

## 두류의 항산화활성 검정

남석현\* · 감미영<sup>1</sup>

아주대학교 생명과학과, <sup>1</sup>경북대학교 식품영양학과

(2002년 12월 2일 접수, 2003년 1월 10일 수리)

시판되고 있는 두류 13 종류의 70% 에탄올 추출물을 제조하여, 이들의 항산화 활성을 환원력, 지질과산화 억제 활성, superoxide radical 소거활성, hydroxyl radical 소거활성, mitomycin C로 유도된 DNA의 산화적 손상에 대한 억제활성을 지표로 조사하였다. 환원력은 예팔, 속피리, 유월콩 및 적두가 높았다. 지질과산화 억제능을 조사한 결과, linoleic acid 자동산화계를 이용한 실험계에서 모든 시료가 억제활성을 보인 반면, 토끼 적혈구막 지질과 산화에 대한 억제활성은 쥐눈이콩과 적두, 속피리에서만 관찰되었다. Superoxide radical 소거활성은 예팔, 나물콩, 적두, 쥐눈이콩에서 높게 나타났으며, hydroxyl radical 소거활성은 속피리, 청태, 예팔과 제비콩에서 높았다. Mitomycin C로 유도된 DNA의 산화적 손상에 대한 억제활성을 조사한 결과, 모든 품종들이 DNA의 산화적 손상을 억제할 수 있었으나, 특히 예팔, 쥐눈이콩, 나물콩, 녹두, 적두의 억제활성이 우수하였다. 이상의 실험 결과에서 예팔, 적두, 쥐눈이콩, 속피리가 환원력, 지질과산화 억제, superoxide radical 및 hydroxyl radical 소거활성, DNA의 산화적 손상에 대한 억제활성 등 항산화활성이 우수한 품종임을 알 수 있었다.

**Key words:** 두류, 환원력, 지질과산화, 라디칼 소거활성, DNA strand scission

### 서 론

최근 생활습관이 원인이 되는 만성질환이 사회적 문제가 됨에 따라 과실 채소류, 두류, 곡류가 가지고 있는 phytochemical의 생체조절 기능에 대한 관심이 높아지게 되었다. 식물성 식품으로부터 phenolic compound, alkaloids, terpenes, steroids, carotene 등이 대표적인 생체 기능성물질로서 발견되었으며, 이들이 가지는 암과 순환기 계통의 질병예방 및 치료효과와 같은 인체의 신진대사 조절 능력이 계속 밝혀지고 있다.<sup>1,2)</sup> 콩과 (leguminosae)에 속하는 식물군인 두류 (legumes)는 지방과 단백질원으로 이용되는 대두류, 땅콩류 그리고 지방 함량이 낮고 탄수화물원으로 이용되는 팥, 녹두, 완두와 그밖에 채소적 성질을 겸비하고 있는 강낭콩 등, 다양한 종류를 포함하고 있으며, 식단에서 취반 시 잡곡의 형태로 쌀과 혼용하거나 부식 소재로 다양하게 이용되는 친숙한 식물성 식품이다.

두류 중에서 일상적인 섭취가 가장 많은 대두 (*Glycin max*)에 포함된 성분인 phytic acid, triterpene, flavonoid, lignan 등 적어도 14 종류의 phytochemical이 암예방에 관여하고 있다고 알려져 있으며,<sup>3)</sup> 그밖에 protease inhibitors와 올리고당류와 식이 섬유 등도 인체에 생리활성 효과를 미치고 있음이 보고되어 있다.<sup>4,6)</sup> 이들 성분의 지속적인 섭취가 생활 습관병인 성인병의 예방과 밀접히 관련되어 있다는 결과가 보고되어 있지만, 이와 같은 생리활성 효과에 대해서는 두류 중에서도 단백질의 함량이 많은 품종인 대두에서 집중적으로 조사되어 있는 실정이다. 대두를 이용한 식품의 섭취 이외에도 기타 두류의 섭취도 무시

할 수 없는 수준으로서, 대표적으로 잠곡밥을 지을 때나 떡고물로 사용되는 팥에 생리활성 물질인 사포닌이 함유되어 있다는 보고 이외에 기타 두류 품종이 가지는 생리활성 효과에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다. 대두에서도 장류의 원료가 되는 백태 이외에도 종피의 색소함량 등의 변이를 보이는 품종이 존재하나 각각에 대한 건강기능성은 조사되어 있지 못하다. 쌀의 과잉생산과 소비감소, 그리고 쌀시장 개방으로 인한 농촌의 경제, 사회적 문제점을 해결하기 위해서는 재배 작물의 다양화를 통한 대체작물의 개발 및 향후 종자시장을 겨냥한 유전자원의 개발이 시급하다. 그러나 대체작물을 개발함에 있어서 단순한 영양공급원으로서가 아니라 각종 잘못된 생활습관에 기인한 만성질환을 예방할 수 있는 건강기능성식품으로서의 기능을 강조함으로써 단순 섭취뿐 아니라,<sup>4)</sup> 건강보조식품으로 개발될 수 있는 가능성에 대비하여야 하며, 특히 성인성 만성질환의 원인이 만성적인 염증반응일 경우가 많기 때문에 식품이 가지는 항산화활성에 주목할 필요가 있다.<sup>5)</sup> 이에 본 논문에서는 시중에 유통되고 있는 13종류 두류의 70% 에탄올 추출물을 대상으로 항산화활성의 지표인 환원력, 지질과산화 억제활성, superoxide radical 및 hydroxyl radical에 대한 소거활성 및 화학적 변이원으로 유발된 DNA의 산화적 손상에 대한 억제활성을 검정하여 두류의 건강기능성을 평가할 수 있는 지표를 제시하고자 하였다.

