

황기의 볶음 조건에 따른 성분 및 자외선 광보호 활성 변화*

박정용^{1,2}, 이지연^{1,2}, 김형돈¹, 장귀영¹, 서경혜^{1,†}

¹농촌진흥청 인삼특작부, ²충북대학교 식품공학과

Changes in the constituents and UV-photoprotective activity of *Astragalus membranaceus* caused by roasting*

Jeong-Yong Park^{1,2}, Ji Yeon Lee^{1,2}, Hyung Don Kim¹, Gwi Yeong Jang¹ and Kyung Hye Seo^{1†}

¹Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Eumsung, Chungbuk 27709, Korea

²Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Chungbuk 28644, Korea

ABSTRACT

Purpose: *Astragalus membranaceus* (AM) is an important traditional medicinal herb. Pharmacological research has indicated that AM has various physiological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, immunoregulatory, anticancer, hypolipidemic, antihyperglycemic, and hepatoprotective activities. The bioactive substances responsible for the physiological activities in AM, including many antioxidant substances, change during the roasting process. This study investigated and compared the changes in the antioxidant constituents of AM caused by roasting. **Methods:** DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS⁺ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) radical scavenging activities and their total phenolic content (TPC) were measured. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed to confirm any changes in the isoflavonoids of roasted AM (R-AM). The cell viability of UVB-induced HDF (Human dermal fibroblast) cells treated with AM and R-AM extracts was investigated. The comet assay was used to examine the inhibitory effects of R-AM extracts on DNA damage caused by oxidative stress. **Results:** The DPPH and ABTS⁺ radical scavenging activities were 564.6 ± 20.9 and 108.2 ± 3.1 (IC₅₀ value) respectively, from the 2R-AM. The total phenol content was 47.80 ± 1.40 mg GAE/g from the 1R-AM. The values of calycosin and formononetin, which are the known isoflavonoid constituents of AM, were 778.58 ± 2.72 and 726.80 ± 3.45 µg/g respectively, from the 2R-AM. Treatment of the HDF cells with R-AM (50 ~ 200 µg/mL) did not affect the cell viability. Furthermore, the R-AM extracts effectively protected against UVB-induced DNA damage. **Conclusion:** The findings of this study indicate that R-AM increases its isoflavonoid constituents and protects against UVB-induced DNA damage in HDF cells.

KEY WORDS: *Astragalus membranaceus*, UV-photoprotective activity, antioxidant, DNA damage

서 론

황기는 콩과의 다년생 초본식물로 뿌리 부분을 약용하며, 아시아의 넓은 지역에서 주로 분포하고 있다. 특히 한국에서는 정선, 태백, 제천, 영주 등에서 주로 재배되는 것으로 알려져 있다 [1]. 황기는 한방에서 인삼 다음으로 많이 쓰이는 전통약재로 성질이 따뜻하고 맛이 달며 독성이 없으며, 기를 보호하고 염증완화에 도움을 주어 소아의 병

과 부인병 등 여러 질병 치료에 쓰임새가 다양하다고 동의 보감에 쓰여져 있다 [2]. 최근에는 항염증 [3], 항산화, 항당뇨 [4], 항암 [5], 항노화, 미백 [6] 등의 여러 효능을 과학적으로 밝혔다. 또한, 황기의 성분은 isoflavonoids, polysaccharides, saponin 등이 주요 성분으로 알려져 있으며 [7] 함유하고 있는 isoflavonoids 중 calycosin, formononetin 및 그 배당체가 가장 함유량이 가장 많다고 알려져 있다 [8]. Calycosin과 formononetin은 항산화 효과를 가지며

Received: June 11, 2019 / Revised: August 5, 2019 / Accepted: September 3, 2019

* This study was performed with the support of the Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development (project no. PJ01273003), the Rural Development Administration, Republic of Korea.

† To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-43-871-5785, e-mail: seokh@korea.kr

© 2019 The Korean Nutrition Society

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.

