

Anti-inflammatory Effects of Black Cherry Tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) Juice on LPS-induced RAW 264.7 Cells

Kyung Im Jung¹, Nayeon Ha^{2,3} and Young Ju Choi^{1*}

¹Department of Food & Nutrition, Silla University, Busan 46958, Korea

²Korea Tradition Fermentation Culture Researcher, GyeongNam 50807, Korea

³Department of Education, KyungSung University, Busan 48434, Korea

Received March 27, 2018 / Revised April 20, 2018 / Accepted April 24, 2018

This study was carried out to investigate the antioxidative, nitrite-scavenging, alcohol-metabolizing, and anti-inflammatory effects of black-cherry tomato juice (BCTJ) on LPS-induced RAW 264.7 cells. The total phenol content of the BCTJ was 156.83 µg tannic-acid-equivalent/ml. The antioxidative effects of BCTJ were measured using DPPH radical-scavenging activity and SOD-like assay. DPPH radical-scavenging activity of BCTJ was increased in a dose-dependent manner ($p < 0.05$) and was 83.39% at 40%. SOD-like activity of BCTJ was 22.01% at 100%. The effects of BCTJ on alcohol-metabolism were determined by measuring generations of reduced nicotinamide adenine dinucleotides (NADH) by alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH). ADH and ALDH activities were 198.87% and 181.89% at 40%, respectively. Nitric scavenging activities of BCTJ were 85.06%, 58.25%, and 43.68% at pH values 1.2, 3.0, and 6.0, respectively, at 50%. Anti-inflammatory effects were examined in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Nitric-oxide production was reduced to 83.55% by the addition of BCTJ at 10%. These results suggest that black-cherry tomato juice has great potential as a resource for natural health products.

Key words : Alcohol dehydrogenase, anti-inflammatory, anti-oxidant, tomato (*Lycopersicon esculentum* M.)

서 론

토마토(*Lycopersicon esculentum* M.)는 남아메리카 서부 고원지대가 원산지로 알려진 가지과의 작물로 열대지역에서는 다년생이나 온대지역 및 우리나라에서는 일년생 작물로 재배되고 있다[20, 40]. 토마토는 널리 소비되는 과채류 중 하나로 β-carotene, lycopene 등의 carotenoids 뿐만 아니라 다양한 polyphenol, flavonoids, rutin, tocopherol, naringenin 등이 함유되어 있다[20, 44]. 일반 토마토의 생리기능에 대한 연구로는 LDL 산화 억제효과[33]와 항산화 효과[13] 및 전립선암 억제효과[15], 폐암 억제효과[37] 등이 보고되어 있다. 토마토의 건강 증진 효능이 밝혀지면서 최근 토마토 소비 형태의 변화에 따라 전 세계적으로 토마토 생산량이 증가[20]되고 있으나 방울토마토(*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) 및 흑색 방울토마토의 기능성에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 최근 건강 지향적인 식품선택 패턴의 소비자 니즈에 따라 탄산음료

시장은 점차 감소하고 있는 반면 과일을 활용한 주스 시장이 빠르게 확대되고 있다[10]. 과채류 섭취량이 증가할수록 뇌졸중과 고혈압 위험 및 심장순환계 질환에 의한 사망률이 감소하고, 비타민과 무기질 및 페놀성 화합물 등이 풍부하여 산화적 스트레스를 감소시키며 혈압저하, 인슐린 민감성 증가, 혈중 지질 개선 등에 도움을 주는 것으로 보고되고 있다[9]. 특히 과채류에는 비타민과 무기질이 풍부하고 유기산과 당분을 다량 함유하고 있으며 다양한 색소로 인해 상쾌함과 단맛, 색 등에 대한 관능적 특성이 우수하여 이를 이용한 과채류 가공 천연주스는 섭취가 용이하다는 장점과 함께 세포노화 억제, 항산화 효과, polyphenol과 다량의 식이섬유소에 의한 장관질 환 예방 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[28]. 과일 및 채소 주스에 관한 연구로는 시판주스의 항균, 항산화 및 항혈전 활성[28]과 임파구 DNA 손상 방지 효능[9], 항염증 효과[10]와 제조 장치에 따른 효소활성 및 항산화 효과[6] 및 복분자 주스[34]와 머루 주스[35]의 항산화 활성 등이 보고되어 있다.

염증은 대사산물과 세균, 바이러스 감염 및 물리, 화학적 자극 등의 내부 및 외부 자극으로 손상된 신체조직을 복구하기 위한 방어 기작이다[20]. L-arginine에서 NO synthase (NOS)에 의해 합성된 nitric oxide (NO)는 염증반응의 지표물질로[18] 혈관확장, 신호전달, 체내 방어 등의 기능을 가지고 있으나 NO의 다량 생성은 림프구 증식 억제 및 정상세포 손상 유발로 염증 질환을 유발하며, 유전자 변이, 신경손상, 패혈성

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5459, Fax : +82-51-999-5657

E-mail : yjchoi@silla.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

쇼크[18, 20, 42] 등을 일으킨다.