### 재료 및 방법

**시료 및 시약.** 표품으로 13 종류의 두류를 재래시장에서 구입하였다 (Fig. 1). 구입한 두류를 분쇄하여 10배량의 70% EtOH로 40°C에서 14시간 동안 교반 추출한 다음, 여과지 (Whatman No. 1)로 여과하여 70% 에탄올 추출물을 얻었다.

\*연락처

Phone: 82-31-219-2619; Fax: 82-31-219-1615  
E-mail: shnam@ajou.ac.kr

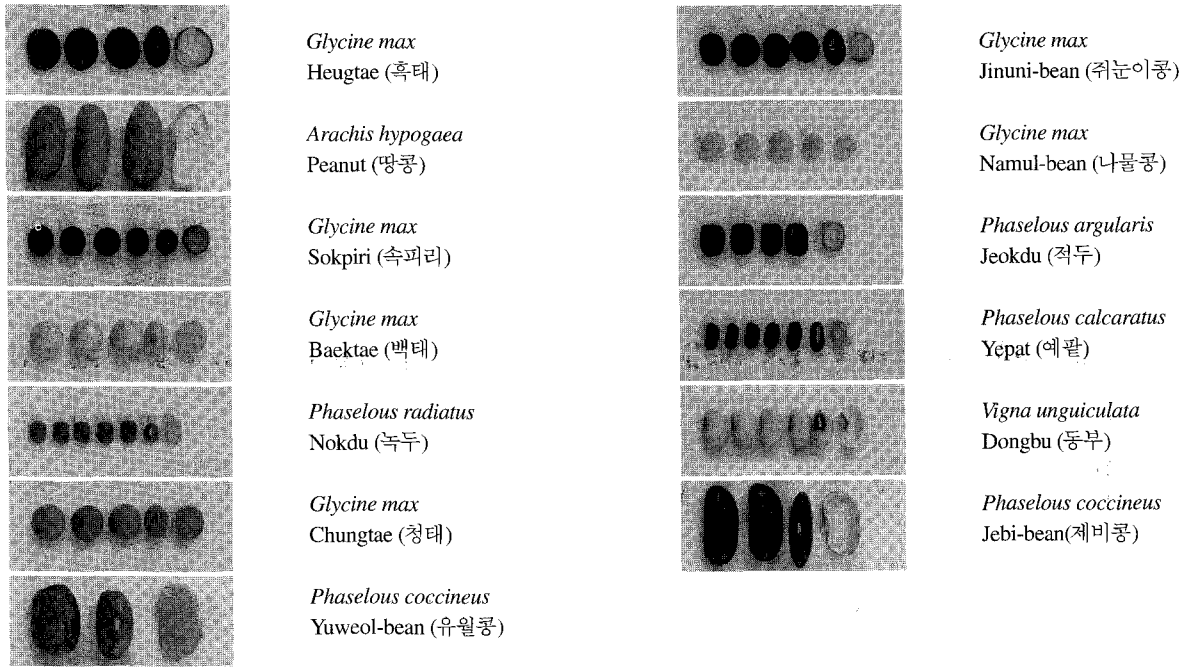


Fig. 1. The Shapes and Colors of Edible Legumes.

감압 건조하여 얻어진 추출물 분획을 dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해시켜 200 mg/ml 농도로 만들어 -20°C에서 냉동 보관하면서 사용하였다. 실험에 사용한 화학시약은 모두 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, ΦX174 RF DNA는 Gibco BRL사(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다.

**환원력의 측정.** Oyaizu 등의 방법<sup>6)</sup>에 의거하여 두류의 환원력을 측정하였다. 즉, 농도별로 조제한 시료 20 μl를 50 mM 인산 완충액(pH 6.6)과 1%의 potassium ferricyanide [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>]와 1.4:1로 혼합된 용액 1.2 ml에 첨가한 다음, 50°C에서 20분간 반응시킨다. 반응 후, 0.5 ml의 10% trichloroacetic acid를 첨가하고 3,000 rpm 10분간의 원심분리를 통하여 얻어진 상정액에 0.1%의 FeCl<sub>3</sub> 100 μl를 넣어서 발색반응을 유도시킨 다음, UV/VIS spectrophotometer(V-550, JASCO, Japan)를 사용하여 700 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

**지질과산화 억제활성의 측정.** Linoleic acid model system을 이용한 지질 과산화 억제효과는 0.13% linoleic acid 5 ml, 증류수 2.4 ml, 50 mM 인산완충액(pH 7.0) 5 ml 및 시료 100 μl를 cap tube에 넣고 40°C incubator에 10일간 보관한 후 지질 과산화 정도를 thiocyanate법<sup>7)</sup>에 의해서 다음과 같이 측정하였다. 반응액 100 μl에 4.7 ml의 75% EtOH, 100 μl의 30% NH<sub>4</sub>SCN 용액을 넣고 20 mM의 FeCl<sub>2</sub> 용액으로 발색시켰으며, 반응에서 나타난 발색 정도는 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 500 nm에서 흡광도로 측정하였다.

**토끼 적혈구막 지질과산화 억제활성의 측정.** 토끼 적혈구막 지질분획의 조제 및 이를 이용한 지질과산화 억제활성의 측정은 주로 Ames 등 및 Tsuda 등이 확립한 방법에 따라 시행하였다.<sup>8,9)</sup> 토끼의 혈액은 cardiac punching으로 얻었고, 저장액 조건(10 mM 인산 완충액, pH 7.4)에서 얻어진 erythrocyte membrane은 Bradford법<sup>10)</sup>으로 단백질의 양이 2 mg/ml가 되도록

로 조정하여 -70°C에 보관하며 사용하였다. 지질과산화 억제활성의 측정방법은 다음과 같다. 최종적으로 1.8 mg의 단백질과 1.2 mM의 tert-butylhydroperoxide 및 적당량의 시료를 포함한 반응액 1 ml를 37°C에서 30분간 교반하면서 반응하였다. 여기에 TCA와 thiobarbituric acid(TBA)를 최종농도가 각각 4% 및 0.11%가 되도록 순차적으로 첨가한 후, 100°C에서 5분간 열처리하였다. 생성된 침전을 원심분리로 제거한 상정액의 흡광도를 UV/VIS spectrophotometer(V-550, JASCO, Japan)를 사용하여 535 nm에서 측정하였다.

