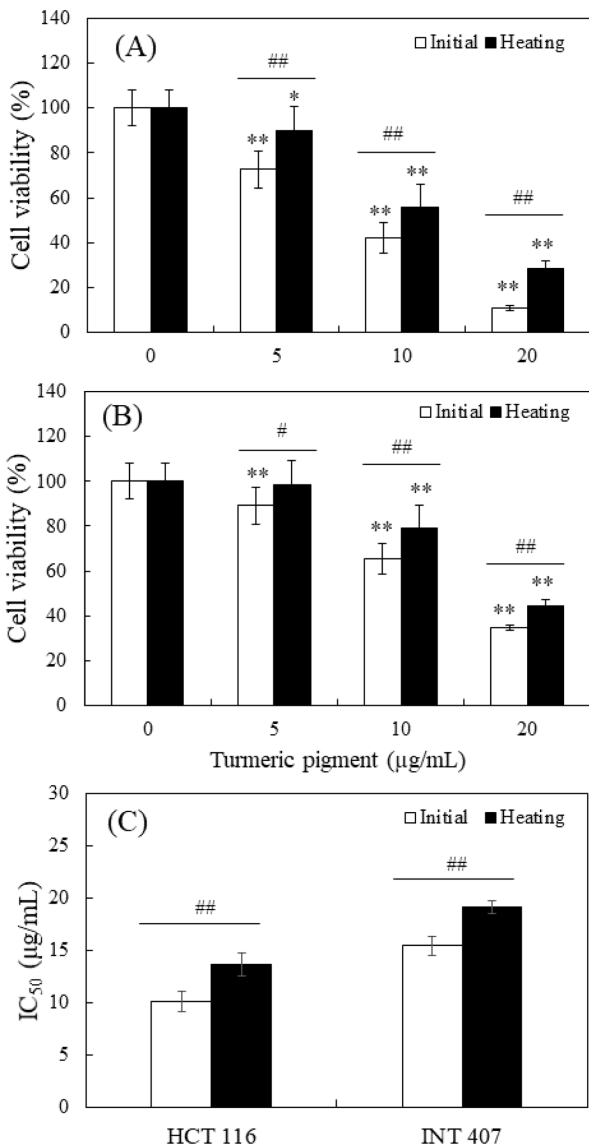


Fig. 5. Changes in cytotoxicity of turmeric pigments by heating. HCT 116 (A) and INT 407 (B) cells were incubated with different concentrations of turmeric pigments before or after heating, and the cell viability after 24 h was analyzed using MTT assay. IC₅₀ values of turmeric pigments against HCT 116 or INT 407 were also calculated (C). Each value represents the mean±SD (n=8). **Significant differences from its corresponding control or #,## between initial and sample treated with heating process according to Student's *t*-test (*p<0.05, **p<0.01).

다. 가열처리 전의 심황색소(40 µg/mL)는 ABTS 라디칼에 대해서 약 40%의 소거활성을 나타냈으며, 95°C에서 15분 이상 가열한 시료에서 그 활성이 유의적으로 증가하였다. 반면, DPPH 라디칼에 대해서는 모든 처리시간에서 유의적인 소거활성의 차이가 나타나지 않았다(Fig. 4A). 심황색소는 아질산염에 대해서 가열 전 12%의 소거활성을 나타내었는데 95°C에서 15분간 가열처리 하였을 경우 38%로 3배 가량의 활성증가를 보였다(Fig. 4B).

AAPH peroxy 라디칼에 대한 소거능은 ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay를 통해 평가하였다. 본 반응계에서는 자유라디칼 initiator인 AAPH가 peroxy 라디칼을 생성하여 플루오레세인(fluorescein)의 형광도를 감소시키게 되는데 이 반응계에

