

검정콩 안토시아닌의 항산화 및 암세포독성

김용호*[†] · 김동선** · 우성식** · 김현희*** · 이영상* · 김희선*** · 고광오*** · 이석기****

*순천향대학교 의료과학대, **(주)유니젠, ***순천향대학교 자연과학대, ****국립식량과학원

Antioxidant Activity and Cytotoxicity on Human Cancer Cells of Anthocyanin Extracted from Black Soybean

Yong-Ho Kim*[†], Dong-Seon Kim**, Sung-Sick Woo**, Hyun-Hee Kim***, Young-Sang Lee*, Hee-Seon Kim***, Kwang-Oh Ko***, and Seuk-Ki Lee****

*College of Medical Sciences, Soonchunhyang Univ., Asan-si 336-745, Korea

**Unigen, INC., Songjung-ri, Cheonan-si 330-863, Korea

***College of Natural Sciences, Soonchunhyang Univ., Asan-si 336-745, Korea

****National Institute of Crop Science, RDA, Suwon-si 441-857, Korea

ABSTRACT Anthocyanin pigments in soybean seed coat were D3G (Delphinidin-3-glucoside), C3G (Cyanidin-3-glucoside) and Pt3G (Petunidin-3-glucoside), which have been known potential roles in the prevention and treatment of chronic diseases. Anthocyanin contents in seed coat of black soybean were significantly different according to soybean variety, C3G content showed the highest value in all materials and its variation was also wide. Antioxidant activity of each pigment was analyzed by DPPH and TEAC methods in which D3G and C3G showed high activity. And this study was carried out to investigate the effects of anthocyanin to human cancer cells. Cytotoxicity were analyzed by MTT assay after anthocyanin pigments treated on leukemia (Jurkat T) and adenocarcinoma (MCF-7) cells. It showed decrement of cell numbers as anthocyanin concentration is increasing. EC₅₀ range of anthocyanin concentrations were 100~250 ug/mL and 100~250 ug/mL in Jurkat T and MCF-7 cell, respectively. D3G showed higher cytotoxicity than other pigments in Jurkat T cell whereas activity of C3G was high in MCF-7 cell. It is believed that supplementation of human diets with soybean anthocyanin markedly reduces human cancer mortality rates.

Keywords : soybean, anthocyanin, antioxidant activity, cytotoxicity, cancer

국민소득이 증가됨에 따라 건강에 대한 관심이 고조되고 있으며 최근에는 웰빙 바람과 함께 기능성 식품에 대한 요구도가 나날이 커지고 있다. 이런 추세에 따라 기능성 성분으로서 천연색소의 효과에 대한 연구도 늘어나고 있다. 천연색소는 생리적, 기능적 측면에서 새롭게 평가받고 있는데 특히 안토시아닌 색소에 대한 연구가 활발하다. 식물의 열매, 꽃, 과일, 줄기 잎, 뿌리 등에 폭넓게 함유되어 있는 안토시아닌은 적색, 자색, 청색을 나타내는 수용성 flavonoid 계 색소이며 식물에 분포하는 종류는 20여종에 이르는 것으로 알려져 있다(Harborne, 1988). 이들은 착색물질로서의 역할 뿐만 아니라 생체 내의 생리활성(항암, 항알러지, 항바이러스, 면역증강 등)에 도움을 주는 것으로 알려져 있어 안토시아닌에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며(Prior *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2001; Harborne & William, 2000), 특히 항산화력에 대한 연구가 많이 보고되었다(Plochmann *et al.*, 2007; Kanatt *et al.*, 2005; Wang & Lin, 2000).

