

Analysis of Physiological Activity and Cytotoxicity of Fermented and Hot Water Extracts Using Residues after Onion Harvest

Tae-Won Kim^{3,4}, Geon-Hee Lee¹, Byeong-Gyun Jeon² and Sung-Ho Lee^{1,3*}

¹Division of Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

²Department of Biology Education, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

³Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

⁴Incheon International Airport Regional Office, Animal and Plant Quarantine Agency, Incheon 22382, Korea

Received July 27, 2018 / Revised September 10, 2018 / Accepted September 11, 2018

In order to utilize the residue that is thrown away after an onion harvest, we analyzed the physiological activity and cytotoxicity of fermented and hot water extracts of the residue. The pH of the extracts were all acidic, and organic matter content was 0.75% in the fermented extract and four times more than 0.19% in the hot water extract. The contents of nitrogen, phosphoric acid, calcium, and magnesium components, except for the potassium component among macroelements, were higher in the fermented extract than in the hot water extract. The content of iron and silicon among the microelements was also higher in the fermented extract than in the hot water extract. In addition, the content of boron was higher in the hot water extract than in the fermented extract. The total polyphenol contents of the fermented and hot water extracts were $16.2 \pm 3.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and $14.6 \pm 1.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively, which was $1.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ higher in the fermented extract than in the hot water extract. However, the total flavonoid contents of the fermented and hot water extracts were $0.1 \pm 0.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and $4.8 \pm 0.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively, which was $4.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ higher in the hot water extract than in the fermented extract. DPPH and ABTS radical scavenging ability for antioxidant activity were higher in the hot water extract than the fermented extract. The cytotoxicity of the extract using MTT assay showed cell viability of 101.6% and 97.9% in the fermented and hot water extracts, respectively. It was confirmed that there was no cytotoxicity in either extract.

Key words : Cytotoxicity, onion residues, physiological activity, waste resource

서론

양파(*Allium cepa* L.)는 백합과의 식물로서 독특한 향기와 풍미로 인해 오래 전부터 우리 식생활에 중요한 조미 채소로 사용되어 왔다. 또한 양파에 존재하는 flavonoid 계 성분인 quercetin, rutin 등과 유기 황 화합물인 allyl propyl disulfide 및 diallyl disulfide 등은 항산화 및 항암 효과가 높은 것으로 알려져 있다[10, 12, 16, 29]. 이와 같은 다양한 기능성 물질을 함유한 양파의 소비량이 증가함에 따라 재배면적도 증가하는 추세이며, 이로 인한 양파 수확 후 잔재물도 많은 양이 포장에 버려지고 있는 실정이다. 양파 잔재물들은 대부분 수분이 많아 퇴비화하기가 어렵고 매몰하기도 쉽지 않을 뿐만 아니라 연작지에 발생되기 쉬운 전염성 병원균에 노출되어 다음 작기

에 큰 피해를 줄 수 있다[20].

이와 같이 농업현장에서 발생하는 수확 후 잔재물과 같은 농업부산물들이 대부분 소각, 방치, 폐기되고 있지만 이들은 비료 성분이 낮고 유기물 함량은 높아 친환경적 생물성 폐자원으로서 고부가가치를 지니고 있다. 따라서 이들을 이용한 자원화 기술 개발이 필요한 실정이다[34]. 양파 부산물의 폐자원 활용은 대부분 간 양파 유통을 위해 가공 시 발생하는 양파 껍질을 주로 활용하였고[10, 14], 양파의 수확 후 버려지는 잔재물을 폐자원으로 활용한 연구는 양파 수확 후 잔재물과 쇠비름으로부터 수액을 열분해 추출한 다음 이들을 혼합시켜 관행 양파와 유기농 양파 재배 시 액비로 활용한 보고가 있다[18, 19].

식물의 화학성분은 재료의 처리 조건 및 추출방법에 따라 유효물질의 함량이나 생리 활성이 다르게 나타나므로, 식물 화학성분의 추출 효율을 증가시키기 위해 여러 가지 방법이 활용되고 있다. 그중 열수 추출은 가열 동안 다양한 화학적 변화에 의해 생리활성물질이 증가된다는 보고가 있고[8, 28], 발효 추출은 식물 화학성분의 생리 활성을 극대화시킬 수 있으며, 최종 대사산물의 성분 변환 혹은 식물 화학성분과 미생물 상호 간의 상승효과에 의한 생리 활성 효능 증가 등의 결과를 나타낸다고 보고되고 있다[7, 11].

*Corresponding author

Tel : +82-55-772-1346, Fax : +82-55-772-1349

E-mail : leesh@gnu.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.