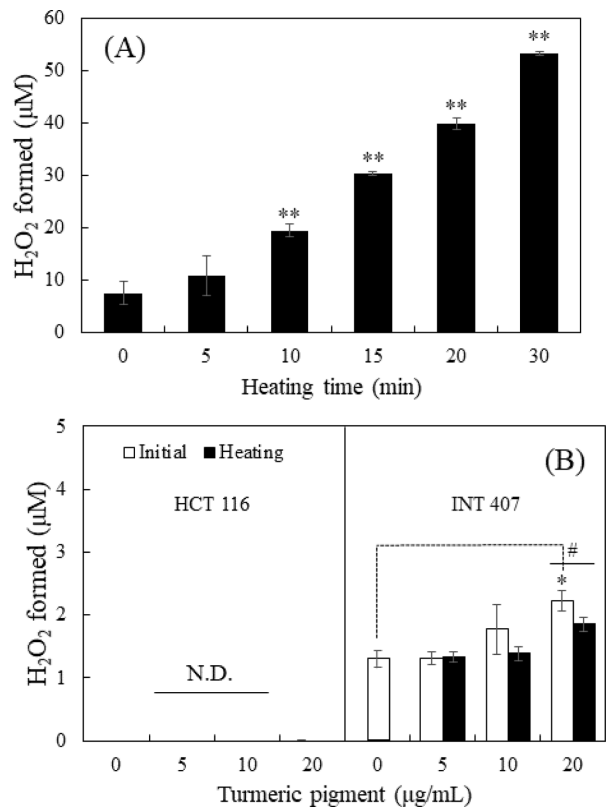


Fig. 6. Changes in H₂O₂ level formed from turmeric pigments by heating. Turmeric pigments (20 µg/mL) after heating with different time (0-30 min) at 95°C was incubated in PBS for 3 h, and H₂O₂ level formed was measured (A). H₂O₂ levels formed in culture media of HCT 116 or INT 407 cells treated with turmeric pigments (0-20 µg/mL) for 24 h were also analyzed (B). Significant differences from control or # between initial and heating sample according to Student's *t*-test (*p<0.05, **p<0.01). N.D., Not detected

라디칼을 소거하는 물질이 있을 경우 플루오레세인의 형광감소를 지연시키게 된다(19). 가열처리에 따른 심황색소(1 µg/mL)의 AAPH 라디칼 소거능을 측정된 결과, 가열시간의 증가에 따라 AAPH 라디칼에 의한 형광도의 감소가 유의적으로 지연되었다(Fig. 4C). 각 시료별 반감기를 계산한 결과, 대조구의 경우 AAPH 라디칼에 의한 형광도의 반감기가 52.1분이었고 심황색소에 대한 가열시간의 증가에 따라 반감기가 증가하여 15분 가열시료에서는 87.4분까지 연장되었다(Fig. 4D).

본 연구결과에 의하면 가열처리에 의한 쿠쿠미노이드의 파괴에도 불구하고, 각종 라디칼 및 아질산염에 대한 소거활성은 감소하지 않는 것으로 나타났다. 오히려 DPPH 라디칼 소거활성을 제외하고 대부분의 반응계에서 활성이 증가되었는데, 이는 가열처리에 의해 생성된 분해산물이 상당한 산화방지능을 가지고 있음을 시사한다. 이와 유사한 결과로서 전자레인지 가열에 의해서 쿠쿠민의 라디칼 소거활성의 강화효과도 보고된 바 있다(20). 산화방지능 측정을 위한 방법들 중에는 시료의 전자전달능이나 수소원자전달능을 근거로 평가하는 것들이 많으며, 시료에 의한 환원능력은 반응용액 및 측정조건에 영향을 받는 것으로 알려져 있다(21,22). 가열에 의해 생성되는 쿠쿠미노이드의 산물로서 trans-6-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-5-hexenal, 페룰산(ferulic acid), 바닐린(vanillin), 페룰로일메테인(feruloyl methane), 바닐산(vanillic acid), p-hydroxybenzaldehyde, 하이드록시벤조산(phydrox-

ybenzoic acid) 등이 보고되었는데 이들은 모체 화합물보다 더 수용성인 물질들이다(23,24). 따라서 소수성 구조로 인해 수용성 반응계상에서의 반응적합성(compatibility)이 낮은 쿠쿠미노이드보다 가열에 의한 분해산물이 더 높은 산화방지 활성을 나타낸 것이라고 판단되며, 유기용매가 포함된 DPPH 라디칼 소거활성 측정 반응계 상에서는 이러한 현상이 상대적으로 상쇄되는 것으로 생각된다.

가열처리에 의한 심황색소의 세포독성과 활성산소종 생성량 변화

대장암세포주 HCT 116과 정상 장관계 세포주 INT 407을 대상으로 가열처리에 의한 심황색소의 세포독성 변화를 평가하였다. 가열처리를 통하여 약 50% 파괴시킨 색소시료와 처리 전 시료를 농도 별로 세포에 투여하고 MTT assay에 의해 세포생존율을 측정하였다. 심황색소는 전반적으로 정상 장관계 INT 407 세포주에 비해 대장암 HCT 116 세포주에 더 강한 세포독성을 나타냈다(Fig. 5). 두 세포에서 모두 가열처리를 한 심황색소 시료의 세포독성이 현저하게 약화되었으며(Fig. 5A and B), IC₅₀값에서도 유의적인 차이를 나타냈다(Fig. 5C).