검정콩은 예로부터 우리나라에서는 약재로 많이 이용되어 왔으며, 특히 검정콩 종피는 혈액자양, 풍의 소통, 시력 증진, 두통치료 등에 효과가 있다고 하였다. 검정콩 종피에는 안토시아닌 색소가 함유되어 있는데 Kim 등(2006)은 콩 품종간 항산화효과의 차이는 종피의 안토시아닌 함량과 높은 관련성이 있음을 보고한 바 있다. 최근에는 국내에서 검정콩 안토시아닌을 주 재료로 하는 건강기능성 식품들도 개발 보급되고 있다. Meiers 등(2001)은 검정콩 안토시아닌의

[†]Corresponding author: (Phone) +82-41-530-1281
(E-mail) yohokim@sch.ac.kr <Received August 13, 2008>

주요 성분인 C3G(Cyanidin-3-glucoside)와 D3G(Delphinidin-3-glucoside)가 human tumor cells 억제에 효과가 있다고 하였으며, Tsuda 등(1999)도 C3G의 항산화력에 대하여 보고한 바 있다.

검정콩은 우리나라에서는 주요한 식량작물이지만 국외에서는 일본 및 중국의 일부 지방에서만 식용하고 있어 크게 주목받지 못하고 있다. 따라서 검정콩에 대한 기능성 성분의 연구 결과는 아직 미미한 편인데 검정콩의 기능성 연구는 앞으로 국내의 콩 생산기반 확충 뿐 만 아니라 국내외적으로 검정콩에 대한 관심을 제고시키는데 큰 역할을 하리라 생각된다. 본 연구에서는 검정콩 기능성 성분 연구의 일환으로 안토시아닌의 항산화력과 암세포독성을 분석하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

안토시아닌 추출 및 분리

일품검정콩과 재래종인 재래속칭을 충남농업기술원에서 분양받아 사용하였다. 검정콩 종피만 분리하여 24시간 동안 종피 1 g당 hexane 30 ml에 탈지한 다음 여과하였다. 탈지된 시료 0.7 g을 1% HCl-40% MeOH 30 ml에 24시간동안 상온에서 추출하고 whatman No. 6 여과지로 여과한 후 reverse phase HPLC를 이용하여 안토시아닌 색소 함량을 분석하였다. 한편, 추출된 검정콩 anthocyanin은 preparative HPLC를 이용하여 pigment 별로 분획한 후 항산화력 분석에 사용하였다. Preparative HPLC에서의 안토시아닌 분획은 GROM-SIL 120 ODS-5 ST.5 μm (150×20 mm) 칼럼과 UV-visible 530 nm Detector를 사용하였으며, mobile phase는 H₂O : methanol : formic acid를 75 : 20 : 5(v/v/v), flow rate는 10 ml/min로 수행되었다.

TEAC법에 의한 검정콩 색소의 항산화 효과 분석

분석에 사용한 약품인 methanol, ethanol, formic acid, water는 모두 HPLC 분석용 등급을 사용하였다. 본 연구에서 사용된 Trolox(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)는 Aldrich 사에서 구입하였고, ABTS(2,2'-AZINO-bis(3-ethylbenzthiazaine-6-sulfonic acid)), ascorbic acid 및 potassium persulfate는 Sigma 사에서 구입하여 사용하였다. 먼저 7 mM 농도로 증류수에 ABTS를 용해시키고 여기에 최종농도가 2.45 mM이 되도록 potassium persulfate를 첨가하여 ABTS 양이온 라디칼을 만들었다. ABTS와 potassium persulfate는 동량 혼합하며 암소에서 실온에

12시간 방치 후 사용하였으며, 이 용액을 ethanol과 섞어 734 nm에서 흡광도가 $0.70 \pm (0.20)$ 이 되도록 조정된 후, 용액 2.5 ml에 0.8 ml의 시료를 첨가하여 30°C에서 6분간 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 UV-1650PC(UV-Visible Spectro-Photometer, Shimadzu)를 이용하여 측정하였다. 항산화 효과는 100 ppm trolox 용액을 표준용액으로 하여 농도에 따른 흡광도 억제 %로써 나타내었다.