따라서 본 연구에서는 폐자원으로서 활용가치를 위해 양파 수확 후 버려지는 잔재물로부터 추출한 발효 추출물과 열수 추출물의 생리 활성과 세포독성을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

공시재료 및 식물액 추출과 농축

본 실험에 사용된 재료는 경상남도 사천시에서 재배된 양파 (파워볼 품종) 수확 후 버려진 잔재물을 5 cm 정도의 길이로 절단하여 사용하였다. Effective microorganisms (EM) 발효 추출물은 절단한 양파 잔재물 8 kg과 EM 미생물 균(Ever miracle, Korea) 1 l, 흑설탕 3 kg, 증류수 40 l를 혼합하여 30일 동안 실온에서 숙성 후 추출하였다. 열수 추출물은 절단한 잔재물 4 kg을 증류수 20 l에 담아 100°C에서 4시간 동안 농축 추출기(DM-3000, Daehanmedian, Korea)를 이용하여 추출하였다. 추출물을 여과지(No. 2, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)로 3 회 거른 후, 감압 농축기(N-1200A, EYELA, Japan)를 사용하여 60°C에서 감압 농축하여 수분을 완전히 제거하였다. 수분을 제거하고 남은 고형분은 건조 함량법을 이용하여 수율을 측정 후, 각 추출물을 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 필요한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

추출물의 화학성분 분석

발효 추출물과 열수 추출물의 성분 분석은 농촌진흥청 비료 품질검사 방법 및 시료채취기준에 준하여 분석하였다. 산도는 pH meter (SevenEasy S20, Mettler, Switzerland)로 측정하였고, 질소는 황산으로 분해 후 Kjeldahl 증류법(K-355, Buchi, Germany), 인산은 비색법(UV-1800, Shimadzu, Japan)으로 분석하였으며, 나머지 칼륨, 칼슘 및 미량원소들은 유도 결합 플라즈마 분석기(Inductively coupled plasma spectrometer, Blue, Germany)로 각각 측정하였다. 유기물 함량은 Tyurin 법으로 측정하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법[2]을 일부 변형하여 측정하였다. 96 well plate에 각 추출물 10 µl와 2% Na₂CO₃ 용액 180 µl를 첨가하여 3분간 정치시킨 후 다시 1 N folin-ciocalteu's reagent를 10 µl 첨가하여 충분히 혼합시켜 실온 암실에서 다시 40분간 정치한 후 Multimicroplate reader-SpectraMax M5 (Molecular Devices, USA)를 이용하여 750 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid를 사용하였으며, 추출물의 총 폴리페놀 함량은 시료 g 당 mg의 gallic acid로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 측정

추출물의 총 플라보노이드의 함량은 Jia 등[13]의 방법을 변

형하여 측정하였다. 96 well plate에 각 추출물 25 µl, 증류수 100 µl와 5% NaNO₂ 용액 7.5 µl를 첨가한 후 5분간 정치하였다. 10% AlCl₃·6H₂O 용액 15 µl를 첨가하고 다시 5분간 정치한 후 1 M NaOH 100 µl를 첨가하여 실온 암실에서 10분간 반응시킨 다음 Multimicroplate reader-SpectraMax M5 (Molecular Devices, USA)를 사용하여 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 (+)-catechin hydrate를 사용하였으며, 추출물의 총 플라보노이드 함량은 시료 g 당 mg (+)-catechin hydrate로 나타내었다.

DPPH를 이용한 radical 소거 활성 측정

1,1-diphenylpicryl hydrazyl (DPPH) radical 소거 활성능은 Brand-Williams 등[4]의 방법을 변형하여 측정하였다. 96 well plate에 각 추출물 50 µl와 0.15 mM DPPH 용액 200 µl를 첨가하여 실온 암실에서 30분 동안 반응시킨 후 Multimicroplate reader-SpectraMax M5 (Molecular Devices, USA)를 사용하여 517 nm 파장에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 표준물질은 ascorbic acid를 사용하였으며, 대조군은 methanol과 DPPH 용액의 흡광도와 비교하였다. 각 시료별 IC₅₀ (Inhibitory concentration 50%)은 DPPH의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 하였다.

ABTS를 이용한 radical 소거 활성 측정

2,2'-azino bis (3ethylbenzothiazoline-6sulfonic acid) (ABTS) radical 소거 작용을 이용한 항산화력 측정은 ABTS cation decolorization assay 방법을 따랐다[30]. 7 mM의 ABTS diammonium salt와 2.4 mM potassium persulfate 용액을 혼합 후 암실에서 4시간 동안 정치하여 ABTS radical을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.7(±0.02)이 되도록 몰흡광계수($\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 이용하여 에탄올로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 225 µl와 각 추출물 25 µl를 첨가한 후, Multimicroplate reader-SpectraMax M5 (Molecular Devices, USA)를 사용하여 734 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 대조구로는 BHA와 ascorbic acid를 사용하였고, 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 radical 소거능(IC₅₀)으로 표시하였다.