따라서 본 연구에서는 흑색 방울토마토 주스에 대한 생리작용 규명을 위하여 항산화 활성과 알코올 분해능, 아질산염 소거능 및 항염증 효과에 대한 생리활성을 조사하여 건강 지향적 소비자 니즈에 부합된 제품개발을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 준비

본 연구에 사용한 흑색 방울토마토 주스는 농업회사법인 명성바이오 주식회사(Myongsungbio CO., Busan, Korea)에서 제공받아 시료로 사용하였다. 흑색 방울토마토 주스는 냉동원심분리기(MEGA17R, Hanil Science Industrial CO., Ltd., Incheon, Korea)를 이용하여 4℃에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 취한 다음 Whatman No. 2 filter paper로 여과하여 -70℃에서 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 polyphenol 함량은 Folin-Ciocalteu법[39]을 약간 변형시켜 측정하였으며 표준물질로는 tannic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하여 분석하였다. 일정농도의 흑색 방울토마토 주스를 시험관에 취하고 증류수를 가하여 2 ml로 정용한 후 Folin-Ciocalteu reagent 0.3 ml를 가하여 잘 혼합한 다음 3분간 실온에서 반응시켰다. 혼합물에 7.5% Na₂CO₃용액 0.4 ml를 가하여 혼합하고 50℃에서 5분간 발색시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흑색 방울토마토 주스의 총 페놀 함량은 µg tannic acid equivalent (TAE)/ml로 나타내었다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능 측정

흑색 방울토마토 주스의 전자공여능은 Blois의 방법[1]을 약간 변형하여 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 96-well plate에 시료와 0.4 mM DPPH 용액을 1:4 비율로 혼합하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후, ELISA reader (Versa Max Microplate Reader, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(Electron donating ability; EDA)은 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 흡광도차를 비교하여 free radical의 제거활성을 백분율로 나타내었다.

$$\text{EDA} (\%) = (\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}) / \text{대조구 흡광도} \times 100$$

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund와 Marklund의 방법[30]에 따라 활성 산소종을 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 측

매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 나타내었다. 흑색 방울토마토 주스를 농도별로 희석하여, 10 µl씩 96 well plate에 취한 후, Tris-HCl buffer (50 mM Tris aminomethane, 10 mM EDTA, pH 8.0) 150 µl와 7.2 mM pyrogallol 10 µl를 가하여 실온에서 10분간 반응시키고, 1 N HCl 50 µl를 가하여 반응을 정지시킨 후 ELISA reader를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{SOD-like activity} (\%) = (1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{시료 무첨가구 흡광도}) \times 100$$

Alcohol dehydrogenase (ADH) 활성 측정

ADH 효소활성 측정은 Choi 등[5]과 Racker [38]의 방법을 변형하여 측정하였으며, 생성된 NADH의 양을 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험관에 alcohol 0.1 ml, NAD 수용액 (2 mg/ml) 0.5 ml 및 시료 0.1 ml를 첨가하고 10 mM glycine-NaOH buffer (pH 8.8)를 총 부피가 1.8 ml가 되도록 조절하여 25℃ 항온수조에서 10분간 반응시킨 후 ADH (10 unit/ml, Sigma)를 가하여 340 nm에서 spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, UK)를 이용하여 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조구는 시료대신 증류수를 첨가하였으며, positive control은 약국에서 구입한 hepos를 1/2로 희석하여 사용하였다. ADH의 활성은 다음과 같은 식으로 상대적인 백분율로 계산하였다.

$$\text{ADH activity} (\%) = (\text{실험구의 최대 흡광도} / \text{대조구의 최대 흡광도}) \times 100$$

Acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성 측정

ALDH의 효소활성 측정은 Koivula와 Koivusalo의 방법[26]을 약간 변형하여 측정하였다. 반응용액은 증류수 2.1 ml, 1.0 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.3 ml, 20 mM NAD⁺ 0.1 ml, 0.1 M acetaldehyde 0.1 ml, 3.0 M KCl 0.1 ml, 0.33 M 2-mercaptoethanol 0.1 ml 및 시료 0.1 ml를 혼합하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후 ALDH (1 unit/ml) 0.1 ml를 첨가하여 25℃ 항온수조에서 5분간 반응시킨 다음 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조구는 시료대신 TE buffer (pH 8.0)를 첨가하여 상대 활성(%)으로 나타내었고, positive control은 ADH 활성 측정에서와 같이 hepos를 사용하였으며, ALDH 활성 측정은 ADH 활성 측정식과 동일한 식을 사용하였다.

아질산염 소거능 측정

흑색 방울토마토 주스의 아질산염 소거능은 Gray와 Dugan의 방법[16]을 변형하여 측정하였다. 아질산염 용액에 시료 용액을 가한 후 0.1 N HCl (pH 1.2) 및 0.2 M 구연산 완충용액을 사용하여 반응 용액의 pH를 각각 1.2, 3.0 및 6.0으로 조정하여 사용하였다. 반응물용액은 37℃에서 1시간 반응시킨 후

Griess 시약을 가하여 15분간 실온에 방치시킨 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염을 구하였다. 아질산염 소거능은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{아질산염 소거능(\%)} = [1 - (A-C)/B] \times 100$$

- A: 1 mM NaNO₂ 용액에 추출 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도
- B: NaNO₂ 용액의 흡광도
- C: 시료의 흡광도

세포배양 및 산화질소(NO) 생성능 측정

마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포주는 ATCC (American Tissue Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구매하여, 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% penicillin (100 unit/ml)/streptomycin (100 µg/ml)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 2~3일에 한번 refeeding하면서 배양하여 세포분화가 최대에 도달하였을 때 PBS (phosphate buffered saline)으로 세포를 세척한 후 scraper를 이용하여 세포를 분리한 뒤 원심분리 하여 세포를 모은 다음 세포와 배지를 잘 혼합하여 계대배양하며 사용하였다.