DPPH법에 의한 항산화 효과 분석

Blois에 의한 방법(1952)을 변형시킨 후 분석하였다. DPPH(α, α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl) 16 mg을 100 mL의 에탄올에 녹인 후 100 mL의 증류수를 혼합하여 whatman 여과지 No. 2에서 여과하고, 이 여액 2.0 mL에 일정농도의 시료용액(100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 1.0 mL을 혼합하여 528 nm에서 30분간 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 측정값은 대조군과 비교하여 라디칼 소거율(%)로 표시하였다.

안토시아닌의 암세포 독성 평가

JurKat T 세포(T cell leukaemia, KCLB 40152, 한국세포주은행, 급성 백혈병 세포주)와 MCF-7 세포(Adenocarcinoma, KCLB 3002, 한국세포주은행, 유방암 세포주)에 대한 독성 평가를 수행하였으며, 안토시아닌은 스웨덴의 Polyphenol사에서 정제된 표준물질을 구입하여 사용하였다. 세포의 viability 분석은 MTT assay를 이용하였으며, 방법은 JurKatT 세포와 MCF-7 세포를 RPMI1640 배지에 10% Fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후 세포생존력을 분석하였다. 먼저 JurKat T 세포와 MCF-7 세포를 96 well plate에 1×10^4 개/well 농도로 접종하고 24시간 배양한 후, 각각의 well에 안토시아닌을 농도별로 처리하고 72시간 동안 다시 배양하였다. 이후 전체 배지의 1/10되는 양으로 MTT 용액(1 mg/ml in PBS)을 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 반응시켰다. MCF-7 세포의 경우 배양액을 모두 제거하고 각 well에 DMSO를 100 μL 씩 넣고 세포내 형성된 formazan을 용해시켰으며, Jurkat T 세포의 경우는 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 배양액을 제거한 후 남은 cell pellet에 DMSO를 가하여 녹였으며, 이들을 540 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

콩의 항산화 효과를 측정하는 방법은 콩의 생리활성을 판

단하는 중요한 분석법 중의 하나인데 α, α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl 라디칼의 소거 특성을 이용한 DPPH법이 가장 광범위하게 항산화 활성을 측정하기 위해 이용되고 있다. 최근에는 Miller 등(1993)에 의해 개발된 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate))라디칼을 이용한 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)법도 총 항산화능을 측정하는 방법으로 이용되고 있는데, TEAC법은 특히 콩 성분인 isoflavones을 포함하는 식물성 에스트로겐의 활성 측정에 적합한 방법으로 보고된 바 있다(김 등, 2005).

Table 1은 대립검정콩인 일품검정콩, 소립검정콩인 다원콩, 대립이며 자엽이 녹색인 재래속청의 안토시아닌 함량과 항산화력을 분석한 결과이다. Anthocyanin 함량은 일품검정콩(16.7 mg/g) > 재래속청(13.5 mg/g) > 다원콩(13.1 mg/g)의 순으로 나타났으며, 특히 C3G 함량은 일품검정콩이 타계통보다 훨씬 높았다. C3G는 일품검정콩이 13.1 mg/g, 다원콩 4.6 mg/g, 재래속청 7.2 mg/g이었고, D3G는 일품검정콩 2.3 mg/g, 다원콩 3.8 mg/g, 재래속청 4.6 mg/g으로 재래속청에서 가장 높았다. Pt3G는 일품검정콩 1.2 mg/g, 다원콩 4.7 mg/g, 재래속청 1.7 mg/g으로 다원콩에서 가장 높았다.