**Superoxide radical 소거활성의 측정.** Superoxide radical 소거활성의 측정에 사용된 superoxide radical은 hypoxanthine을 기질로 xanthine oxidase를 사용하는 발생시스템(HPX/XOD system)을 이용하여 생성시켰으며, 생성된 라디칼은 spin trap agent인 5,5-dimethylpyrroline-N-oxide(DMPO)과 반응시킨 후 ESR spectrometer(TE-200, JEOL, Japan)로 정량하였다.<sup>11)</sup> 즉, 적당량의 시료를 35 μl의 5.5 mM diethylenediamine-pentaacetic acid(DETAPAC), 15 μl의 9.2 M DMPO와 0.02 unit의 xanthine oxidase와 혼합하여 0.1 M 인산 완충액(pH 7.4)로 용량을 1 ml로 조절하였다. ESR spectroscopy를 위한 기기 설정조건은 다음과 같다. modulation amplitude, 0.1 mT; recording range, 4 mT; recording time, 1 min; time constant, 0.1 s; microwave power, 1.8 mW; microwave frequency, 9.40432.

**Hydroxy radical 소거활성의 측정.** Hydroxyl radical 소거활성의 측정에 사용된 hydroxyl radical은 Fenton 반응<sup>12)</sup>을 이용하여 생성시켰으며, superoxide radical 소거활성의 측정과 마찬가지로 생성된 라디칼을 spin trap agent인 DMPO와 반응시킨 후 ESR spectrometer를 사용하여 정량하였다.<sup>13)</sup> 즉, 적당량의 시료를 50 μl의 0.3 M DMPO와 50 μl의 10 mM FeSO<sub>4</sub>, 50 μl의 10 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 혼합하여 0.1 M 인산 완충액(pH 7.4)으로

전체 용량을 200  $\mu$ l로 조절하였다. ESR spectroscopy에 의한 hydroxyl radical의 정량은 superoxide radical 측정 시와 동일한 기기 작동조건에서 수행하였다.

**산화적 DNA 손상에 대한 억제활성의 측정.** DNA의 산화적 손상은  $\Phi$ X174 RF DNA에 유발된 strand scission으로 인하여 나타나는 agarose gel 상에서의 전기영동도의 변화로 측정하였다.<sup>14)</sup> 0.2  $\mu$ g의  $\Phi$ X174 RF DNA를 100 mM의 mitomycin C와 0.5 mM의 sodium borohydride 및 0.1 mM  $\text{CuCl}_2$ 를 포함한 20  $\mu$ l의 반응 용량에서 ml 당 10 mg의 시료와 함께 37°C, 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 반응액을 1×TAE 완충액으로 완충시킨 1% agarose gel에 전기영동하여 supercoil 상태의 RF I DNA와 strand scission이 발생한 RF II, RF III DNA를 분획하였으며, 각 DNA의 상대적인 양은 분석 소프트웨어가 내장된 Gel Documentation System(Bio-ID, Vilber Lourmat, France)으로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

**품종간 환원력의 비교.** 각 두류 품종의 70% 에탄올 추출물이 보유한 항산화 활성도를 비교하는 가장 간편한 지표로서 환원력을 측정하였다. 두류의 에탄올 추출물을 각각 100  $\mu$ g에서 4 mg까지 각 농도별로 첨가하였을 때 측정된 품종별 환원력을 Table 1에 정리하여 비교하였다. 두류 중에서도 *Phaseolous*속에 속하는 두류의 환원력이 전반적으로 *Glycine*속에 속하는 것들보다 높은 경향을 보였으며, 예팔과 유월콩, 적두의 환원력이 특히 우수하였다. *Glycine*속에서는 종피색이 짙은 쥐눈이콩과 속피리의 환원력은 높았지만, 예상과는 달리 흑태의 활성은 그다지 높지 않았다. 조사한 시료 중에서 속피리가 가장 환원력이 높은 반면 청태는 환원력이 제일 낮은 두류로 나타났다.