RAW 264.7 세포종의 산화질소(NO) 생성을 측정하기 위해 세포를 24-well plate에 5×10⁴ cells/well씩 분주하고 24시간 배양한 후 시료를 넣어 3시간 전처리 하였다. 이후 1 µg/ml 농도의 LPS (lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111: B4)를 24시간 동안 함께 처리하여 세포를 자극하였다. 배양이 끝난 후, NO의 측정을 위해 상등액을 100 µl씩 96-well plate로 옮겨 동량의 Griess (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 시약을 가하여 10분간 상온에서 암반응 시키고 microplate reader를 이용하여 460 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험결과는 통계 SAS package (Statistical Analysis System, Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 각 시료의 평균과 표준편차를 계산하였고, 분산분석(ANOVA)과 Duncan's multiple range test를 실시하여 p<0.05 level에서 시료간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량

방향족고리 및 한 개 이상의 수산기가 포함된 구조의 폴리페놀은 페놀산과 플라보노이드로 분류되며[36] 항돌연변이, 항산화 및 phytoestrogen 효과 등의 다양한 생리활성이 있는 것으로 알려져 있다[2, 8]. 본 연구에서는 흑색 방울토마토 주스의 총 페놀 함량을 tannic acid 표준곡선으로부터 측정된

Table 1. Total polyphenol contents of black cherry tomato juice

	Total polyphenol (µg TAE/ml) ¹⁾
Black cherry tomato juice	156.83±2.63 ²⁾

¹⁾TAE standards for tannic acid equivalent.

²⁾Results are mean ± SD of triplicate data.

결과(Table 1), 156.83 µg TAE/ml로 나타났다. Chung [10]은 시판 토마토 주스의 총 폴리페놀 함량은 98.29 µg TAE/ml로 보고하였고, Lee 등[28]은 국내 시판 토마토 주스의 총 폴리페놀 함량은 0.29 mg TAE/ml로 본 시료의 총 폴리페놀 함량과는 차이가 있었다. Kim과 Ahn [21]은 방울토마토 Betatini 품종 동결 건조 추출물의 총 폴리페놀 함량은 11.02 mg gallic acid equivalent (GAE)/g으로 보고하였고, Choi와 Ahn [7]은 방울토마토 라이코펜 품종 동결 건조 추출물의 총 폴리페놀 함량은 12.28 mg GAE/g으로 품종에 따라 차이가 있는 것으로 보고하였으며, Na 등[32]은 재배지역별 일반 토마토 원물의 총 폴리페놀 함량은 19.43~32.44 mg/100 g으로 재배지역에 따라 유의적인 차이가 있는 것으로 보고하였다. 또한 Maxson과 Rooney [31]는 수확시기와 품종 및 표준물질에 따라 분석 결과는 차이가 있다고 하였다. Gardner 등[14]은 과일 주스에 함유된 페놀성 화합물로는 anthocyanin, chalcone, catechin, flavonoid, hydroxycinnamic acid, hydroxybenzoic acid 등이 있으며 이중에서 어떤 물질이 주된 항산화효과를 나타내지는 명확하지 않다고 보고하였는데, Vallverdu-Queralt 등[41]은 토마토의 주된 페놀성 화합물은 phenolic acid, flavanone, flavanol, hydroxycinnamic acid 등이라고 하였고, Elbadrawy와 Sello [12]는 토마토 껍질의 페놀성 화합물은 procatechoic, catechin, gallic, vanillic 등이라고 하였다. Dewanto 등[11]은 88°C의 열처리가 토마토의 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량, 라이코펜 함량 및 총 항산화 활성을 증가시킴으로써 토마토의 영양가를 높이는 것으로 보고하였다. 한편 Park [35]는 경북 봉화산 머루를 착즙한 주스의 총 페놀함량은 25.4 mg/100 g으로 보고하였고, Choi 등[6]은 시판 자몽, 포도, 키위 착즙 주스의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과 각각 0.093 mg GAE/ml, 0.073 mg GAE/ml, 0.086 mg GAE/ml로 자몽이 가장 높은 것으로 보고하였다.