MTT assay를 이용한 추출물의 세포독성조사

추출물의 세포독성 유무를 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 수행하였다. 세포주 macrophage RAW 264.7는 세포주 은행(KCLB No40071, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 Dublecco's Modified Eagle Medium (Gibco, MD, USA)에 penicillin-streptomycin 100 unit/ml와 10% fetal bovine serum (Gibco, MD, USA)을 첨가하여 사용하였다. 세포주는 37°C, 5% CO₂ incubator (Thermo Scientific, IL,

USA)에서 2일 간격으로 계대 배양하였다[15]. 세포 생존을 측정 위해 RAW 264.7 세포주를 96 well plate에 2×10^5 cells/ml이 되도록 100 μ l씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후, 배지를 제거한 뒤 각 추출물을 농도별(0 ~ 5,000 μ g · ml⁻¹)로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 이 plate에 다시 CellTiter 96[®] aqueous-non-radioactive cell proliferation assay reagent (Promega, WI, USA)를 첨가한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 반응시켜 Multimicroplate reader-SpectraMax M5 (Molecular Devices, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 측정하였다. 처리군의 MTT 값은 대조군을 100%로 기준하여 생존력 감소로 표시하였다[27].

통계분석

산출된 값의 평균과 표준편차는 엑셀(Microsoft office 2010, Microsoft, USA) 프로그램을 이용하여 산출하였고, 처리 간의 차이 유무를 확인하기 위해 SPSS 통계 프로그램(Statistical Package for the Social Science, ver. 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 one-way ANOVA (Analysis of Variation)로 분석 후 Duncan's multiple range test로 유의적 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

추출물의 화학성분 분석

양파의 수확 후 잔재물로부터 발효 추출물과 열수 추출물의 화학성분을 분석하여 Table 1에 나타내었다. pH는 추출물마다 차이가 났으며 발효 추출물의 경우 pH 3.05로 산성을 나타내었고, 열수 추출물은 발효 추출물보다 1.88 높은 pH 4.93으로 역시 산성을 나타내었다. EM 용액을 이용한 발효 추출물의 pH는 3.5 이하라고 보고하였는데[9], 본 연구의 EM 발효 추출물도 pH 3.5 이하로 나타내었다. 토마토 부산물(잎, 줄기, 열매 등)에 부엽토와 천일염을 첨가하여 3개월 이상 발효 추출한 용액의 pH는 5.62라고 보고했는데[6], 이는 본 연구의 발효 추출물 보다 pH가 2.57 높았다. 열수추출에서는 농산물 부산물의 하나인 비상품 양파만 200 kg을 탄화로에 넣고 250~300°C에서 가열하여 추출된 수액의 pH가 3.9라고 보고하였는데[20], 이는 본 연구에 사용한 양파 수확 후 잔재물 4 kg 으로부터 100°C에서 4시간 가열하여 추출된 수액보다 pH가

1.03 낮았다. 이것은 발효나 열수에 사용된 재료와 첨가물, 추출방법에 따라 pH가 다르게 나타나는 것으로 사료된다. 유기물 함량은 발효 추출물에서 0.75%로 열수 추출물의 0.19% 보다 4배 정도 많이 함유하고 있었는데, 이는 EM 미생물을 이용한 발효과정에서 미생물 자체 유기물과 양파 잔재물의 유기물이 섞여 상호 간의 상승효과가 나타났을 것으로 사료된다.

다량원소 중 질소, 인산, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 성분의 함량은 발효 추출물에서 각각 0.03%, 0.05%, 0.03%, 0.033%, 0.012% 였으나 열수 추출물에서는 각각 0.01%, 0.03%, 0.03%, 0.014%, 0.0072%로 나타내어 칼륨의 함량을 제외하고 발효 추출물에서 열수 추출물 보다 높게 나왔다(Table 1). 비상품 양파 구의 열수추출로 나온 수액에서 질소, 인산, 칼륨, 칼슘, 마그네슘의 함량이 각각 0.04%, 0.08%, 0.03%, 0.03%, 0.01%라고 보고했는데[20], 이는 본 실험과 비교했을 때 칼륨, 칼슘, 마그네슘의 함량은 동일했지만 질소와 인산의 함량은 본 실험보다 조금 높게 나왔다.

미량원소 중 철과 규소의 함량은 발효 추출물에서 21 mg·kg⁻¹으로 동일하게 함유되었고 열수 추출물에서는 각각 16 mg·kg⁻¹ 과 13 mg·kg⁻¹ 함량으로 발효 추출물 보다 낮게 함유되었다. 반면에 붕소는 열수 추출물에서 24 mg·kg⁻¹으로 발효 추출물의 18 mg·kg⁻¹ 보다 6 mg·kg⁻¹ 높게 검출되었고, 망간은 발효 추출물에서만 0.2 mg·kg⁻¹ 검출되었고 열수 추출물에서는 검출되지 않았다. 아연, 몰리브덴, 구리는 발효 추출물과 열수 추출물 모두에서 검출되지 않았다(Table 1). 비상품 양파 구의 열수추출로 나온 수액에서 철의 함량은 21.85 mg·kg⁻¹으로 본 실험의 발효 추출물과 유사한 결과가 나왔고 붕소는 100 mg·kg⁻¹으로 본 실험의 열수 추출물 보다 76 mg·kg⁻¹ 높게 나왔다. 또한 본 실험에서 검출되지 않았던 아연, 망간, 몰리브덴, 구리가 각각 23.05 mg·kg⁻¹, 1.78 mg·kg⁻¹, 1.97 mg·kg⁻¹, 1.24 mg·kg⁻¹ 이 검출되었다고 보고 하였다[20]. An 등[1]은 8종의 식물 부산물들을 각각 사용하여 부엽토, 고두밥을 이용한 토착미생물, 시·군 센터에서 보급하는 미생물 또는 시판 미생물과 당밀 또는 흑설탕을 각각 첨가하여 농가에서 자가 제조한 발효액들의 다량원소와 미량원소 성분들을 분석하여 평균값을 보고하였다. 질소(0.2±0.16%)와 칼륨(0.19±0.24%)은 본 발효 추출물 보다 높게 나왔으나 인산(0.02±0.03%)과 칼슘(0.01±0.01%)은 본 발효 추출물보다 함량이 낮게 나왔고 마그네슘(0.01±0.01%)의 함량은 본 발효 추출물과 유사하였다. 철(17.39±21.63 mg·kg⁻¹)의 함량은 본 발효 추출물에서 높게 나왔으나 본 발효