**Linoleic acid 산화 억제활성의 비교.** Linoleic acid 자동산화 모델계를 이용하여 두류 에탄올 추출물 시료 20 mg에 의한

Table 1. Reducing power of 70% EtOH extracts from various legumes

Extracts	Absorbance (700 nm)				
	100 $\mu$ g/ $\mu$ l	200 $\mu$ g/ $\mu$ l	300 $\mu$ g/ $\mu$ l	400 $\mu$ g/ $\mu$ l	500 $\mu$ g/ $\mu$ l
Heugtae (흑태)	0.1170 $\pm$ 0.0425	0.1497 $\pm$ 0.0400	0.3663 $\pm$ 0.0428	0.6437 $\pm$ 0.0570	1.4590 $\pm$ 0.2741
Jeenuni-bean (쥐눈이콩)	0.1743 $\pm$ 0.0510	0.2427 $\pm$ 0.0569	0.6923 $\pm$ 0.1635	1.2580 $\pm$ 0.0920	1.9837 $\pm$ 0.0774
Peanut (땅콩)	0.1447 $\pm$ 0.0492	0.1870 $\pm$ 0.0641	0.4863 $\pm$ 0.1179	0.7620 $\pm$ 0.0717	1.6580 $\pm$ 0.0786
Namul-bean (나물콩)	0.1530 $\pm$ 0.0795	0.1813 $\pm$ 0.0993	0.4887 $\pm$ 0.0828	0.8233 $\pm$ 0.1112	1.4707 $\pm$ 0.1810
Sokpiri (속피리)	0.2507 $\pm$ 0.0654	0.3713 $\pm$ 0.1058	1.2087 $\pm$ 0.2968	1.8430 $\pm$ 0.2708	2.3957 $\pm$ 0.1656
Jeokdu (적두)	0.1943 $\pm$ 0.1101	0.2667 $\pm$ 0.1575	1.0253 $\pm$ 0.1108	1.6873 $\pm$ 0.1290	2.3300 $\pm$ 0.1190
Baektae (백태)	0.1130 $\pm$ 0.0278	0.1597 $\pm$ 0.0587	0.4223 $\pm$ 0.0828	0.6687 $\pm$ 0.0982	1.3187 $\pm$ 0.1784
Yepat (예팔)	0.1810 $\pm$ 0.0961	0.2610 $\pm$ 0.1469	0.9227 $\pm$ 0.2590	1.6473 $\pm$ 0.2723	2.5270 $\pm$ 0.3009
Nokdu (녹두)	0.1187 $\pm$ 0.0412	0.1430 $\pm$ 0.0278	0.4087 $\pm$ 0.0565	0.9383 $\pm$ 0.1385	1.4000 $\pm$ 0.1862
Dongbu (동부)	0.1227 $\pm$ 0.0230	0.1450 $\pm$ 0.0176	0.3870 $\pm$ 0.1062	0.4933 $\pm$ 0.1001	0.8593 $\pm$ 0.1478
Chungtae (청태)	0.1177 $\pm$ 0.0281	0.1520 $\pm$ 0.0200	0.4123 $\pm$ 0.0900	0.7143 $\pm$ 0.1815	1.1817 $\pm$ 0.1066
Jebi-bean (제비콩)	0.1633 $\pm$ 0.0836	0.2153 $\pm$ 0.1236	0.7583 $\pm$ 0.0944	1.3220 $\pm$ 0.1413	1.8707 $\pm$ 0.1716
Yuweol-bean (유월콩)	0.2060 $\pm$ 0.0572	0.3047 $\pm$ 0.0720	0.9653 $\pm$ 0.1373	1.5953 $\pm$ 0.1583	2.3650 $\pm$ 0.1809

Values obtained through triplicate experiments are expressed as mean  $\pm$  SE.

Table 2. Antioxidative activity of 70% EtOH extracts from various legumes in the linoleic acid system

Extracts	2 days		10 days	
	Absorbance at 500 nm	% of inhibition	Absorbance at 500 nm	% of inhibition
Control	0.1036 $\pm$ 0.025	0	0.492 $\pm$ 0.13	0
BHT	0.0552 $\pm$ 0.0044	46.5	0.0879 $\pm$ 0.0020	82.14
Heugtae (흑태)	0.0716 $\pm$ 0.0075	30.5	0.0835 $\pm$ 0.025	83.0
Jinuni-bean (쥐눈이콩)	0.0664 $\pm$ 0.0061	35.7	0.0868 $\pm$ 0.025	82.4
Peanut (땅콩)	0.0739 $\pm$ 0.0078	28.3	0.0966 $\pm$ 0.034	80.37
Namul-bean (나물콩)	0.0786 $\pm$ 0.010	23.8	0.120 $\pm$ 0.033	75.6
Sokpiri (속피리)	0.0742 $\pm$ 0.0079	28.1	0.0889 $\pm$ 0.026	81.9
Jeokdu (적두)	0.0797 $\pm$ 0.0049	22.7	0.0820 $\pm$ 0.018	83.3
Baektae (백태)	0.0710 $\pm$ 0.0040	31.1	0.131 $\pm$ 0.060	73.3
Yepat (예팔)	0.0727 $\pm$ 0.010	29.6	0.0850 $\pm$ 0.022	82.73
Nokdu (녹두)	0.0697 $\pm$ 0.0042	32.4	0.0896 $\pm$ 0.025	81.8
Dongbu (동부)	0.0694 $\pm$ 0.0048	32.7	0.0901 $\pm$ 0.027	81.7
Chungtae (청태)	0.0717 $\pm$ 0.0051	30.5	0.102 $\pm$ 0.026	79.2
Jebi-bean (제비콩)	0.0776 $\pm$ 0.011	24.8	0.0856 $\pm$ 0.028	82.6
Yuweol-bean (유월콩)	0.0720 $\pm$ 0.0082	30.2	0.0869 $\pm$ 0.026	82.3

Values obtained through triplicate experiments are expressed as mean  $\pm$  SE.

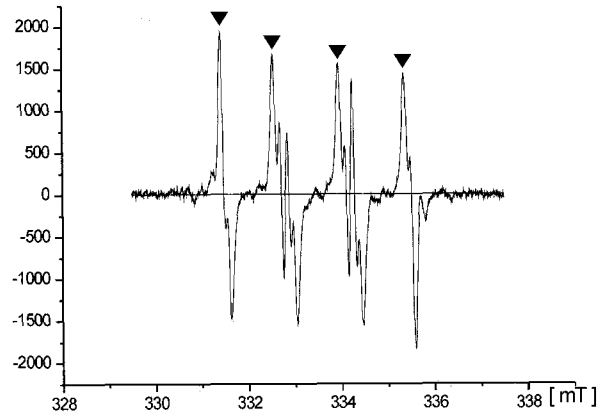
**Table 3. Antioxidative activity of 70% EtOH extracts from various legumes in the rabbit erythrocyte membrane system**