[9,10], 황기에서 분리한 calycosin이 polyphenol을 산화시키는 tyrosinase를 억제하여 멜라닌 합성을 억제하는 미백 활성이 보고된 바 있고, formononetin을 분리하여 Raw264.7 세포에서의 항염증 활성의 연구가 진행되는 등 다양한 생리활성 연구가 진행되었다 [11,12].

볶음 공정은 커피나 코코아 등에서 대표적으로 사용하며, 색과 향미를 얻기 위한 가공 방법으로 많이 이용되고 있다 [13]. 볶음 처리를 하는 동안 식물의 세포벽과 식물체를 이루는 구성성분인 다당류, 단백질, 지질 간의 결합이 끊어지게 되고, 분해나 합성, 축합 등의 반응에 의해 다양한 성분의 변화가 일어나게 된다 [14]. 생리활성물질은 열에 노출 될 때 불안정해지기 때문에 열처리 공정에 의해 식물체의 영양소 및 구성 성분에 변화를 줄 수 있다 [15]. 열처리는 세포벽을 파괴하고 식물체의 불용성 성분으로부터 생리활성물질을 합성하여 항산화 활성을 증가시킨다는 연구결과가 보고되었다 [16,17]. 볶음 공정에서 중요하게 작용하는 볶음 시간과 온도는 생리활성물질의 변화에 중요하게 작용할 수 있다 [18]. 이러한 볶음 공정과 관련된 연구로는 볶음차 제조공정에서 볶음 시간이 품질에 미치는 영향 [19], 볶음 공정 중 참깨 기름의 맛의 변화 [20], 그리고 발아 벼를 볶음 온도, 볶음 시간 및 침출 시간을 달리하였을 때의 이화학적 특성과 항산화 활성의 연구가 진행되었다 [21]. 간단한 볶음 공정을 이용하여 식물체의 생리활성물질이 변화하기 때문에 기능성의 증가를 야기할 수 있다.

최근에는 기후 변화에 의한 오존층 소실로 인해 지표면에 조사되는 유해 자외선의 양이 증가하여 피부 염증과 피부암 발병률이 높아지고 있다 [22,23]. 자외선은 파장대에 따라 UVA (315~400 nm), UVB (280~315 nm) 및 UVC (100~280 nm)로 나뉜다. 이 중 UVB의 대부분은 오존층에서 흡수가 되지만 일부는 표피를 뚫고 깊숙하게 침투하여 산화적 스트레스를 일으켜 DNA에 손상을 주고 돌연변이와 자외선에 의한 광노화를 야기한다 [13,24]. 본 연구에서는 황기의 볶음 조건별 이화학적 특성에 따른 자외선 광보호 효능을 밝히고자, 황기를 볶음 처리하고 항산화 활성이 있다고 알려진 플라보노이드 성분 중 calycosin, formononetin 및 daidzein과 각각의 배당체의 함량 및 총페놀 함량의 변화와 이에 따른 자외선에 의해 손상된 인간 피부세포보호 효능을 확인하였다. 또한 볶음 공정을 반복하여 성분의 변화 및 자외선 광보호 효과 확인을 통해 기능성이 증가된 최적 볶음 공정을 제시하여 자외선 보호 기능성 식품 및 화장품 활용 가능성을 알아보하고자 한다.

연구방법

추출물 준비

본 연구에서 사용된 황기는 2017년 제천에서 1년산을 구입하여 사용하였다. 볶음 황기 (R-AM)는 황기 100 g을 간접 열풍 방식과 3차원 회전 뒤틀림 방식을 이용한 roasting machine (Gene café CBR-101A, Genesis Co., Ltd., Gunpo, Korea)로 200°C에서 30분간 볶음 처리하였다. 이와 같은 조건으로 1~3회 (1R-AM, 2R-AM, 3R-AM)반복하여 볶음 공정을 실시하여 시료를 준비하였다. 볶음 공정이 된 황기는 실온에서 물 (시료 / 용매 비율, 1:10)로 24시간 교반 추출 하였다. 샘플 추출 후, 추출물을 여과하고 환류 냉각 농축시키고 동결 건조하여 사용하였다. 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 용해하여 각 실험에 사용하였다.