Table 1. Chemical composition of fermented and hot water extracts using residues after onion harvest

Extract	pH	OM ¹⁾	T-N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO	mg·kg ⁻¹ (w/v)						
								Zn	Mn	B	Fe	Mo	Si	Cu
Fermentation	3.05	0.75	0.03	0.05	0.03	0.033	0.012	ND ²⁾	0.2	18	21	ND	21	ND
Hot water	4.93	0.19	0.01	0.03	0.03	0.014	0.0072	ND	ND	24	16	ND	13	ND

¹⁾OM: organic matter. ²⁾ND: not detected.

추출물에서는 검출되지 않았던 마그네슘, 아연, 구리는 아주 극소량이 검출되었다고 보고하였다. Lee 등[21]은 대두박 또는 쌀겨를 이용하여 유기액비 제조 시 발효기간 중 pH의 변화는 감소하다가 후기에 안정화되고 질소, 인산, 칼륨 등은 발효가 진전됨에 따라 용출량이 증가하는 반면에 칼슘, 마그네슘 등은 발효 4주 차 이후에는 거의 변화가 없었다고 보고하였다. 따라서 식물체 부산물의 유용성분을 추출하기 위해 사용하는 방법과 조건 그리고 부재료 등의 차이로 인해 추출물 성분 함량의 차이가 조금씩 나타날 수 있다고 사료된다.

총 폴리페놀 함량

항산화 효과와 밀접한 관계가 있는 총 폴리페놀 함량을 gallic acid를 표준용액으로 조사하여 Table 2에 나타내었다. 양파 발효 추출물에서 총 폴리페놀 함량은 16.2±3.3 mg·g⁻¹로서 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량의 14.6±1.4 mg·g⁻¹ 보다 1.6 mg·g⁻¹ 높은 함량을 나타내었다. 양파의 총 페놀 함량분석은 대부분 양파 껍질을 벗긴 과육을 이용하여 에탄올이나 메탄올 또는 열수 추출물들을 분석하였는데 그 함량들의 차이가 많이 달랐다. Kim 등[17]은 양파의 에탄올 추출물에서 총 폴리페놀 함량이 69.07±1.42 mg·g⁻¹으로 나왔다고 보고하였고, Chang 등[5]은 양파의 열수 추출물과 에탄올 추출물에서 총 폴리페놀 함량이 각각 94.35 mg·g⁻¹과 88.90 mg·g⁻¹으로 나왔다고 보고하였다. 이는 본 실험의 결과 보다 총 폴리페놀 함량이 높게 나왔다. 반면에 Yang & Park [35]은 흑양파의 온수 추출물에서 총 폴리페놀 함량이 13.50 mg·g⁻¹라고 보고했고, Jeong 등 [12]은 황색과 자색양파의 에탄올 추출물에서 총 폴리페놀 함량이 각각 0.319 mg·g⁻¹과 0.248 mg·g⁻¹라고 보고하였는데, 이는 본 실험의 결과 보다 총 폴리페놀 함량이 낮게 나왔다. 이는 양파 품종 특성, 실험절차, 추출방법 등이 다르기 때문에 각 결과들 간의 차이가 있다고 사료된다.

총 플라보노이드 함량

Catechin을 표준물질로 사용하여 분석한 총 플라보노이드 함량은 Table 2에 나타내었다. 양파 열수 추출물의 총 플라보노이드 함량은 4.8±0.7 mg·g⁻¹로서 발효 추출물의 함량인 0.1±0.1 mg·g⁻¹ 보다 4.7 mg·g⁻¹ 높은 함량을 나타내어 열수 추출물이 발효 추출물보다 높게 나타내었다. 양파의 총 플라보노이드 함량은 대부분 과육이나 껍질을 사용하여 측정하였으나, Marinova 등[24]은 양파의 잎과 줄기로부터 총 플라보