Extracts	TBA value (% of inhibition)	
Control	3.3918 ± 0.0656	(0)
Vitamin E	0.5726 ± 0.0915	(83.1)
Heugtae (흑태)	5.0618 ± 0.0656	(-49.2)
Jinuni-bean (쥐눈이콩)	1.8657 ± 0.1173	(45)
Peanut (땅콩)	3.8877 ± 0.1602	(-14.6)
Namul-bean (나물콩)	3.6046 ± 0.0707	(-6.3)
Sokpiri (속피리)	2.6714 ± 0.0501	(21.2)
Jeokdu (적두)	2.3492 ± 0.1203	(30.7)
Baektae (백태)	4.2239 ± 0.1120	(-24.5)
Yepat (예팔)	3.4328 ± 0.0956	(-1.2)
Nokdu (녹두)	5.2219 ± 0.0924	(-54.0)
Dongbu (동부)	4.9932 ± 0.0920	(-47.2)
Chungtae (청태)	4.1935 ± 0.0714	(-23.6)
Jebi-bean (제비콩)	4.1063 ± 0.0383	(-21.0)
Yuweol-bean (유월콩)	4.1799 ± 0.0435	(-23.2)

Values obtained through triplicate experiments are expressed as mean ± SE.

지질과산화물의 생성 억제효과를 측정하였으며, 실험의 대조군으로 합성 항산화제인 BHT를 1 mg을 사용하였다. Table 2와 같이, *in vitro*에서 지질 자동산화가 유발된 2일 째에는 1 mg의 BHT 첨가에 의한 억제 효과가 두류 추출물의 첨가에 비하여 전반적으로 우수하였다. 자동산화 유발 후 10일 째까지 누적되는 과산화물의 생성에 대한 억제 효과는 나물콩과 특히 완두콩을 제외하고는 오히려 거의 대부분의 두류 추출물에서 높은 항산화활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 반응에 첨가한 시료의 양적인 차이를 감안하더라도 대조군에서 사용한 BHT와 거의 유사한 정도의 억제 효과를 나타내었다. 이는, 본 실험에 사용한 두류들은 식품의 자동 산화에 의한 열화를 방지하는데 좋은 효과를 가져올 수 있을 뿐 아니라 장기간에 걸친 일상적인 섭취가 생체 내 산화적 스트레스를 낮출 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

**토끼 적혈구 막지질과산화 억제효과의 비교.** *In vivo*에서 발생하는 지질과산화현상을 재현시키기 어려운 linoleic acid 자동산화 모델계의 기술적 제약점 때문에, 토끼 적혈구 ghost cell의 막지질을 사용하여 시료의 지질과산화에 대한 억제활성을 검토하였다. 각 시료는 2 mg을 첨가하였고 양성 대조구로는 시료와 동일한 양의 vitamin E를 사용하였다. Table 3의 결과를 보면, linoleic acid 자동산화 모델계에서 측정한 결과와는 다르게, 전반적으로 시료들은 지질과산화를 억제하기보다는 오히려 지질과산화를 촉진시키는 경향을 보였다. 녹두와 흑태 및 동부가 특히 막지질의 과산화를 촉발시키는 활성이 높게 나타났지만, 쥐눈이콩, 속피리와 적두를 제외하고는 모든 시료에서 동일한 효과가 검출되었다. 이것은 실험에서 사용한 두류의 조추출물에 pro-oxidant들이 포함되어 있기 때문으로 보여진다. 이 결과는 특히 천연물이 가지는 지질과산화에 대한 억제활성을 평가하는데는 linoleic acid 자동산화 모델계를 사용한 일반적인 항산화활성 측정정보보다 토끼 적혈구 막지질과산화 모델계를 사용하는 것이 시료의 지질과산화 억제활성을 세포수준에 접근하



**Fig. 2. ESR spectrum of DMPO- O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical adducts.**

여 평가하는 방법임을 시사하고 있다고 생각된다. 조사한 품종 중에서 쥐눈이콩이 막지질 과산화를 억제하는 활성이 가장 높았고(45% 억제), 적두>속피리의 순서로 억제활성이 관찰되었다(각각 31% 및 21% 억제).

**Superoxide radical 소거활성의 비교.** 산소호흡으로 세포에 에너지를 획득하는 생물에 있어서 호흡과정의 부산물로 발생하는 유해 활성산소종(ROS; Reactive Oxygen Species)이 생체 고분자의 산화를 통하여 노화나 암발생 등 만성질환의 원인이 된다는 사실이 알려져 있기 때문에, 각 품종별 두류 추출물이 ROS를 소거할 수 있는지 여부를 조사하고자 하였다.<sup>15)</sup> 본 실험에서는 반감기가 매우 짧은 ROS를 spin trapping agent와 반응시켜서 안정화시킨 다음, ESR spectroscopy에 의해 측정하였다. Fig. 2의 표시된 peak가 DMPO에 의하여 안정화된 superoxide radical에 해당하는 peak이며, 시료의 superoxide radical 소거활성은 시료처리 후 변화된 peak의 높이를 측정하여 계산하였다. 실험 결과, 0.5 µg/µl의 시료농도에서 최저 26%의 억제활성이 검출된 결과와 같이(Table 4), 조사한 두류의 시료는 전반적으로 높은 수준의 superoxide radical에 대한 소거활성을 보였다. 그 중에서도 예팔, 나물콩, 적두, 쥐눈이콩, 속피리의 라디칼 소거활성이 가장 우수하게 판명된 반면(5 µg/µl에서 각각 92%, 85%, 80%, 77%, 75% 억제), 백태와 제비콩의 소거활성은 5 µg/µl에서 각각 37%와 41% 정도로서 타 품종에 비하여 상대적으로 낮게 나타났다.