한편 쿠쿠미노이드와 같은 폴리페놀성 물질 중에 상당수가 세포배양계에서 활성산소종을 생성하는 산화촉진제(pro-oxidant)로 작용하여 세포성장과 사멸에 영향을 미치는 것으로 보고됨에 따라(25-28), 가열처리에 의한 심황색소로부터의 활성산소종 생성량 변화를 분석하였다. 심황색소를 시간 별로 가열처리하고 PBS 상에서 3시간 동안 방치한 후 H₂O₂의 생성량을 분석한 결과, 가열처리 시간이 증가할수록 생성능이 유의적으로 강화되는 결과를 나타냈다(Fig. 6A). 가열 전 심황색소에서는 7.5 μM의 H₂O₂가 생성된 반면, 95°C에서 30분간 가열한 시료에서는 53.2 μM로 7배 이상 생성량이 증가하였다(Fig. 6A). 각 심황색소 시료를 HCT 116과 INT 407 세포배양계에 24시간 처리한 후 세포배양액 상의 H₂O₂생성량을 측정한 결과, HCT 116에서는 검출한계 이하였으며 INT 407에서는 가열 전 심황색소에서 약간 더 많은 양의 H₂O₂가 생성되었지만 2 μM 이하의 극히 미미한 수준이었다(Fig. 6B). 세포배양계 상에서 극히 미량의 H₂O₂가 검출된 이유는 세포 내의 superoxide dismutase나 카탈레이스(catalase)와 같은 항산화효소에 의해 대부분의 활성산소종이 소거되었기 때문으로 판단된다. 따라서 심황색소에 의한 세포독성은 활성산소종에 의존한 기작으로 단정지을 수 없으며, 오히려 쿠쿠미노이드의 구조 자체가 직접적으로 세포독성에 영향을 미친다는 기존 보고에 의거하여(29), 가열에 의해 쿠쿠미노이드가 파괴됨에 따라 세포 독성이 저하된 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 식품의 가공이나 조리 시 빈번히 적용되는 가열처리에 의한 심황색소의 화학안정성, 산화방지활성 및 세포독성의 변화를 조사하였다. 95°C에서 각 시간별로 가열처리한 심황색소는 가열시간이 증가할수록 발색도가 감소하였으며, 형광도는 초기 가열 시에 증가하다 감소하는 양상을 보였다. HPLC 분석 결과 3종의 쿠쿠미노이드 중 쿠쿠민이 가열처리에 가장 민감하였으며 BMC가 가장 안정하였다. 가열 처리 후의 심황색소에 의해 ABTS 라디칼, AAPH peroxy 라디칼 및 아질산염 소거활성이 증가하였으나, DPPH 라디칼 소거활성에는 변화가 없었다. 가열처리 시간의 증가에 따라 심황색소로부터의 H₂O₂ 생성능이 증가한 반면, 정상장관계 세포 INT 407 및 대장암 세포 HCT 116를 대상으로 한 세포독성평가에서는 가열처리 후 심황색소의 활