노이드 함량을 측정하여 보고하였다. 이것은 본 실험에서 사용한 양파 수확 후 버려지는 잔재물인 잎과 줄기로부터 추출한 것과 유사한 재료를 사용하였다. 이들은 양파 잎과 줄기의 메탄올 추출물에서 본 실험과 동일한 catechin을 표준물질로 사용하여 측정하였는데, 총 플라보노이드 함량은 잎과 줄기에서 각각 0.117 mg·g⁻¹과 0.025 mg·g⁻¹이라고 보고하였다. 이는 본 실험의 결과인 열수 추출물의 4.8±0.7 mg·g⁻¹ 보다 적게 함유되었고 발효 추출물의 0.1±0.1 mg·g⁻¹과는 유사한 결과를 보였다. 이것은 추출방법과 표준물질 종류에 따라 함량의 차이가 났을 것으로 사료된다. 양파 과육의 총 플라보노이드 물질 추출방법은 열수 추출[5, 31], 에탄올 추출[5, 25, 31], 메탄올 추출[3, 24], acetone/methylene chloride 추출[10], 에틸아세테이트 추출[31], 과육즙 추출[23]등 여러 가지 방법들을 사용하였고 추출방법에 따라 총 플라보노이드 함량이 다르게 보고되었다. 양파의 총 플라보노이드 함량 측정을 위해 사용되는 표준물질들은 quercetin [3, 23, 25, 31]을 많이 사용하였으며, 그 외 narigin [5], rutin [10], catechin [24]을 사용하여 함량을 나타낸 것도 보고되었다.

DPPH를 이용한 radical 소거 활성

항산화 능력을 측정하기 위하여 DPPH를 이용한 radical 소거 활성을 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. DPPH radical을 50% 감소하는데 필요한 추출물의 농도를 IC₅₀ (Inhibitory concentration 50%) 값으로 하여 살펴보면 양파 발효 추출물은 561.4 µg·ml⁻¹, 열수 추출물은 283.8 µg·ml⁻¹ 농도를 보임으로 열수 추출물이 발효 추출물 보다 항산화력이 높은 것으로 나타났다. Kim 등[17]도 DPPH radical을 50% 감소시키는 IC₅₀ 값을 조사하였는데 양파의 에탄올 추출물에서 28.04±0.33 mg·ml⁻¹ 라고 보고하였다. 이는 본 실험 결과보다 항산화 활성이 현저히 낮게 나타났다. Chang 등[5]은 양파의 과피를 제거한 과육의 열수 추출물과 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능을 조사한 결과 양파 에탄올 추출물에서 21.80%, 양파 열수 추출물에서 18.26%를 나타내어 에탄올 추출물이 열수 추출물 보다 radical 소거 활성이 높았다고 보고했고, Yang & Park [35]은 흑양파 추출물의 DPPH radical 소거능을 조사한 결과 물 추출물(65.98%)이 에탄올 추출물(47.77%)과 메탄올 추출물(30.84%) 보다 활성이 높았다고 보고했다. 이와

Table 2. Polyphenol and flavonoid contents in fermented and hot water extracts using residues after onion harvest

Extract	Total polyphenol (gallic acid mg·g ⁻¹)	Total flavonoid (catechin mg·g ⁻¹)
Fermentation	16.2±3.3	0.1±0.1
Hot water	14.6±1.4	4.8±0.7

Results are shown as mean ± SD (n=3).

Table 3. Antioxidant activities of fermented and hot water extracts using residues after onion harvest

Extract	Antioxidant activity (IC ₅₀)	
	DPPH (µg·ml ⁻¹)	ABTS (µg·ml ⁻¹)
Fermentation	561.4	1204.0
Hot water	283.8	779.1

DPPH: 1,1-diphenylpicrylhydrazyl

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

IC₅₀: Inhibitory concentration 50.

같이 DPPH를 이용한 radical 소거 활성 측정은 천연 항산화제의 free radical 소거 활성을 평가하는데 일반적으로 사용되고 있다.

ABTS를 이용한 radical 소거 활성

양파 수확 후 잔재물 추출물의 ABTS를 이용한 radical 소거 활성을 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. 각 추출물의 IC₅₀ (Inhibitory concentration 50%) 값을 살펴보면 양파 발효 추출물은 1,204.0 µg · ml⁻¹, 열수 추출물 779.1 µg · ml⁻¹의 농도를 보임으로 DPPH를 이용한 radical 소거 활성의 결과와 마찬가지로 항산화 능력은 열수 추출물이 발효 추출물 보다 높은 것으로 나타났다. Lee 등[22]은 양파즙 추출에서 열처리 온도가 증가할수록 ABTS radical 소거능이 증가하였다고 보고하였고, Yang & Park [36]도 흑양파 물 추출물에서 ABS radical 소거능을 측정한 결과 70°C와 80°C보다 90°C에서 제조한 흑양파 물 추출물에서 항산화력이 증가했으며, 열처리 온도가 증가할수록 항산화력이 증가한다고 보고하였다. 양파의 종류별 항산화력 조사는 Zhang 등[37]이 색깔이 다른 세 가지 타입의 양파 에탄올 추출물 중에서 적색 양파 추출물의 항산화 활성이 황색 양파 추출물이나 흰색 양파 추출물 보다 높았다고 보고하였다. Joung & Jung [14]은 1차 가공 후 발생하는 양파 가공 부산물인 껍질에서 실제 산업체에서 활용 가능한 추출조건으로 다양한 생리 활성 변화를 확인했는데 ABTS assay를 통한 총 항산화력 측정에서 양파껍질 추출 횟수에 따라 다양했으나 1회차 추출물에서 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다고 보고하였다. 이와 같이 비교적 안정적인 free radical로서 ABTS radical 소거 활성은 항산화제 유무를 확인하는 방법으로 DPPH assay와 함께 일반적으로 사용되고 있다.