DPPH radical 소거능

항산화 효과의 지표로 전자공여능이 사용되고 있는데, 비교적 안정한 radical인 DPPH radical은 비타민 C와 토코페롤, 방향족 아민류 및 polyhydroxy 방향족 화합물 등에 의해 수소나 전자를 받아 비가역적으로 안정한 분자를 형성, 환원됨에 따라 진한 보라색이 탈색되는 원리를 이용하여 천연소재로부터 항산화 효과를 탐색하기 위해 많이 사용되고 있다[22, 34]. 본 연구에서 흑색 방울토마토 주스의 DPPH radical 소거능을

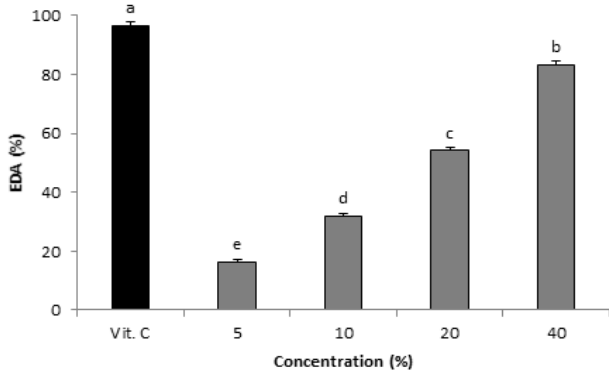


Fig. 1. DPPH free radical scavenging activity of black cherry tomato juice. Results are mean ± S.D. of triplicate data. Vit. C (Vitamin C, 0.1 mg/ml) is used as positive control. Different letters (a-e) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

측정한 결과(Fig. 1), 농도 의존적으로 증가하였으며($p < 0.05$), 40%의 농도에서 83.39%의 높은 radical 소거능을 나타내었다. Lee 등[28]은 국내 시판 토마토 주스의 DPPH radical 소거능은 5% 농도에서 54.75%로 보고하였고, Wootton-Beard 등[43]은 토마토 주스의 DPPH radical 소거능은 67.3~88.5%라고 보고하였다. Chung [10]은 4배로 희석한 시판 토마토 주스의 소거능은 26%로 나타났는데, 종류가 같은 과일주스라도 DPPH radical 소거능은 큰 차이가 있는 것으로 보고하였는데 이는 품종과 제조공정 등의 차이에서 오는 결과라고 판단하였다. Choi 등[6]은 12가지 채소와 과일의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 토마토, 포도, 귤 등 색깔이 있는 실험군에서 복숭아, 배 보다 비교적 높은 DPPH radical 소거능이 있는 것으로 보고하였는데 이는 색깔이 있는 과일이 갖고 있는 phytochemical 때문인 것으로 판단하였다.

SOD 유사활성

체내 생성된 과산화수소(H_2O_2)는 DNA를 비롯한 세포 구성 성분들의 산화적 손상을 유발하여 노화와 질병의 원인으로 작용하는 활성산소 중 하나이다[24]. SOD는 산화로 인하여 형성된 superoxide anion을 과산화수소로의 전환 반응을 촉매하고, 다시 catalase에 의하여 생성된 과산화수소를 체내 무해한 물과 산소 분자로 전환시킴으로서 활성산소로부터 인체를

보호하는 효소로 알려져 있는데, SOD 유사활성 물질은 항산화 효소는 아니지만 주로 식물에 함유되어 있는 phytochemical로 SOD와 유사한 기능을 하는 물질로서 활성산소의 반응성을 억제하여 항산화 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 [17]. 과채류와 산야채 등이 식물에 함유된 phenol성 화합물들은 superoxide anion의 반응성을 효과적으로 억제하는 SOD 유사활성이 높기 때문에 산화적 stress로 인한 세포 손상을 감소시킬 수 있는 천연 항산화제로 알려져 있기에 SOD 유사활성을 가지는 식품 섭취가 권장되고 있다[24]. 그러나 지금까지 토마토 등의 과일 및 채소 주스에 대한 SOD 유사활성을 측정된 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서 흑색 방울토마토 주스의 SOD 유사활성을 측정한 결과(Table 2), 농도 의존적으로 증가하였으며($p < 0.05$), 100%의 농도에서 22.01%의 SOD 유사활성을 나타내었다.

Alcohol 분해활성(ADH, ALDH)

흑색 방울토마토 주스의 숙취 해소능을 알아보기 위하여 체내 alcohol 대사의 일차 효소인 ADH 활성(Fig. 2) 및 아세트알데히드를 분해하는 ALDH 활성(Fig. 3)을 alcohol 분해 및 숙취해소에 효과가 있는 것으로 알려진 hepos를 대조구(positive control)로 하여 분석하였다. 그 결과 ADH 활성 및 ALDH 활성 모두 농도 의존적으로 증가하였다($p < 0.05$). 흑색 방울토마토 주스 10%~60% 농도에서의 ADH 활성은 120.91%~237.35%로 높은 활성을 보였는데, 40%의 농도에서 198.87%로 대조구인 hepos 184.05보다 높게 나타났다($p < 0.05$). 흑색 방울토마토 주스 10%~60% 농도에서의 ALDH 활성 또한 116.03%~220.25%로 높은 활성을 보였는데, 40%의 농도에서 181.89%로 대조구인 hepos 175.39%보다 높게 나타났다. 다량의 음주를 만성적으로 하는 알코올 중독자 중 약 15% 정도가 알코올성 간경변에 이른다 알려져 있는데, 이것은 다량의 음주뿐만 아니라 다양한 요인에 의해 알코올성 간경변이 유발됨을 의미한다[19]. 지금까지 천연물의 알코올 분해활성에 대한 연구는 헛개나무 추출물[25]과 콩나물 여과액[23], 산겨릅나무 추출물[3, 4] 및 약용식물[27] 등이 수행되었다. 토마토 및 과일 주스의 알코올 분해활성과 관련된 연구 결과가 문헌상 보고된 바가 많이 없기에 본 연구결과와 직접 비교하기는 어렵다. 그러나 흑색 방울토마토 주스의 알코올 분해활성이 높은 것으로 나타났기에 숙취음료 개발을 위한 기초자료로