**Hydroxyl radical 소거활성의 비교.** 활성산소종 가운데 superoxide radical과 더불어 생체 고분자의 산화에 중요한 역할을 담당하는 라디칼인 hydroxyl radical에 대해서도 superoxide radical의 경우와 동일한 방법으로 두류 추출물의 소거활성을 측정하였다. Fig. 3의 표시된 peak가 DMPO에 의하여 안정화된 hydroxyl radical에 해당하는 peak로서, 시료가 가지는 라디칼 소거활성은 superoxide radical에 사용된 것과 동일한 방법으로 정량하였다. Table 5의 결과와 같이, 두류 추출물의 hydroxyl radical 소거활성은 superoxide radical의 경우에 비하여 전반적으로 낮은 경향을 보였다. 이와 같은 경향은 시료의 농도가 0.5 µg/µl일 때 현저히 나타났으며, 동부나 유월콩, 땅콩의 hydroxyl radical 소거활성은 특히 낮게 검출되었다. 시료 중에서는 속피리의 소거활성이 79%의 억제수준으로 가장 우수하였

Table 4. Scavenging effect of 70% EtOH extract from various legumes on superoxide radical

Extracts	Relative peak height (% of inhibition)			
	0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$		5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	
Heugtae (흑태)	897.5 $\pm$ 9.5	(35.8)	531.5 $\pm$ 24.5	(62.0)
Jinuni-bean (쥐눈이콩)	682.0 $\pm$ 30.0	(51.2)	3130.0 $\pm$ 10.0	(77.6)
Peanut (땅콩)	708.0 $\pm$ 17.0	(49.4)	444.5 $\pm$ 11.5	(68.2)
Namul-bean (나물콩)	803.5 $\pm$ 12.5	(42.5)	203.5 $\pm$ 10.5	(85.4)
Sokpiri (속피리)	786.0 $\pm$ 9.0	(43.8)	349.0 $\pm$ 29.0	(75.0)
Jeokdu (적두)	608.5 $\pm$ 3.5	(56.5)	271.5 $\pm$ 2.5	(80.6)
Baektae (백태)	820.5 $\pm$ 10.5	(41.3)	867.5 $\pm$ 11.5	(38.0)
Yepat (예팔)	689.0 $\pm$ 33.0	(50.7)	109.5 $\pm$ 1.5	(92.2)
Nokdu (녹두)	957.5 $\pm$ 13.5	(31.5)	536.5 $\pm$ 23.5	(61.6)
Dongbu (동부)	1023.5 $\pm$ 22.5	(26.8)	713.0 $\pm$ 12.0	(49.0)
Chungtae (청태)	781.0 $\pm$ 13.0	(44.1)	714.5 $\pm$ 17.5	(48.9)
Jebi-bean (제비콩)	1006.0 $\pm$ 24.0	(28.0)	812.5 $\pm$ 2.5	(41.9)
Yuweol-bean (유월콩)	992.0 $\pm$ 20.0	(29.0)	753.5 $\pm$ 7.5	(46.1)

Values obtained through triplicate experiments are expressed as mean  $\pm$  SE.

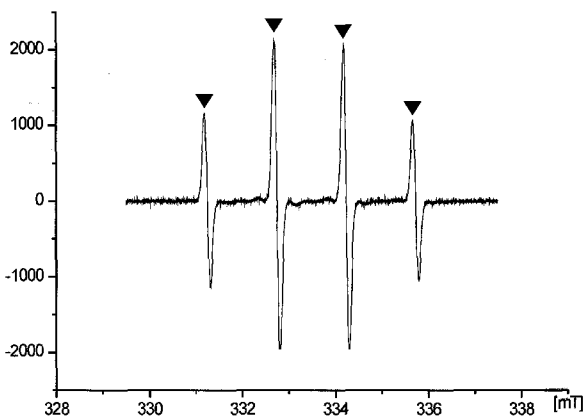


Fig. 3. ESR spectrum of DMPO-OH Spin adducts.

고, 예팔, 청태, 제비콩도 71% 정도로 높은 라디칼 소거활성을 보였다. 단, 나물콩의 경우는, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 시료 첨가 조건에서는

반복적인 실험에도 불구하고 hydroxyl radical를 기기 분석으로 검출하는 것이 불가능하였다.

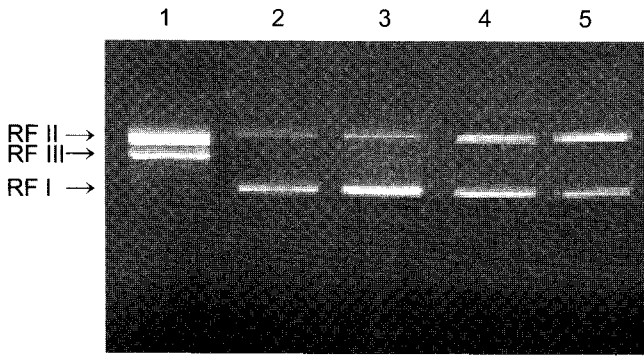
**DNA의 산화적 손상에 대한 억제활성의 비교.** DNA에 유발된 산화적 손상의 축적이 정상세포를 transformed cell로 전환시키는 tumor initiation의 개시점으로 작용하기 때문에 각 품종의 두류 추출물이 DNA의 산화적 손상을 억제할 수 있는지 여부를 조사할 필요가 있다.<sup>16)</sup> DNA 산화적 손상에 대한 억제활성은 mitomycin C에 의한 산화적 손상으로  $\Phi\text{X174 RF}$  DNA에 발생한 DNA의 strand scission의 결과 발생하는 agarose gel 상에서 DNA의 전기영동도 변화를 지표로 측정하였다. Fig. 4에 나타난 것처럼, 산화적 손상에 의하여 supercoil 상의 DNA(RF I)는 RF II, RF III 상태로 변화하게 되며 시료의 첨가는 이와 같은 형태의 변이를 억제하게 된다(Fig. 4, lane 1,2). Table 6에 정리된 결과와 같이, 실험에 사용한 모든 두류의 추출물에서 47% 이상의 산화적 손상에 대한 억제활성이 검출되었다. 특히 예팔, 쥐눈이콩, 나물콩, 녹두, 적두, 속피리는