MTT assay를 이용한 추출물의 세포독성

양파 수확 후 잔재물 추출물의 세포독성 유무를 확인하기

위해 MTT assay를 수행하였다. MTT assay는 살아있는 세포에서 미토콘드리아의 NAD(P)H 의존적인 oxidoreductase가 노란색의 MTT 용액을 환원시켜 보라색의 formazan을 형성하는 것을 흡광도로 측정하는 방법이다[32]. RAW 264.7 세포주를 이용하여 추출물의 단계별 농도(15~5,000 µg · ml⁻¹)에 따른 세포 생존율을 측정한 결과들을 Fig. 1에 나타내었다. 제일 낮은 농도인 15 µg · ml⁻¹에서 발효 추출물이 106.5%, 열수 추출물 99.7%의 세포 생존율을 보였고, 제일 높은 농도인 5,000 µg · ml⁻¹에서 발효 추출물이 100.1%, 열수 추출물 96.4%의 생존율을 보여 두 추출물의 모든 농도에서 세포독성이 없는 것으로 확인되었다. 전체적으로는 모든 농도에서 양파 발효 추출물이 열수 추출물 보다 세포 생존율이 높았다. Wang 등[32]은 Welsh 양파 그린잎 추출물을 RAW 264.7 세포주에 처리하여 MTT assay를 이용한 세포 생존율을 조사하였다. Lipopolysaccharide 1 µg · ml⁻¹이 첨가된 배지에 추출물 50~500 µg · ml⁻¹ 범위의 농도 처리에서는 세포 생존율에 영향을 주지 않았고 추출물 1,000 µg · ml⁻¹의 농도처리에서는 17% 세포 생존율이 감소하였다고 보고하였다. 이는 본 실험에서 사용한 양파 수확 후 잔재물과 유사한 재료를 사용하였고 처리한 세포도 본 실험과 동일한 세포주를 사용하였는데 본 실험의 농도 보다 낮은 추출물 1,000 µg · ml⁻¹의 농도 처리에서 생존율이 본 실험 보다 더 낮은 것은 추출물의 추출방법과 배지에 첨가된 lipopolysaccharide가 세포 생존율에 영향을 미친 것으로 사료된다. 또한 양파 과육과 껍질 추출물들이 비장 세포의 증식 촉진[23], 위암 세포[10], 결장암 세포[10, 16], 유방암세포[33]의 억제, 지방전구세포의 분화를 억제하여 비만 억제[26] 등 다양한 세포들에 영향을 미쳤다고 MTT assay를 통해 보고되었다. 발효 추출물에 대한 세포독성 검사는 유산균 발효를 통한 황금 추출물이 인간 섬유아세포에 미치는 독성을 MTT assay를 이용하여 조사한 결과 황금 발효 에탄올 추출물의 농도가 1,000 µg · ml⁻¹일 때 9.8%로 가장 낮은 세포독성을

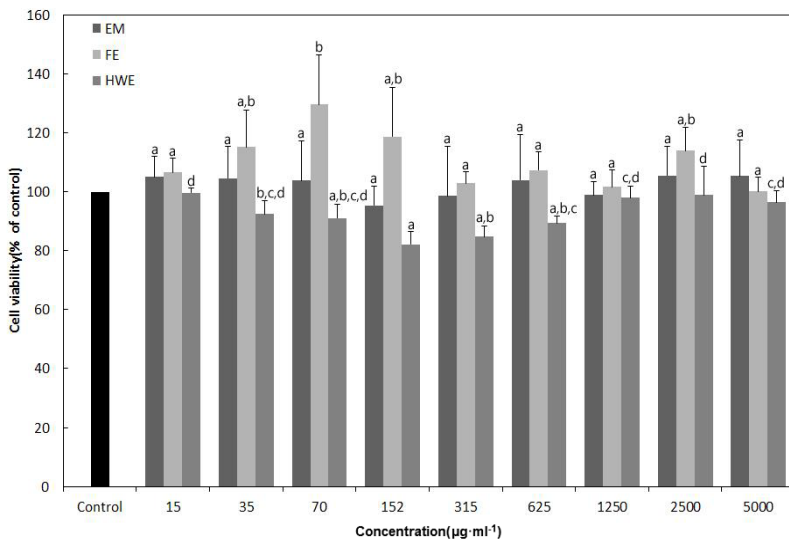


Fig. 1. Cytotoxic effects of fermented and hot water extracts using residues after onion harvest on cell line RAW 264.7. Cell viability was measured by the MTT assay. EM : effective microorganisms. FE : fermented extract. HWE : hot water extract. Results are shown as mean ± SD. Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

나타내었다고 보고하였다[7]. Doh 등[8]은 산마늘 발효 추출물의 섬유아세포의 생존율을 통해 세포독성을 계산한 결과 추출물 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 농도에서 98.95%의 생존율을 보였다고 보고하였다. 본 실험에서는 추출물 1,250 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 농도 처리에서 양파의 발효 및 열수 추출물의 세포 생존율이 이들의 결과와 유사하였다. 이는 양파의 수확 후 잔재물의 추출물이 향후 각종 소재로 이용 시에도 큰 문제가 없을 것임을 시사하고 있다.