Table 2. Superoxide dismutase (SOD) - like activity of black cherry tomato juice

	Concentration (%)				
	Vit. C ¹⁾	10	20	50	100
Black cherry tomato juice	91.97±0.56 ^{2)a3)}	ND ⁴⁾	10.24±1.23 ^d	13.97±0.79 ^c	22.01±1.183 ^b

¹⁾Vit. C (Vitamin C, 0.5 mg/ml) is used as positive control.
²⁾Results are mean ± SD of triplicate data.
³⁾Different letters (a-d) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).
⁴⁾Not detected.

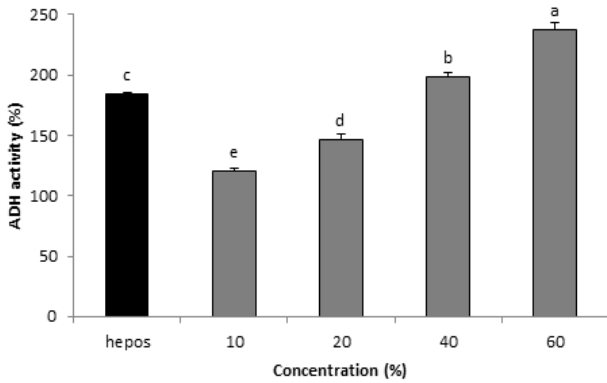


Fig. 2. Effects of black cherry tomato juice on the alcohol dehydrogenase (ADH). Results are mean ± S.D. of triplicate data. Hepos (50%) is used as positive control. Different letters (a-e) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

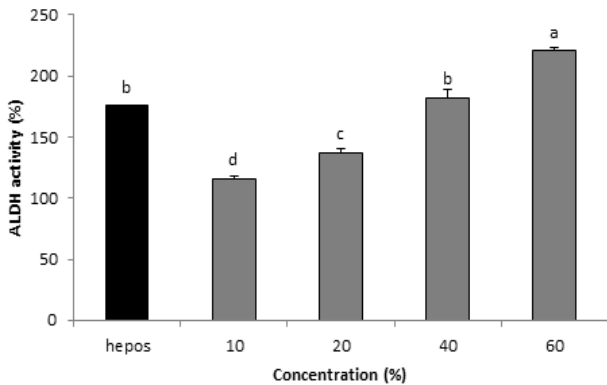


Fig. 3. Effects of black cherry tomato juice on the aldehyde dehydrogenase (ALDH). Results are mean ± S.D. of triplicate data. Hepos (50%) is used as positive control. Different letters (a-d) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

활용될 수 있을 것으로 판단되며, 숙취음료 개발을 위한 식품 소재로서의 활용가능성이 높은 것으로 생각된다.

아질산염 소거능

질산염 및 아질산염은 육류 및 가공육의 육색고정이나 *Clostridium botulinum*에 의한 독소생성을 억제하기 위하여 식품첨가물로 많이 사용되고 있다[10]. 질산염 그 자체는 독성이 없으나 타액이나 위 내의 질산염 환원 세균이나 환원 효소 작용에 의해 아질산염으로 환원되어 독성을 나타내는데, 아질산염은 반응성이 크기 때문에 산성 영역에서 쉽게 nitrous acid로 전환되어 니트로산화 물질로서 작용할 수 있다[29]. 식품 내에 amine류와 질산염 및 아질산염이 공존할 경우 그 대부분이 발암성 N-nitrosamine을 생성하며, 이와 같은 반응은 식품에서만뿐만 아니라 인체의 위 내에서 일어날 수 있다[29]. 그러므로 아질산염 소거능은 천연물의 항암효과를 간접적으

로 측정할 수 있는 지표로 사용될 수 있다[10]. 따라서 본 연구에서는 N-nitrosamine 생성의 직접적인 인자인 아질산염을 소거시키는 것이 N-nitrosamine 생성 억제와 직결된다고 판단하여 흑색 방울토마토 주스 50% 농도에서 아질산염 소거능에 미치는 영향을 pH 1.2와 3.0 및 6.0에서 각각 분석하였다(Fig. 4). 그 결과 pH가 낮을수록 아질산염 소거능이 증가하는 것으로 나타났다. pH 1.2에서의 비타민 C와 흑색 방울토마토 주스의 아질산염 소거능은 각각 97.43%와 85.06%로 높은 소거능을 보였는데 이는 위 내의 pH 조건과 유사한 pH 1.2에서 가장 활성이 높은 것으로 확인할 수 있었다. Lee 등[28]은 국내 시판 토마토 주스 5% 농도에서의 아질산염 소거능은 51.49%로 보고하였고, Chung [10]은 4배로 희석한 시판 토마토 주스의 아질산염 소거능은 34.75%로 보고하였다. 주스에 함유된 phenol성 화합물의 함량이 높을수록 아질산염 소거능은 우수하며, 이는 phenol성 화합물이 아민보다 경쟁적으로 아질산염과의 반응으로 nitrosamine 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 보고하였다[10]. 본 연구결과 흑색 방울 토마토 주스는 높은 아질산염 소거능을 보이므로 건강증진을 위한 기능성 식품 소재로서 가능성이 있는 것으로 사료된다.