DPPH radical scavenging assay

DPPH radical scavenging assay는 Bondet 방법 [25]을 변형하여 사용하였다. DPPH solution은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 95% 에탄올에 용해하여 515 nm에서 흡광도 값 1.0으로 조절하여 준비하였다. 각 시료 10~20 mg/mL을 최종 농도 10~4,000 µg/mL로 희석하여 및 준비된 300 µM DPPH solution과 혼합하였다. 실온에서 30분간 반응시킨 후, 515 nm에서 multiple micro plate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)로 측정하였다. DPPH radical scavenging activity를 계산하는 방법은 다음과 같다.

DPPH radical scavenging assay (%) =

$$\frac{[(A_{\text{control}} - A_{\text{Blank1}}) - (A_{\text{Treatment}} - A_{\text{Blank2}})]}{A_{\text{control}} - A_{\text{Blank1}}} \times 100$$

$A_{\text{Treatment}}$ = Absorbance values of DPPH radicals after treatment with sample

A_{Blank1} = Absorbance values of DPPH radicals with ethanol

A_{Blank2} = Absorbance values of DPPH radicals with ethanol and sample

A_{Control} = Absorbance values of DPPH radicals

ABTS radical scavenging assay

ABTS radical scavenging assay는 van den Berg 방법 [26]을 변형하여 사용하였다. ABTS solution은 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 2.6 mM potassium persulfate를 증류수에 용해하여 준비하고 24시간 후, 732 nm에서 흡광도 값을 0.7로 조절하여 준비하였

다. 각 시료 10~20 mg/mL을 최종 농도 10~2,000 µg/mL로 희석하여 및 준비된 ABTS solution과 혼합하였다. 실온에서 30분간 반응시킨 후, 732 nm에서 multiple micro plate reader로 측정하였다. ABTS radical scavenging activity를 계산하는 방법은 다음과 같다.

ABTS radical scavenging assay (%) =

$$\frac{[(A_{\text{control}} - A_{\text{Blank1}}) - (A_{\text{Treatment}} - A_{\text{Blank2}})]}{A_{\text{control}} - A_{\text{Blank1}}} \times 100$$

$A_{\text{Treatment}}$ = Absorbance values of ABTS radicals after treatment with sample

A_{Blank1} = Absorbance values of ABTS radicals with dH₂O

A_{Blank2} = Absorbance values of ABTS radicals with dH₂O and sample

A_{Control} = Absorbance values of ABTS radicals

총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Ciocalteu reagent가 폴리페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 원리로 Denis의 방법 [27]을 변형하여 사용하였다. 각 시료 500 µL (600 µg/mL)에 2 N Folin-Ciocalteu reagent 50 µg/mL을 넣고 반응 후, 3분 뒤 Na₂CO₃ solution 100 µL을 첨가하였다. 1시간 반응 후, multiple micro plate reader로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 총 페놀 함량은 galic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 표준품으로 사용하여 정량 직선방정식 ($y = 0.0058x - 0.0165$, $r^2 = 0.999$)을 통해 측정하였다.