감사의 글

이 연구는 2013년 농촌진흥청 특화작물연구개발사업(과제번호: PJ008842)의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

References

- An, N. H., Jo, Y. S., Jo, J. R., Kim, Y. K., Lee, Y., Jee, H. J., Lee, S. M., Park, K. L. and Lee, B. M. 2012. The survey of actual using conditions of farm-made liquid fertilizers for cultivating environment-friendly agricultural products. *Kor. J. Organic Agri.* **20**, 345-356.
- Appel, H. M., Govenor, H. L., D'Ascenzo, M., Siska, E. and Schultz, J. C. 2001. Limitation of folin assays of foliar phenolics in ecological studies. *J. Chem. Ecol.* **27**, 761-778.
- Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Crozier, A. and Aruoma, O. I. 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **84**, 1553-1561.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **28**, 25-30.
- Chang, M. S., An, S. J., Jeong, M. C., Kim, D. M. and Kim, G. H. 2011. Effects of antioxidative activities and antibrowning of extracts from onion, apple and mandarin orange peel as natural antibrowning agents. *Kor. J. Food Nutr.* **24**, 406-413.
- Cho, Y. S. 2015. Effect of application amount of liquid fertilizer produced from tomato residue on the fruit growth and composition of organic tomatoes. M.S. dissertation, Chungnam National University, Daejeon, Korea.
- Choi, W. S., Kwon, H. S., No, R. H., Choi, G. P. and Lee, H. Y. 2013. Enhancement of anti-inflammatory activities of fermented *scutellaria baicalensis* extracts using *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **39**, 303-311.
- Doh, E. S., Chang, J. P., Kil, K. J., Choi, M. S., Yang, J. K., Yun, C. W., Jeong, S. M., Jung, Y. H. and Lee, G. H. 2011. Antioxidative activity and cytotoxicity of fermented *Allium victorialis* L. extract. *Kor. J. Plant Res.* **24**, 30-39.
- Higa, T. 2001. Effective microorganisms in the context of Kyusei Nature Farming: a technology for the future. In: Senanayake YDA, Sangakkara UR(Eds.), Sixth International conference on Kyusei Nature Farming. pp. 40-43. Pretoria, South Africa.
- Jang, J. R. and Lim, S. Y. 2009. Effects of onion flesh and peel on chemical components, antioxidant and anticancer activities. *J. Life Sci.* **19**, 1598-1604.
- Jeon, B. S., Park, J. W., Kim, B. K., Kim, H. K., Jung, T. S., Hahm, J. R., Kim, D. R., Cho, Y. S. and Cha, J. Y. 2005. Fermented mushroom milk supplemented dietary fiber prevents the onset of obesity and hypertriglyceridemia in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Diabetes Obes Metab.* **7**, 709-715.
- Jeong, C. H., Kim, J. H. and Shim, K. H. 2006. Chemical components of yellow and red onion. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 708-712.
- Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.
- Joung, E. M. and Jung, K. H. 2014. Antioxidant activity of onion (*Allium cepa* L.) peel extracts obtained as onion byproducts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **46**, 364-368.
- Kim, C. H., Lee, M. A., Kim, T. W., Jang, J. Y. and Kim, H. J. 2012. Anti-inflammatory effect of Allium hookeri root methanol extract in LPS-induced RAW264.7cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1645-1648.
- Kim, J. M., Kim, J. S. and Park, E. J. 2013. Cytotoxic and anti-inflammatory effects of onion peel extract on lipopolysaccharide stimulated human colon carcinoma cells. *Food Chem. Toxicol.* **62**, 199-204.
- Kim, K. H., Kim, H. J., Byun, M. W. and Yook, H. S. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extract from six vegetables containing different sulfur compounds. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 577-583.
- Kim, T. W., Lee, C. H., Bak, Y. D., Min, Y. B. and Lee, S. H. 2015. Productivity and quality characteristics of onions applied with defective onion and purslane extracts during cultivation. *J. Agric. Life Sci.* **49**, 37-46.
- Kim, T. W., Jeon, B. G. and Lee, S. H. 2017. Effect of a mixture of extracts from residues of onion left after onion harvesting and purslane (*Portulaca oleracea*) on productivity and quality characteristics of organic onions. *J. Life Sci.* **27**, 1430-1436.
- Lee, C. H., Lee, S. D., Lee, S. H., Min, Y. B., Kim, H. R. and Lee, Y. H. 2013. Effect of defective onion extract on the onion productivity by organic farming. *Kor. J. Soil Sci. Fert.* **46**, 40-48.
- Lee, G. J., Jeon, J. O., Park, J. H., Nam, S. Y. and Kim, T. J. 2011. The manufacturing characteristics of organic liquid fertilizer with poultry manure, soybean meal, and rice bran. *J. Kor. Org. Agr.* **19**, 577-587.
- Lee, Y. R., Hwang, I. G., Woo, K. S., Kim, D. J., Hong, J. T. and Jeong, H. S. 2007. Antioxidative activities of the ethyl acetate fraction from heated onion (*Allium cepa*). *Food Sci. Biotechnol.* **16**, 1041-1045.
- Lin, J. Y. and Tang, C. Y. 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem.* **101**, 140-147.
- Marinova, D., Ribarova, F. and Atanassova, M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and*