DPPH법으로 안토시아닌의 항산화력을 측정한 결과 100 ppm에서의 자유 라디칼 소거능(%)은 일품검정콩이 87.57%,

다원콩이 53.06%, 재래속청이 58.46%이었으며, SC₅₀을 산출했을 때 일품검정콩은 25.55 μ g/ml, 다원콩 90.46 μ g/ml, 재래속청 66.95 μ g/ml이었다. 일품검정콩의 이 수치는 α -tocopherol의 항산화력 효과(SC₅₀ 13.52 μ g/ml)와 비슷함을 알 수 있었다. 한편, TEAC법을 이용하여 free radical의 소거능을 분석한 결과도 DPPH법과 같은 경향을 보였다. 즉 항산화력은 일품검정콩 > 재래속청 > 다원콩 순으로 나타났는데, 이것은 Table 1에서 보는 바와 같이 C3G 함량과 같은 순으로 나타난 것이며, 따라서 항산화력은 C3G의 효과가 가장 큰 것으로 사료되었다.

Fig. 1과 2는 검정콩 종피에서 추출 및 분리된 안토시아닌 개별 색소의 항산화력을 TEAC 법과 DPPH 법으로 분석한 결과이다. 그림에서 보는 바와 같이 검정콩 색소인 D3G, C3G, Pt3G는 모두 항산화 효과가 있는 것으로 나타났으나 분리 색소별로는 항산화 효과에 차이가 있었다. 두 실험방법을 비교하였을 때 재래종에서는 C3G, 일품검정콩에서는 D3G가 높은 항산화 활성을 나타내었고, 이는 TEAC법과 DPPH법 둘 다 비슷한 경향을 나타내었다. 따라서 C3G와 D3G의 항산화 효과는 비슷하며, Pt3G는 이들보다 조금 떨어지는 것으로 사료되었다. 이와 같은 결과는 Table 1에서 나타난 것과 같이 C3G의 함량이 높았던 일품검정콩의 항산화력이 타 품종 보다 높은 것을 설명하는 자료가 되리라

Table 1. Anthocyanin contents and their antioxidant effects according to different methods

	Anthocyanin contents (mg/g)				Radical inhibition rate* (%)	
	D3G	C3G	Pt3G	Total	DDPH	TEAC
Ilpumkeumjeongkong	2.286	13.120	1.247	16.653	87.57	81.77
Tawonkong	3.80	4.642	4.698	13.543	53.06	13.66
Jaeraesokchung	4.571	7.227	1.745	13.140	58.46	36.47

*Treated anthocyanin concentration was 100 ppm

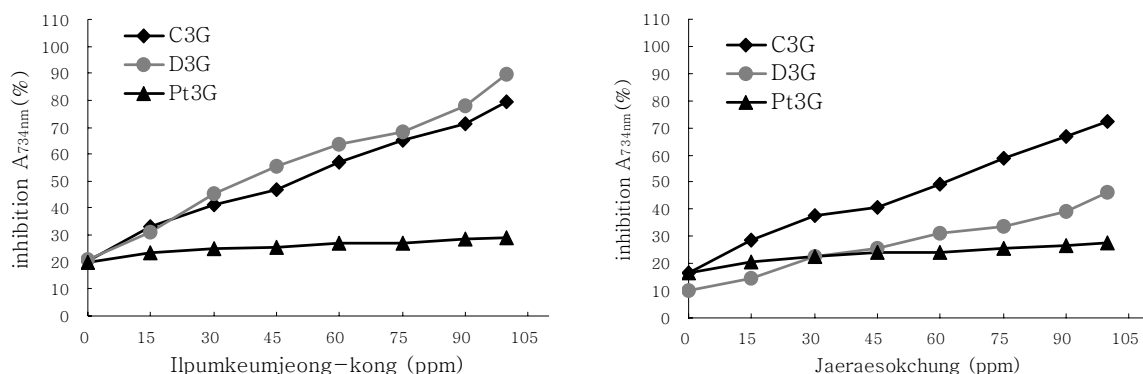


Fig. 1. Free radical scavenging rate of anthocyanin pigments by TEAC method.