HPLC analysis

황기의 플라보노이드 정량분석은 고속 액체 크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 분석을 이용하였다. 황기의 정량분석에는 Agilent 1200 series HPLC system (Agilent Technologies, Inc., Santa clara, CA, USA)을 사용하였다. 황기의 표준 물질은 calycosin, formononetin, daidzein 및 배당체를 사용하였다. 표준 물질은 각각 10 mg/mL로 methanol에 용해시킨 후 0.22 µM PVDF membrane filter로 여과 후 사용되었다. 칼럼은 YMC Pack ODS-AM column (5 µm, 4.6 mm X 250 mm, Kyoto, Japan)을 사용하였고, 이동상은 0.1% CH₃COOH in H₂O (용매 A)과 0.1% CH₃COOH in ACN (용매 B)를 사용하였다. 분석을 위한 조건은 [1]을 변형하여 사용하였다. 분석 조건은 다음과 같다. 10~15%, 10 min; 15~20%, 15 min; 20~30%, 25 min; 30~40%, 35 min; 40~60%, 45 min; 60~90%, 55 min; 90~10%, 60 min; 10%, 70 min (B%). 검출기는 UV detector 260 nm로 하였다. 주입량은 10 µL이며, 유속은 1.0 mL/min을 사용하였다.

세포배양

인간 진피 섬유아세포 (Human dermal fibroblast, HDF)는 american type culture collection (PCS-201-012, ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. HDF 세포의 생육 배지로 1% penicilin/streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA)가 포함된 Dulbecco's modified eagles medium (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA)을 사용하였고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다

세포 생존율 측정

HDF 세포를 96-well plate에 5×10^4 cell/well로 분주하여 24h 배양한 후 UVB (100 mJ/cm²) 조사하여 R-AM 추출물을 50~200 µg/mL 농도로 처리하고 24h 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2Htetrazolium) assay (Promega, WI, Madison, USA)를 제조사 매뉴얼에 따라 수행하고 multiple micro plate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DNA 손상 억제 활성 측정

HDF 세포를 96-well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양한 후, UVB (100 mJ/cm²) 조사하여 R-AM 추출물을 50~200 µg/mL 농도로 처리하고 24 h 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. Comet assay는 OxiSelect™ 96-Well Comet Assay Kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. Tail DNA 측정은 epifluorescence microscopy (Axio Scan.Z1, Carl ZEISS, Jena, Thuringia, Germany)의 FITC filter을 사용하였다. Tail DNA intensity를 측정하는 방법은 다음과 같다: 핵으로부터 끌려 나온 꼬리의 길이 (tail length, TL), 꼬리 부분에 포함된 DNA % (% DNA in tail, TD), Tail moment = (TL × TD). 정량 분석은 free ImageJ version 1.52a로 측정하였다.

통계학적 분석

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며, 평균 (mean) ± 표준편차 (standard deviation, SD)로 표기하였다. One-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시하였고, Duncan's Multiple Comparison test (SPSS, ver. 22.0 for Window)로 사후검증을 실시하였다. 상관관계 분석은 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, ver. 22.0 for Window)의 Pierson's correlation coefficient로 검증하였다. $p < 0.05$ 일 때, 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

결 과

볶음공정을 통한 황기의 항산화 활성 비교

볶음 공정에 따른 황기의 항산화 활성 변화를 확인하기 위하여 DPPH 및 ABTS radical scavenging assay를 수행하였다. 황기의 항산화 활성 결과는 Table 1에 나타내었다. 황기 추출물의 DPPH radical scavenging assay의 IC₅₀ value는 각각 3,125.1 ± 82.7, 673.4 ± 63.4, 564.6 ± 20.9와 798 ± 81.8 µg/mL로 NR-AM 추출물에 비해 1R-AM 추출물에서 항산화 활성이 크게 증가하였고, 2R-AM 추출물에서 IC₅₀ value가 564.6 ± 20.9로 가장 좋은 활성을 보였다. 반복 열처리를 하였을 때 3R-AM 추출물에서는 오히려 활성이 감소하는 경향을 보였다. ABTS radical scavenging assay에서는 NR-AM 추출물 (1,450.2 ± 114.3 µg/mL)에 비해 1R-AM 추출물 (112.2 ± 0.4 µg/mL)에서 항산화 활성이 크게 증가하였으나 2R-AM (108.2 ± 3.1 µg/mL) 및 3R-AM (119.3 ± 3.3 µg/mL)로 2R-AM 추출물에서 가장 좋은 활성을 보였으며, 볶음 공정을 반복한 추출물들은 통계적으로 비슷한 활성을 보였다.