NO assay

Nitric oxide (NO)는 cytokine 자극이나 미생물 침입으로 인하여 세포가 활성화 되는 것으로[18] nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 변하는 과정에 형성되는 활성 질소종의 하나이다[6]. RAW 264.7 대식세포는 LPS 자극으로 많은 양의 NO를 형성하며[18] NO는 자가 산화에 의해 다양한 질소화합물을 형성하고 유리기의 형태로 조직에 작용하여 강한 세포독성을 나타내는데[6] 이로 인한 세포독성은 세포의 돌연변이와 염증반응 및 종양 발생 등에 관여하는 것으로 알려져 있다[18]. 따라서 본 연구에서는 흑색 방울토마토 주스의 항염증 활성을 측정하기 위하여 RAW 264.7 대식

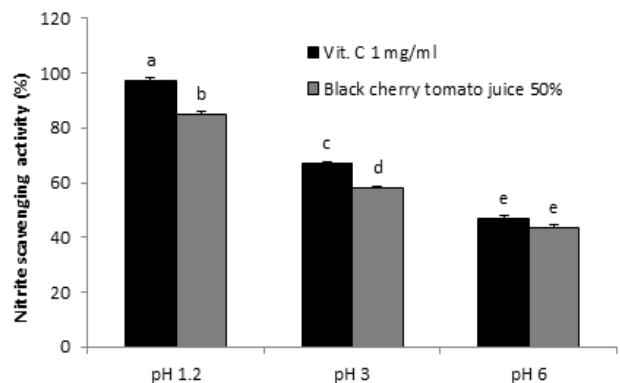


Fig. 4. Nitrite scavenging effects of black cherry tomato juice under different pH conditions (pH 1.2, 3.0, 6.0). Results are mean ± S.D. of triplicate data. Vit. C (Vitamin C, 1 mg/ml) is used as positive control. Different letters (a-e) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

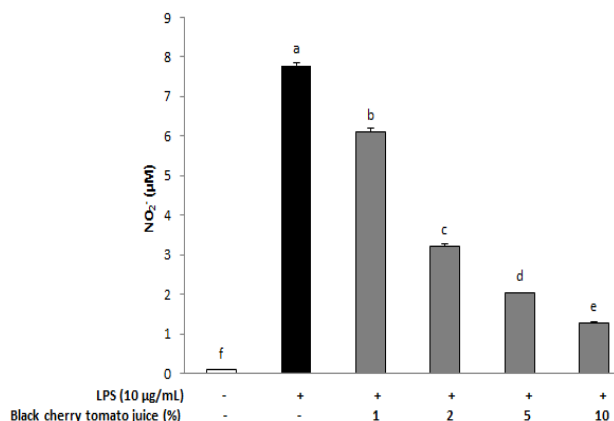


Fig. 5. Effects of black cherry tomato juice on NO synthesis (B) in bacterial LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were cultured for 24 hr with various concentration of black cherry tomato juice in the presence of LPS (10 µg/ml). NO release was measured using the method of Griess (nitrite). Results are mean \pm S.D. of triplicate data. Different letters (a-f) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

세포에 LPS를 처리하여 세포 내 NO 생성을 유도한 후 1%~10%의 흑색 방울토마토 주스를 대식세포에 처리하여 NO 합성에 미치는 영향을 알아보았다(Fig. 5). 그 결과 흑색 방울토마토 주스의 농도가 증가함에 따라 LPS에 의해 유도된 대식세포의 NO 합성은 유의적으로 감소하였는데($p < 0.05$), 흑색 방울토마토 주스 농도 10%에서의 NO 합성은 1.28%로 LPS 처리군(7.79%)보다 83.57% 현저하게 감소하였다($p < 0.05$). Choi 등[6]은 12가지 채소와 과일을 고속 및 저속착즙기를 이용하여 착즙하여 NO 생성 감소율을 측정된 결과 저속착즙기로 추출한 시료의 NO 생성 감소율이 높은 것으로 보고하였는데 이는 저속착즙 시료의 폴리페놀 함량이 높았기 때문인 것으로 판단하였다. 본 연구에서 흑색 방울 토마토주스는 LPS로 유도된 대식세포에서의 NO생성억제효과가 높은 것으로 나타나 염증 반응조절제로서 효과가 있는 것으로 판단되며 이를 활용한 제품개발의 기초자료가 될 것으로 기대된다.