Table 5. Scavenging effect of 70% EtOH extract from various legumes on hydroxyl radical

Extracts	Relative peak height (% of inhibition)			
	0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$		5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	
Heugtae (흑태)	1461.0 $\pm$ 30.0	(19.4)	625.0 $\pm$ 7	(65.5)
Jinuni-bean (쥐눈이콩)	1384.5 $\pm$ 22.5	(23.6)	755.0 $\pm$ 15.0	(58.3)
Peanut (땅콩)	1778.0 $\pm$ 11.0	(1.9)	1065.5 $\pm$ 11.5	(41.2)
Namul-bean (나물콩)	1650.0 $\pm$ 1.0	(8.9)	ND	ND
Sokpiri (속피리)	1448.5 $\pm$ 13.5	(20.1)	369.0 $\pm$ 23.0	(79.6)
Jeokdu (적두)	1474.0 $\pm$ 27.0	(18.7)	681.5 $\pm$ 10.5	(62.4)
Baektae (백태)	1834.0 $\pm$ 44.0	(-1.2)	1054.0 $\pm$ 38.0	(41.8)
Yepat (예팔)	1984.0 $\pm$ 19.0	(20.6)	723.0 $\pm$ 8.0	(71.1)
Nokdu (녹두)	2150.0 $\pm$ 11.0	(11.0)	1095.0 $\pm$ 14.0	(56.2)
Dongbu (동부)	2481.0 $\pm$ 9.0	(-2.8)	1128.0 $\pm$ 11.0	(54.9)
Chiuntae (청태)	1598.0 $\pm$ 17.0	(33.8)	714.0 $\pm$ 13.0	(71.4)
Jebi-bean (제비콩)	1852.0 $\pm$ 44.5	(23.3)	739.0 $\pm$ 27.0	(70.4)
Yuweol-bean (유월콩)	2868.5 $\pm$ 49.5	(-18.8)	1438.0 $\pm$ 14.0	(42.5)

Values obtained through triplicate experiments are expressed as mean  $\pm$  SE.

ND: not detected.



**Fig. 4.** Agarose gel electrophoretogram used for analysis of inhibitory action of 13 legumes against mitomycin C-induced oxidative damage on DNA. 1, mitomycin C-treated control; 2, mitomycin C-free control; 3, Namul-bean; 4, Dongbu; 5, Heugtae.

98% 이상의 억제활성을 갖는 것으로 나타났다.

이상 13품종의 두류의 항산화활성을 환원력, linoleic acid 자동산화에 대한 억제활성, 토끼 적혈구막 지질과산화 억제활성, superoxide radical 및 hydroxyl radical 소거활성, 그리고 화학적 돌연변이원인 mitomycin C로 유도된 산화적 DNA 손상에 대한 억제활성을 지표로 평가하였다. 조사된 항산화활성의 각 지표간에 뚜렷한 상관성을 조사하기 어려웠으나, 토끼 적혈구막 지질과산화를 억제하는 쥐눈이콩, 적두 및 속피리는 환원력도 상대적으로 높았고, superoxide radical 및 hydroxyl radical에 대한 소거활성도 높은 수준을 보였다. 또한 동부와 우리나라의 전통 콩 발효식품인 장류의 원료로 쓰이는 백태와 같이 환원력이 낮은 두류 품종에 있어서 기타 다른 항산화 관련 활성지표들도 낮았다. 그러나 환원력이 가장 높게 측정된 예팍은 두 종류의 활성산소 라디칼에 대한 소거활성이 우수하였음에도 불구하고 토끼 적혈구막 지질과산화에 대해서는 억제효과를 발견할 수 없었으며, 청태는 환원력, 지질과산화 억제활성 및 superoxide radical 소거활성은 매우 낮은 수준임에도 hydroxyl radical 소거활성만은 높은 특징을 보였다. 두류 추출물의 지질과산화에 대한 억제활성이 linoleic acid 자동산화계에서는 모든 품종에서 높게 측정되었음에도 불구하고, 토끼 적혈구막 지질분획을 이용한 실험계에서는 3품종의 두류에서만 뚜렷한 막지질과산화 억제활성이 검출되었다. 이와 같은 실험 결과의 차이를 정확히 해석하기 어렵지만, 다양한 지질성분 및 산화-환원 관련 분자들이 함유된 생체 막성분을 사용하여 천연물의 지질과산화 억제활성을 측정하는 것이 *in vivo*의 조건을 만족시키는 결과를 얻을 수 있다고 생각된다. 본 실험에 사용된 두류 추출물들은 대체로 hydroxyl radical보다 superoxide radical에 대하여 높은 소거활성을 보이는 특징이 있었다. 일상적으로 섭취한 식품성분이 세포 유전물질인 DNA에 발생하는 산화적 손상을 억제할 수 있는지 여부를  $\Phi$ X174 RF DNA를 사용한 *in vitro* 실험계에서 조사하였다. 기대와는 다르게, 녹두, 백태, 동부와 같이 환원력, 지질과산화 억제 및 활성산소 라디칼 소거활성이 낮은 두류들이 오히려 mitomycin C로 유발된 DNA에 대하여 보다 효율적으로 산화적 손상을 억제하였다. 이와 같은 결과의 차이는 DNA 손상 유발인자인 라디칼화된 mitomycin

**Table 6.** Effects of 70% EtOH extract from various legumes on mitomycin C-induced strand scission of  $\Phi$ X174 RF DNA