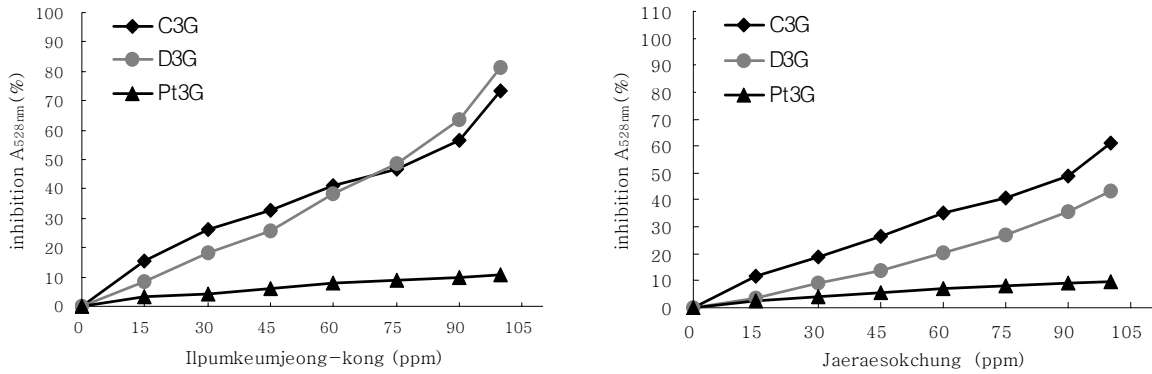


Fig. 2. Free radical scavenging rate of anthocyanin pigments by DPPH method

판단된다. 한편, 일품검정콩과 재래속청간 비교에서는 일품검정콩이 3가지 분획 모두 재래속청 보다 항산화 효과가 높았으며, TEAC 법과 DPPH법 공히 같은 경향이였다.

Fig. 3과 4는 검정콩 안토시아닌의 항암 효과 등을 분석하기 위하여 인간의 암세포에 안토시아닌을 첨가하여 암세포에 대한 독성을 분석한 결과이다.

변이세포는 JurKat T 세포(급성 백혈병 세포주)와 MCF-7 세포(유방암 세포주)를 배양하여 사용하였으며 분석방법은 MTT법을 따랐다. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 담황색의 기질로써 생세포의 미토콘드리아 내의 호흡쇄효소에 의해 개열하고 암청색의

formazan을 생성한다. 그러나 죽은 세포에서는 반응이 일어나지 않으므로 이 formazan의 생성량을 생세포수 측정에 이용하였다. 한편 Jurkat T세포와 MCF-7세포에서 DMSO는 0.5% 농도까지 암세포에 대한 독성이 없는 것으로 알려져 있어(Plochemann *et al.*, 2007), 각 세포마다 처리시료의 최고농도와 같은 양의 DMSO를 처리하여 암세포독성효과를 관찰하였다.

Jurkat T 세포를 96 well plate에 1×10^4 개/well 농도로 분주하고 24시간 후, 세포 배양액에 안토시아닌을 농도별로 처리하여 72시간 동안 배양하고 MTT assay를 이용해 세포 생존력을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 그래프는 평

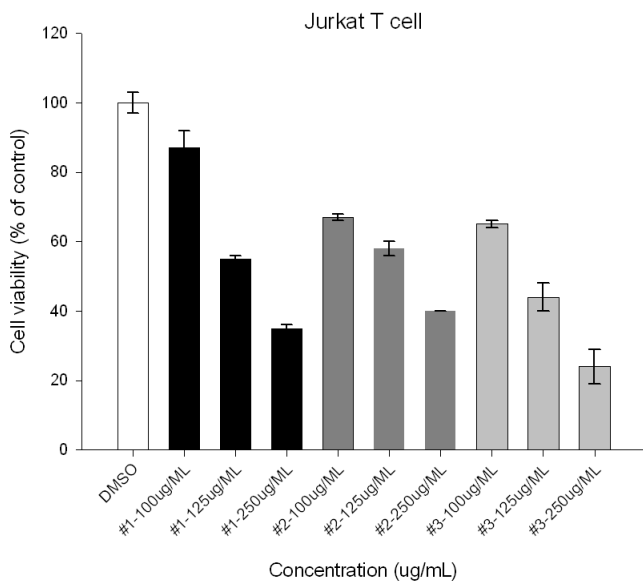


Fig. 3. Anthocyanin-induced cytotoxicity on human leukemia cells.
#1: Petunidin-3-glucoside; #2: Cyanidin-3-glucoside; #3: Delphinidin-3-glucoside