References

- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1200.
- Byun, E., Jeong, G. S., An, R. B., Li, B., Lee, D. S., Ko, E. K., Yoon, K. H. and Kim, Y. C. 2007. Hepatoprotective compound of Cassiae Semen on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**, 400-402.
- Cho, E. K., Jung, K. I. and Choi, Y. J. 2015. Anti-diabetic, alcohol metabolizing enzyme, and hepatoprotective activity of *Acer tegmentosum* Maxim stem extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 1785-1792.
- Choi, J. H., Lee, S. H., Park, Y. H., Lee, S. G., Jung, Y. T., Lee, I. S., Park, J. H. and Kim, H. J. 2013. Antioxidant and alcohol degradation activities of extracts from *Acer tegmentosum* Maxim. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 378-383.
- Choi, J. T., Joo, H. K. and Lee, S. K. 1995. The effect of Schizandrae fructus extract on alcohol fermentation and enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agri. Chem. Biotech.* **38**, 278-282.
- Choi, M. H., Kim, M. J., Jeon, Y. J. and Shin, H. J. 2014. Quality changes of fresh vegetable and fruit juice by various juicers. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **29**, 145-154.
- Choi, S. H. and Ahn, J. B. 2014. Functional properties of the lycopene cultivar of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*). *Kor. J. Cul. Res.* **20**, 115-127.
- Choi, S. Y., Lin, S. H., Ha, T. Y., Kim, S. R., Kang, K. S. and Hwang, I. K. 2005. Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medical plant. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37**, 549-556.
- Cho, M. R., Lee, H. J., Kang, M. H. and Min, H. S. 2017. Comparison of antioxidant activity and prevention of lymphocyte DNA damage by fruit and vegetable juices marketed in Korea. *J. Nutr. Health.* **50**, 1-9.
- Chung, H. J. 2012. Comparison of physicochemical properties and physiological activities of commercial fruit juices. *Kor. J. Food Preserv.* **9**, 712-719.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K. and Liu, R. H. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3010-3014.
- Elbadrawy, E. and Sello, A. 2016. Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts. *Arabian J. Chem.* **9**, 1010-1018.
- Frusciante, L., Carli, P., Ercolano, M. R., Pernice, R., Di Matteo, A., Fogliano, V. and Pellegrini, N. 2007. Antioxidant nutritional quality of tomato. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 609-617.
- Gardner, P. T., Whit, T. A. C., Mcphai, D. B. and Duthie, G. G. 2000. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem.* **68**, 471-474.
- Giovannucci, E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 317-331.
- Gray, J. I. and Dugan, J. R. L. R. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J. Food Sci.* **40**, 981-984.
- Heo, S. J., Park, E. J., Lee, K. W. and Jeon, Y. J. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour. Technol.* **96**, 1613-1623.
- Jeong, H. J., Sung, M. S., Kim, Y. H., Ham, H. M., Choi, Y. M. and Lee, J. S. 2012. Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 888-894.
- Kee, J. Y., Kim, M. O., You, I. Y., Chai, J. Y., Hong, E. S., An, S. C., Kim, H., Park, S. M., Youn, S. J. and Chae, H. B. 2003. Effects of genetic polymorphisms of ethanol-metab-