Table 1. Antioxidant activity of AMs

Extracts ¹⁾	DPPH	ABTS
	IC ₅₀ value (µg/mL)	IC ₅₀ value (µg/mL)
NR-AM	3125.1 ± 82.7 ^a	1450.2 ± 114.3 ^a
1R-AM	673.4 ± 63.4 ^c	112.2 ± 0.4 ^b
2R-AM	564.6 ± 20.9 ^c	108.2 ± 3.1 ^b
3R-AM	798.1 ± 81.8 ^b	119.3 ± 3.3 ^b
L-ascorbic acid ²⁾	5.5 ± 0.3	16.2 ± 0.1

1) AM, *Astragalus membranaceus*; NR-AM, none roasted-*Astragalus membranaceus*; 1R-AM, 1st roasted-*Astragalus membranaceus*; 2R-AM, 2nd roasted-*Astragalus membranaceus*; 3R-AM, 3rd roasted-*Astragalus membranaceus*

2) L-ascorbic acid was used for positive control.

All values are represented as means ± SD (n = 3). Results with different letters significantly different among groups are analyzed by Duncan's multiple range test (p < 0.05).

Table 3. The major isoflavonoid contents of AMs

Samples ¹⁾	Contents (µg/g dried weight)					
	Daidzein-7-O-β-D-glucoside	Calycosin-7-O-β-D-glucoside	Formononetin-7-O-β-D-glucoside	Daidzein	Calycosin	Formononetin
NR-AM	N.D.	333.85 ± 3.00 ^a	143.95 ± 1.44 ^a	N.D.	253.13 ± 1.23 ^d	286.65 ± 2.51 ^d
1R-AM	N.D.	197.51 ± 3.70 ^b	277.49 ± 2.10 ^b	N.D.	723.81 ± 30.61 ^b	447.54 ± 1.97 ^c
2R-AM	N.D.	157.82 ± 6.03 ^c	86.40 ± 0.72 ^c	N.D.	778.58 ± 2.72 ^c	726.80 ± 3.45 ^d
3R-AM	N.D.	191.35 ± 26.74 ^b	60.54 ± 0.69 ^d	N.D.	615.18 ± 4.37 ^c	471.03 ± 3.36 ^b

1) AM, *Astragalus membranaceus*; NR-AM, none roasted-*Astragalus membranaceus*; 1R-AM, 1st roasted-*Astragalus membranaceus*; 2R-AM, 2nd roasted-*Astragalus membranaceus*; 3R-AM, 3rd roasted-*Astragalus membranaceus*

All data are presented as the mean ± SD of triplicate determinations.

Value with different letters indicate significance between groups by Duncan's multiple range test (p < 0.05).

볶음공정을 통한 총 페놀 함량의 변화

황기의 볶음 공정의 최적화를 위하여 200°C에서 30분간 열처리를 하였으며, 볶음 공전 전 황기 (NR-AM)와 1~3회 (1R-AM, 2R-AM, 3R-AM)의 총 페놀 함량을 비교하였다. 총 폴리페놀 함량은 NR-AM 16.29 ± 0.36, 1R-AM 47.80 ± 1.40, 2R-AM 44.81 ± 0.81 및 3R-AM 43.05 ± 1.40 mg GAE/g로 나타났다 (Table 2). 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 기준물질로 측정하였다. 열처리를 처음 하였을 때는 총 폴리페놀 함량이 크게 증가하였으나 2~3번의 열처리를 한 추출물에서는 오히려 양이 감소하였고 통계적으로 차이는 없었다.