- Metallurgy* **40**, 255-260.
25. Moon, J. S., Kim, H. D., Ha, I. J., Lee, S. Y., Lee, J. T. and Lee, S. D. 2010. Chemical component of red onion (*Allium cepa* L.) according to cultivars and growing areas. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **28**, 921-927.
 26. Moon, J. Y., Do, H. J., Kim, O. Y. and Shin, M. J. 2013. Antiobesity effects of quercetin-rich onion peel extract on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and the adipogenesis in high fat-fed rats. *Food Chem. Toxicol.* **58**, 347-354.
 27. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **64**, 55-63.
 28. Park, H. M. and Hong, J. H. 2014. Effect of extraction methods on antioxidant activities of *Mori ramulus*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 1709-1715.
 29. Ra, K. S., Suh, H. J., Chung, S. H. and Son, J. Y. 1997. Antioxidant activity of solvent extract from onion skin. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**, 595-600.
 30. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
 31. Shon, M. Y. and Park, S. K. 2006. Chemical components and nitrite scavenging activity of various solvent extract from onions. *Kor. J. Food Preserv.* **13**, 762-768.
 32. Wang, B. S., Chen, J. H., Liang, Y. C. and Duh, P. D. 2005. Effects of welsh onion on oxidation of low-density lipoprotein and nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7. *Food Chem.* **91**, 147-155.
 33. Wang, Y., Tian, W. X. and Ma, X. F. 2012. Inhibitory effects of onion (*Allium cepa* L.) extract on proliferation of cancer cells and adipocytes via inhibiting fatty acid synthase. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13**, 5573-5579.
 34. Won, K. Y. and Oh, K. K. 2009. Optimization the xylose fractionation conditions of pepper stem with dilute sulfuric acid. *KSBB J.* **24**, 361-366.
 35. Yang, Y. R. and Park, Y. K. 2011. Black onions manufactured via the browning reaction and antioxidant effects of their water extracts. *Kor. J. Food Preserv.* **18**, 310-318.
 36. Yang, Y. R. and Park, Y. K. 2011. Comparison of antioxidant activities of black onion extracts. *Kor. J. Food Preserv.* **18**, 954-960.
 37. Zhang, S. L., Deng, P., Xu, Y. C., Lü, S. W. and Whang, J. J. 2016. Quantification and analysis of anthocyanin and flavonoids compositions, and antioxidant activities in onions with three different colors. *J. Integr. Agric.* **15**, 60345-60347.

초록 : 양파 수확 후 잔재물을 이용한 발효 및 열수 추출물의 생리활성과 세포독성 분석

김태원^{3,4} · 이건희¹ · 전병균² · 이성호^{1,3*}

(¹경상대학교 생명과학부, ²경상대학교 생물교육학과, ³경상대학교 농업생명과학연구원, ⁴농림축산검역본부 인천공항지역본부)

본 연구에서는 양파 수확 후 버려지는 잔재물의 활용가치를 위해 이들로부터 추출한 발효 추출물과 열수 추출물의 생리활성과 세포독성을 분석하고자 하였다. 추출물의 pH는 모두 산성을 나타내었고, 유기물 함량은 발효 추출물에서 0.75%로 열수 추출물의 0.19% 보다 4배 많이 함유되었다. 다량원소 중 칼륨성분을 제외한 질소, 인산, 칼슘, 마그네슘성분의 함량은 발효 추출물에서 열수 추출물 보다 높게 나타내었고, 미량원소 중 철과 규소성분의 함량도 발효 추출물에서 열수 추출물 보다 높았으며, 반면에 붕소성분의 함량은 열수 추출물에서 발효 추출물 보다 높게 검출되었다. 총 폴리페놀 함량은 발효 추출물에서 $16.2 \pm 3.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 로 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량인 $14.6 \pm 1.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 보다 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 높게 나타내었다. 반면에 총 플라보노이드 함량은 열수 추출물에서 $4.8 \pm 0.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 로서 발효 추출물의 함량인 $0.1 \pm 0.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 보다 $4.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 높게 나타내었다. DPPH와 ABTS radical 소거능력은 모두 열수 추출물에서 발효 추출물 보다 높은 항산화력을 보였다. MTT assay를 이용한 추출물의 세포독성 실험에서는 발효 추출물과 열수 추출물에서 각각 101.6%와 97.9%의 세포생존율을 나타내어 두 추출물 모두 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.