Extracts	Relative amount of DNA (%)		
	RF I	RF II	RF III
(+)mitomycin C	0.0	66.6	33.4
(-)mitomycin C	67.7	30.8	1.6
Heugtae (흑태)	36.1	61.1	2.8
Jinuni-bean (쥐눈이콩)	70.5	27.3	2.2
Peanut (땅콩)	31.8	62.1	6.1
Namul-bean (나물콩)	70.4	28.1	1.5
Sokpiri (속피리)	66.7	30.3	3.0
Jeokdu (적두)	68.9	31.1	0.0
Baektae (백태)	53.0	44.3	2.7
Yepat (예팍)	70.5	27.5	2.0
Nokdu (녹두)	70.0	30.0	0.0
Dongbu (동부)	50.4	44.7	4.9
Chungtae (청태)	55.2	44.8	0.0
Jebi-bean (제비콩)	58.9	37.5	3.6
Yuweol-bean (유월콩)	46.0	50.3	3.7

C의 특수성과 더불어 품종별 pro-oxidant 함량에 기인 할 가능성이 있다.<sup>17)</sup> 이상의 실험 결과, 예팍, 적두, 쥐눈이콩, 속피리가 환원력, 지질과산화 억제활성, superoxide radical 및 hydroxyl radical 소거활성의 측면에서 평가한 항산화활성이 우수하게 나타났다. 이 사실은 superoxide radical의 효율적인 소거가 소거과정의 중간산물로 생성될 수 있는 hydroxyl radical의 발생까지 저지할 수 있다는 점에서 의미있다고 하겠다. 특히 쥐눈이콩과 속피리는 환원력, 지질과산화 억제활성 및 ROS 소거활성 뿐 아니라 DNA 산화적 손상에 대한 억제능도 보유하고 있음을 알았다. 이상의 실험결과는 종합적인 항산화활성이 우수한 두류 품종의 소비 촉진을 통한 생활습관형 만성질환의 예방과 이를 이용한 건강기능성 두류의 육종방향을 제시하는데 도움이 될 것으로 본다.

### 참고문헌

- Lin, R. I. S. (1994) In *Functional Foods: Phytochemicals and antioxidants*. Chapman & Hall, New York.
- Troll, W., Lim, J. S. and Frenkel, K. (1994) In *Food Phytochemicals for Cancer Prevention: Prevention of cancer by agents that suppress production of oxidants*. ACS Symp. Series 547, American Chemical Society, Washington D.C.
- Caragay, A. B. (1992) Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technol.* **46**, 65-78.
- Arai, S., Osawa, T., Ohigashi, H., Yoshikawa, M., Kaminogawa, S., Watanabe, M., Ogawa, T., Okubo, K., Watanabe, S., Nishino, H., Shinihara, K., Esashi, T. and Hirahara, T. (2001) A mainstay of functional food science in Japan-History, Present status, and Future outlook. *Biosci, Biotechnol. Biochem.* **65**, 1-13.
- Bron, D. and Asmis, R. (2001) Vitamin B and the prevention of atherosclerosis. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **71**, 18-24.
- Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction

- prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* **44**, 307-315.
7. Osawa, T. and Namiki, M. (1981) A novel type antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 735-740.
  8. Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E. and Hochstein, P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6858-6862.
  9. Choi, S. W., Nam, S. H. and Choi, H. -C. (1996) Antioxidative activity of ethanolic extracts of rice brans. *Food Biotech.* **5**, 305-309.
  10. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
  11. Mitsuta, K., Mizuta, Y., Kohno, M. and Hiramatsu, M. (1990) The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **63**, 187-190.
  12. Feldberg, P. S., Carew, J. A. and Paradise, R. (1985) Probing Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damage in DNA with a damage-specific DNA binding protein. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1**, 459-466.
  13. Rosen, G. M. and Rauckman, E. J. (1981) Spin trapping of free radicals during hepatic microsomal lipid peroxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7346-7349.
  14. Ueda, K., J. Morita and T. Komano (1982) Action of mitomycin C reduced with sodium borohydride on bacteriophage X174 and its single and double stranded DNAs. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1695-1677.
  15. Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.
  16. Vuillaume, M. (1987) Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. *Mutat. Res.* **186**, 43-72.
  17. Hsc, P. C. and Guo Y. L. (2002) Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* **180**, 33-44.

### Screening of Antioxidative Activity of Legume Species

Seok-Hyun Nam\* and Mi-Young Kang<sup>1</sup> (*Department of Biological Science, Ajou University, Suwon 442-749;*  
<sup>1</sup>*Department of Food and Nutrition, Kyung-pook National University, Daegu 702-701*)

**Abstract:** Seventy percent ethanolic extracts from commercially available 13 legumes were made to investigate their antioxidative activities by determining the reducing power, inhibitory effect on lipid peroxidation, scavenging activity against both superoxide radical and hydroxyl radical, together with inhibitory activity toward mitomycin C-induced oxidative damage of DNA. High level of reducing powers were detected in Yepat, Sokpiri, Yuweol-bean and Jeokdu. Inhibitory effects on lipid peroxidation were found ubiquitously in all extracts examined when employing the linoleic acid autoxidation system, whereas, only 3 legumes, Yepat, Namul-bean and Jeenuni-bean, were revealed marked inhibition in rabbit erythrocyte-ghost membrane lipid peroxidation system. Yepat, Namul-bean, Jeokdu and Jeenuni-bean showed great scavenging activities on superoxide radical, on the other hand, high level of hydroxyl radical scavenging activities were demonstrated in Sokpiri, Chungtae, Yepat and Jebi-bean. Ubiquitous inhibitory effects on mitomycin C-induced oxidative damage on DNA were found in all extracts tested. Among them, however, Yepat, Jeenuni-bean, Namul-bean, Nokdu and Jeokdu showed the higher level of inhibition. Taken together, we could assign Yepat, Jeokdu, Jeenuni-bean and Sokpiri, for the legume species highly functional on overall antioxidative activity.

Key words: legumes, reducing power, lipid peroxidation, radical scavenging, DNA strand scission

\*Corresponding author