볶음공정에 의한 isoflavonoid 지표물질 함량의 변화

볶음 공정을 통하여 생리활성물질의 변화와 관련된 연구결과들이 많이 보고 되어지고 있다 [28,29]. 볶음 공정의 변화에 따른 황기의 대표적인 지표물질인 calycosin, formononetin과 이의 배당체인 calycosin-7-O-β-D-glucoside, formononetin-7-O-β-D-glucoside 등을 정성 및 정량 분석하였다. 황기 추출물의 플라보노이드 화합물인 calycosin, formononetin와 배당체의 함량을 HPLC를 이용하여 분석한 결과를 Table 3에 나타내었다. NR-AM 추출물에서는

Table 2. Total phenolic contents of AMs

Extracts ¹⁾	TPC ²⁾
	(mg GAE/g)
NR-AM	16.29 ± 0.36 ^c
1R-AM	47.80 ± 1.40 ^a
2R-AM	44.81 ± 0.81 ^b
3R-AM	43.05 ± 1.40 ^b

1) AM, *Astragalus membranaceus*; NR-AM, none roasted-*Astragalus membranaceus*; 1R-AM, 1st roasted-*Astragalus membranaceus*; 2R-AM, 2nd roasted-*Astragalus membranaceus*; 3R-AM, 3rd roasted-*Astragalus membranaceus*

2) TPC, total phenol content; GAE, gallic acid equivalent

All data are presented as the mean ± SD of triplicate determinations.

a,b,c: means in a row followed by different superscripts are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