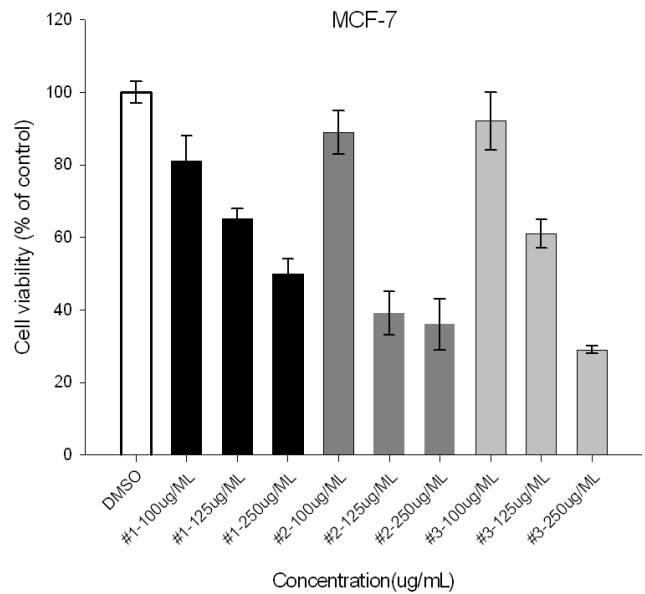


Fig. 4. Anthocyanin-induced cytotoxicity on human adenocarcinoma cells.
#1: Petunidin-3-glucoside; #2: Cyanidin-3-glucoside; #3: Delphinidin-3-glucoside

균±표준편차로 표시하였다. Fig. 4는 MCF-7 세포에 대한 결과이다. 그림에서 보는 바와 같이 Jurkat T 세포에서는 음성 대조군과 비교하여 안토시아닌 색소 모두(C3G, D3G, Pt3G) 농도 의존적으로 세포수를 감소시켰다. EC₅₀농도는 Pt3G와 C3G의 경우 125 µg/mL 농도와 250 µg/mL 농도 사이였고, D3G는 100 µg/mL 농도와 125 µg/mL 농도 사이 값으로 분석되었다. MCF-7 세포에서도 같은 경향으로 시험물질 모두 농도 의존적으로 세포수를 감소시켰다. EC₅₀농도는 Pt3G와 D3G의 경우 250 µg/mL 농도와 500 µg/mL 농도 사이였으며 C3G는 100 µg/mL 농도와 250 µg/mL 농도 사이값으로 관찰되었다. 따라서 검정콩의 안토시아닌 색소는 Jurkat T 세포와 MCF-7 세포에서 100~500 µg/mL 농도로 암세포에 대한 독성 효과를 나타내는 것으로 판단되었다. 그런데 최근까지 발표된 연구결과는 대부분 C3G에 대한 초점이 맞추어졌었는데 본 실험에서는 D3G도 C3G에 뒤지지 않는 암세포독성 효과가 있는 것으로 나타났으며, Pt3G도 그 효과가 인정되었다. 이것은 Fig. 1과 2에서도 같은 결과였음을 알 수 있다. 그동안 타 색소에 비해 C3G의 효과가 부각된 것은 대부분 식물이 함유하고 있는 안토시아닌 색소가 C3G인 까닭에 그동안의 연구 결과는 C3G 중심의 분석이 이루어졌기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 C3G를 포함한 안토시아닌의 개별 색소에 대한 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각되며, 특히 검정콩에는 D3G가 다량 함유되어 있어 검정콩의 기능성에 큰 역할을 하는 것으로 판단되므로 추후 이에 대한 검증이 이어져야 할 것이다.