- olizing enzymes on alcohol drinking behaviors. *Kor. J. Hepatology* **9**, 89-97.
20. Kim, H. J., Lee, K. J., Ma, K. H., Cho, Y. H., Lee, S. Y., Lee, D. J. and Chung, J. W. 2015. Effect of tomato leaf extracts on anti-inflammatory and antioxidant activities. *J. Int. Agric.* **27**, 529-535.
 21. Kim, H. R. and Ahn, J. B. 2014. Antioxidative and anticancer activities of the betatini cultivar of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) extract. *Food Eng. Prog.* **18**, 359-365.
 22. Kim, K. B., Yoo, K. H., Park, H. Y. and Jeong, J. M. 2006. Anti-oxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 328-333.
 23. Kim, K. M., Jung, H. J., Sung, H. M., Wee, J. H., Kim, T. Y. and Kim, K. M. 2014. Study of the antioxidant and alcohol-degrading enzyme activities of soybean sprout sugar solutions. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **46**, 581-587.
 24. Kim, K. M., Park, M. H., Kim, K. H., Im, S. H., Park, Y. H. and Kim, Y. N. 2009. Analysis of chemical composition and in vitro anti-oxidant properties of extracts from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). *J. Appl. Biol. Chem.* **52**, 58-64.
 25. Kim, S. M., Kang, S. H., Ma, J. Y. and Kim, J. H. 2006. A study on the extraction and efficacy of bioactive compound from *Hovenia dulcis*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **21**, 11-15.
 26. Koivula, T. and Koivusalo, M. 1975. Different from of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochim. Biophys. Acta.* **397**, 9-23.
 27. Lee, K. S., Kim, G. H., Seong, B. J., Kim, H. H., Kim, M. Y. and Kim, M. R. 2009. Effects of aqueous medicinal herb extracts and aqueous fermented extracts on alcohol-metabolizing enzyme activities. *Kor. J. Food Preserv.* **16**, 259-265.
 28. Lee, M. H., Kim, M. S., Shin, H. G. and Sohn, H. Y. 2011. Evaluation of antimicrobial, antioxidant, and antithrombin activity of domestic fruit and vegetable juice. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 146-152.
 29. Lee, S. J., Chung, M. J., Shin, J. H. and Sung, N. J. 2000. Effect of natural plant components on the nitrite-scavenging. *J. Fd. Hyg. Safety* **15**, 88-94.
 30. Marklund, S. and Marklund, G. 1975. Involvement of superoxide aminoradical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 468-474.
 31. Maxon, E. D. and Rooney, L. W. 1972. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chem.* **49**, 719-729.
 32. Na, H. S., Kim, J. Y., Yun, S. H., Park, H. J. and Choi, G. C. 2013. Phytochemical contents of agricultural products cultivated by region. *Kor. J. Food Preserv.* **20**, 451-458.
 33. Oshima, S., Ojima, F., Sakamoto, H., Ishiguro, Y. and Terao, J. 1998. Supplementation with carotenoids inhibits singlet oxygen-mediated oxidation of human plasma low-density lipoprotein. *J. Agr. Food Chem.* **44**, 2306-209.
 34. Park, H. J., Song, J. Y., Chea, K. S., Lee, H. K. and Choi, H. R. 2012. Quality characteristics and functional components of bokbunja (Black Raspberry) juice. *Food Eng. Pro.* **16**, 52-57.
 35. Park, H. S. 2010. Physicochemical property and antioxidant activity of wild grape (*Vitis coignetia*) juice. *Kor. J. Culinary Res.* **16**, 297-304.
 36. Park, S. Y., Kim, M. J., Park J. I., Kim, J. I. and Kim, M. J. 2016. Effect of low temperature storage on proteolytic and antioxidant activities of fresh pineapple and kiwi juices extracted by slow-speed masticating household juicer. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **45**, 1316-1323.
 37. Polazza, P., Simone, R. E., Catalano, A. and Mele, M. C. 2011. Tomato lycopene and lung cancer prevention: From experimental to human studies. *Cancers* **3**, 2333-2357.
 38. Racker, E. 1955. Alcohol dehydrogenase from bakers yeast. *Methods Enzymol.* **1**, 500-506.
 39. Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152-178.
 40. Son, C. Y., Jung, Y. J., Lee, I. H., Kyoung, J. H., Lee, J. W. and Kang, K. K. 2011. Studies on genetic variation of soluble solids, acidity and carotenoid contents in tomato fruits from germplasm. *Kor. J. Plant Res.* **24**, 195-199.
 41. Vallverdu-Queralt, A., Medina-Rejon, A. and Andres-Lacueva, C. 2011. Changes in phenolic profile and antioxidant activity during production of diced tomatoes. *Food Chem.* **126**, 1700-1707.
 42. Weisz, A., Cicatiello, I. and Esumi, H. 1996. Regulation of the mouse inducible type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* **316**, 209-215.
 43. Wootton-Beard, P., Moran, A. and Ryan, L. 2011. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABRS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Res. Int.* **44**, 217-224.
 44. Youn, E. H., Paik, J. K. and Kim, B. S. 2015. Utilization of Korea national health and nutrition examination survey database: Estimation of tomato consumption and the risk of metabolic syndrome. *Food Eng. Prog.* **18**, 109-115.

초록 : LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 대한 흑색 방울토마토 주스의 항염증 효과

정경임¹ · 하나연^{2,3} · 최영주^{1*}

(¹신라대학교 식품영양학과, ²한국전통발효문화연구원, ³경성대학교 교육학과)

본 연구에서는 흑색 방울토마토 주스의 항산화 활성, 아질산염 소거능, 알코올 분해능, 및 RAW 264.7 세포에서의 항염증 활성에 미치는 영향을 알아보았다. 흑색 방울토마토 주스의 총 페놀 함량은 156.83 µg TAE/ml로 나타났다. 토마토주스의 항산화활성은 DPPH 라디칼 소거능과 SOD 유사활성으로 측정하였다. 토마토주스의 DPPH radical 소거능은 농도의존적으로 현저히 증가하였으며 40%의 농도에서의 83.39%로 나타났다. SOD 유사활성은 100% 농도에서의 SOD 유사활성은 22.01%로 나타났다. 흑색 방울토마토 주스의 숙취 해소능을 알아보기 위하여 체내 알코올 대사의 일차 효소인 ADH 활성 및 아세트알데히드를 분해하는 ALDH 활성을 알코올 분해와 숙취해소에 효과가 있는 것으로 알려진 hepos를 대조구로 하여 분석한 결과, ADH 활성 및 ALDH 활성 모두 농도 의존적으로 증가하였으며($p < 0.05$), 40% 농도에서의 ADH 활성과 ALDH 활성은 각각 198.87%와 181.89%로 높은 활성을 보였다. 아질산염 소거능 분석에서는 흑색 방울토마토 주스 50% 농도, pH 1.2, 3.0, 6.0에서 각각 85.06, 58.25, 43.68%로 pH가 낮을수록 아질산염 소거능이 증가하는 것으로 나타났다. 흑색 방울토마토 주스의 항염증 활성을 측정하기 위하여 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 대식세포의 NO 합성을 측정한 결과 농도 10%에서의 NO 합성은 1.28%로 LPS 처리군(7.79%)보다 83.57% 현저하게 감소하였다($p < 0.05$). 이상의 결과에서와 같이 흑색 방울토마토 주스는 항산화 활성과 알코올 분해능 및 항염증 효과가 높은 것으로 나타났기에 기능성 식품으로서의 가치가 높을 것으로 판단된다.