성이 유의적으로 약화되었다. 본 연구결과는 다양한 가공식품에 첨가되는 심황색소의 화학안정성 및 생리활성이 가열처리에 의해 크게 영향을 받으며, 생리활성 증진을 목적으로 첨가되는 심황색소에 이러한 가열처리 효과가 고려되어야 함을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 이공분야기초연구사업 중견연구자 지원사업 연구비 지원(과제번호: 2016R1A2B1007540)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Li S, Yuan W, Deng G, Wang P, Yang P, Aggarwal B. Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L.) Pharm. Crops. 2: 28-54 (2011)
- Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. In: Anonymous the molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease, Springer, pp 1-75 (2007)
- Govindarajan VS. Turmeric chemistry, technology and quality. Crit. Rev. Food Sci. 12: 199-301 (1980)
- Masuda T, Hidaka K, Shinohara A, Maekawa T, Takeda Y, Yamaguchi H. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: analysis of radical reaction products from curcumin. J. Agr. Food Chem. 47: 71-77 (1999)
- Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. Vol. 595, pp. 105-125. In: The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease. Aggarwal BB, Surh YJ, Shishodia S (eds). Springer US, New York, NY, USA (2007)
- Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. Anticancer Res. 23: 363-398 (2003)
- Hamaguchi T, Ono K, Yamada M. Review: Curcumin and Alzheimer's disease. CNS Neurosci. Ther. 16: 285-297 (2010)
- Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curcumin": from kitchen to clinic. Biochem. Pharmacol. 75: 787-809 (2008)
- Guo LY, Cai XF, Lee JJ, Kang SS, Shin EM, Zhou HY, Jung JW, Kim YS. Comparison of suppressive effects of demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin on expressions of inflammatory mediators *in vitro* and *in vivo*. Arch. Pharm. Res. 31: 490-496 (2008)
- Ko YC, Lien JC, Liu HC, Hsu SC, Ji BC, Yang MD, Hsu WH, Chung JG. Demethoxycurcumin induces the apoptosis of human lung cancer NCI-H460 cells through the mitochondrial-dependent pathway. Oncol. Rep. 33: 2429-2437 (2015)
- Yang ST, Huang AC, Tang NY, Liu HC, Liao CL, Ji BC, Chou YC, Yang MD, Lu HF, Chung JG. Bisdemethoxycurcumin-induced S phase arrest through the inhibition of cyclin A and E and induction of apoptosis via endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathways in human lung cancer NCI H460 cells. Environ. Toxicol. 31: 1899-1908 (2016)
- Govindarajan VS, Stahl WH. Turmeric-chemistry, technology, and quality. Crit. Rev. Food. Sci. 12: 199-301 (1980)
- Tønnesen HH, Karlsen J, Henegouwen GB. Studies on curcumin and curcuminoids VIII. photochemical stability of curcumin. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 183: 116-122 (1986)
- Lee B, Kim D, Kang S, Kim M, Hong J. Changes in the chemical stability and antioxidant activities of curcuminoids under various processing conditions. Korean J. Food Sci. Technol. 42: 97-102 (2010)
- Esatbeyoglu T, Ulbrich K, Rehberg C, Rohn S, Rimbach G. Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. Food Funct. 6:887-893 (2015)
- Prathapan A, Likhman M, Arumughan C, Sundaresan A, Raghu

- KG. Effect of heat treatment on curcuminoid, colour value, and total polyphenols of fresh turmeric rhizome. *Int. J. Food Sci. Tech.* 44: 1438-1444 (2009)
17. Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26: 853-856 (1991)
18. Chignell CF, Bilskj P, Reszka KJ, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem. Photobiol* 59: 295-302 (1994)
19. Peyrat-Maillard MN, Cuvelier M, Berset C. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2, 2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80: 1007-1012 (2003)
20. Jung YN, Kang S, Lee BH, Kim JH, Hong J. Changes in the chemical properties and anti-oxidant activities of curcumin by microwave radiation. *Food Sci. Biotechnol.* 25:1449-1455 (2016)
21. Apak R, zyrek M, Gl K, apanolu E. Antioxidant activity/capacity measurement. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET) based assays. *J. Agr. Food Chem.* 64: 997-1027 (2016)
22. Finotti E, Di Majo D. Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Mol. Nutr. Food Res.* 47: 186-187 (2003)
23. Siddiqui NA. Evaluation of thermo sensitivity of curcumin and quantification of ferulic acid and vanillin as degradation products by a validated HPTLC method. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28: 299-305 (2015)
24. Wang Y, Pan M, Cheng A, Lin L, Ho Y, Hsieh C, Lin J. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed.* 15: 1867-1876 (1997)
25. Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch. Biochem. Biophys.* 501:65-72 (2010)
26. Roos B, Duthie GG. Role of dietary pro-oxidants in the maintenance of health and resilience to oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.* 59: 1229-1248 (2015)
27. Woo J, Kim Y, Choi Y, Kim D, Lee K, Bae JH, Min DS, Chang J, Jeong Y, Lee YH. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-X L and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis* 24: 1199-1208 (2003)
28. Su CC, Lin JG, Li TM, Chung JG, Yang JS, Ip SW, Lin WC, Chen GW. Curcumin induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS, Ca^{2+} , and the activation of caspase-3. *Anticancer Res.* 26: 4379-4389 (2006)
29. Hong J. Curcumin-induced growth inhibitory effects on HeLa cells altered by antioxidant modulators, *Food Sci. Biotechnol.* 16: 1029-1034 (2007)