적 요

검정콩 안토시아닌의 항산화력과 암세포독성을 분석한 결과는 다음과 같다.

1. 안토시아닌 함량은 일품검정콩이 공시재료 중 가장 높게 나타났으며, 특히 C3G 함량은 타 계통보다 2배 이상 높았다.
2. 안토시아닌을 분획한 후 각각의 pigment로 항산화 효과를 분석한 결과 TEAC 법과 DPPH법 모두 C3G, D3G, 및 Pt3G의 효과가 인정되었으며, C3G와 D3G의 항산화력이 높게 나타났다. 일품검정콩과 재래속청간 품종 비교에서는 일품검정콩이 3가지 분획 모두 재래속청 보다 항산화 효과가 높았으며, 이는 TEAC 법과 DPPH법 공히 같은 경향이었다.
3. 인간 암세포인 Jurkat T 세포와 MCF-7 세포에 안토시아닌 개별색소(C3G, D3G 및 Pt3G)를 100~500 µg/mL 농

도로 처리하고 암세포에 대한 독성을 관찰한 결과, 3가지 시험물질 모두 두 가지 암 세포에서 세포독성 효과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 검정콩 안토시아닌이 여러 가지 생리활성 효과를 가지고 있음을 나타내는 결과로 판단된다.

사 사

본 연구는 2007년도 농림부 농림기술개발연구과제(106041-03-2-SB010)와 농촌진흥청 농림특정과제(20050201-033-049-004-01-00) 연구비의 일부를 지원받아 수행되었으므로, 이에 감사드립니다.

인용문헌

Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* 181 : 1199-1200.

Harborne, J. B. 1988. *Introduction to ecological biochemistry*. 3rd ed. Academic press. London.

Harborne, J. B. and C. A. Wiliam. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55 : 481-504.

Kanatt, S. R., R. Chander, P. Radhakrishna, and A. Sharma. 2005. Potato peel extract a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in radiation processed lamb meat. *J. Agric. Food Chem.* 53 : 1499-1504.

Kim, Y. H., J. H. Lee, Y. S. Lee, and H. T. Yun. 2006. Antioxidant activity and extraction efficiency of anthocyanin pigments in black colored soybean. *K. Soybean Digest* 23(1) : 1-9.

Kong, J. M., L. S. Chia, N. K. Goh, T. F. Chia, and R. Brouillard. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64(5) : 923-933.

Meiers, S., M. Kemeny, U. Weyand, R. Gastpar, E. von Angerer, and D. Marko. 2001. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptpr. *J. Agric. Food Chem.* 49 : 958-962.

Miller, N. J., C. A. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan, and A. Milner. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Sci.* 84 : 407-412.

Plochmann, K., G. Korte, E. Koutsilieri, E. Richling, P. Riederer, A. Rethwilm, P. Schreier, and C. Scheller. 2007. Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch Biochem Biophys.*, 460(1) : 1-9.

Prior, R. L., X. Wu, and K. Schaich. 2005. Standardized method for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* 53 : 4290-4302.

- Tsuda, T., F. Horio, Kitoh, J., and T. Osawa. 1999. Protective effects of dietary cyanidin-3-O-beta-glucoside on liver Ischemia-reperfusion injury in rats. *Archives. Biochem. Biophys.* 368(2) : 361-366
- Wang, S. Y. and H. S. Lin. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 48 : 140-146.
- Yang, C. S., J. M. Landau, M. T. Huang, and H. L. Newmark. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 21 : 381-406.
- 김선희, 권태완, 이영순, 정명근, 문갑순. 2005. 검정콩의 주요 항산화 원인 물질 및 항산화 효과 비교. *한국식품과학회지* 37(1) : 73-77.