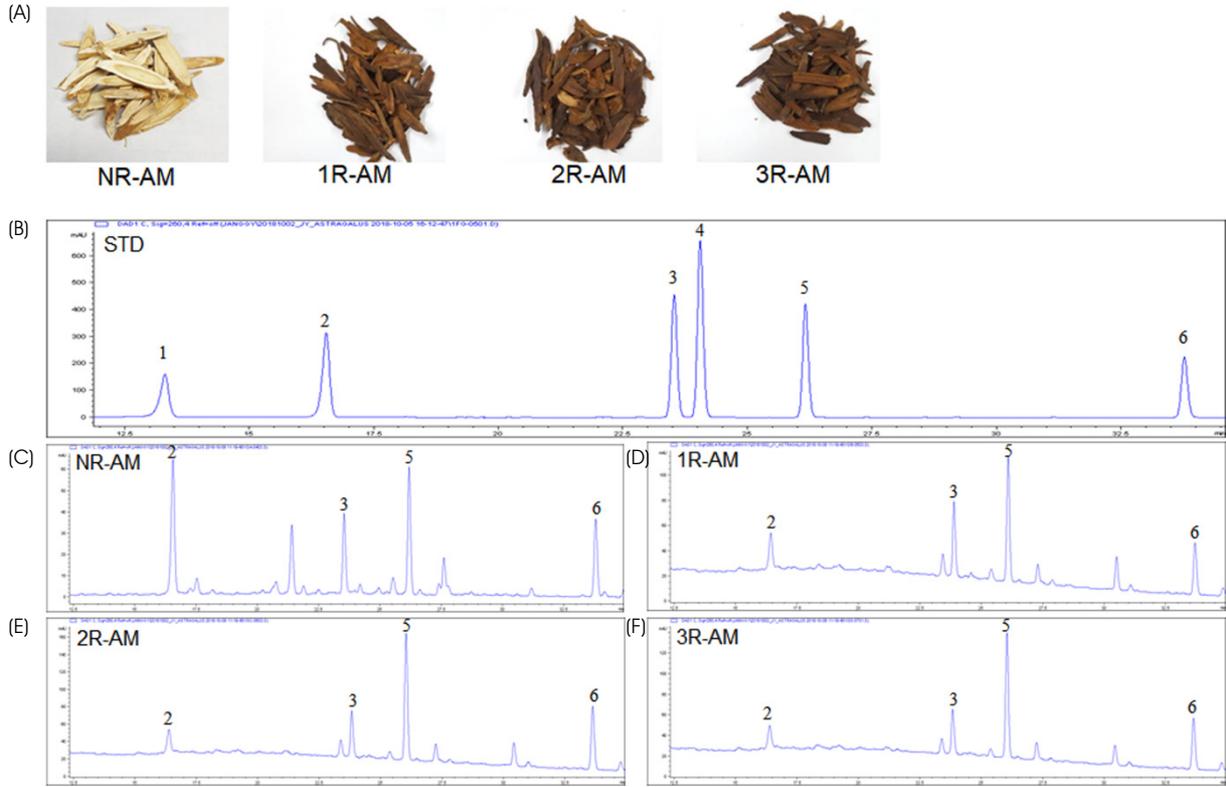


Fig. 1. Chromatogram of AMs using HPLC analysis. (A) Scheme for AM samples. NR-AM, none roasted-*Astragalus membranaceus*; 1R-AM, 1st roasted-*Astragalus membranaceus*; 2R-AM, 2nd roasted-*Astragalus membranaceus*; 3R-AM, 3rd roasted-*Astragalus membranaceus*; B-F, Chromatogram of AMs using HPLC analysis; 1, daidzein-7-O- β -D-glucoside; 2, calycosin-7-O- β -D-glucoside; 3, formononetin-7-O- β -D-glucoside; 4, daidzein; 5, calycosin; 6, formononetin.

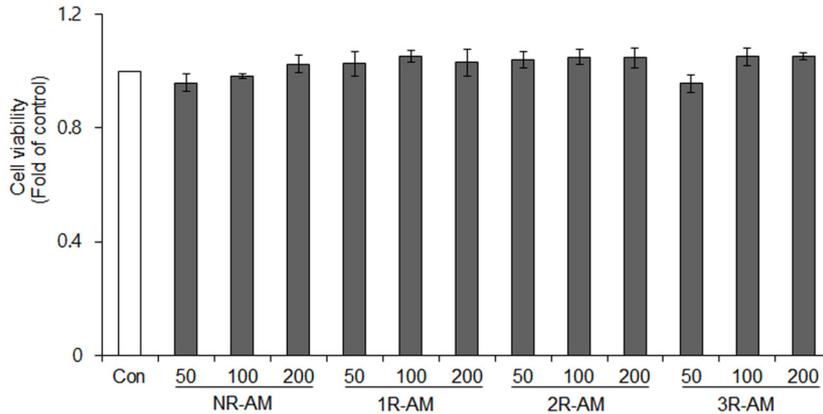


Fig. 2. Cell viability of AMs on HDF cells. HDF cells were treated R-AM samples of 50, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h. Cell viability was examined using MTS assay. NR-AM, none roasted-*Astragalus membranaceus*; 1R-AM, 1st roasted-*Astragalus membranaceus*; 2R-AM, 2nd roasted-*Astragalus membranaceus*; 3R-AM, 3rd roasted-*Astragalus membranaceus*.

calycosin의 배당체인 calycosin-7-O- β -D-glucoside의 함량이 $333.85 \pm 3.00 \mu\text{g/g}$ 로 가장 높았고 1R-AM $197.51 \pm 3.70 \mu\text{g/g}$, 2R-AM $157.82 \pm 6.03 \mu\text{g/g}$ 및 3R-AM $191.35 \pm 26.74 \mu\text{g/g}$ 순으로 측정되었다. Formononetin-7-O- β -D-glucoside의 함량은 $277.49 \pm 2.10 \mu\text{g/g}$ 로 1R-AM 추출물에서 가장

높게 측정되었고 2R-AM 추출물부터 함량이 줄어들어 3R-AM 추출물 $60.54 \pm 0.69 \mu\text{g/g}$ 로 함량이 가장 적었다. Calycosin과 formononetin의 함량은 NR-AM 추출물에 비해 1R-AM 추출물의 함량이 크게 증가하였고 2R-AM 추출물에서 calycosin 778.58 ± 2.72 , formononetin 726.80 ± 3.45

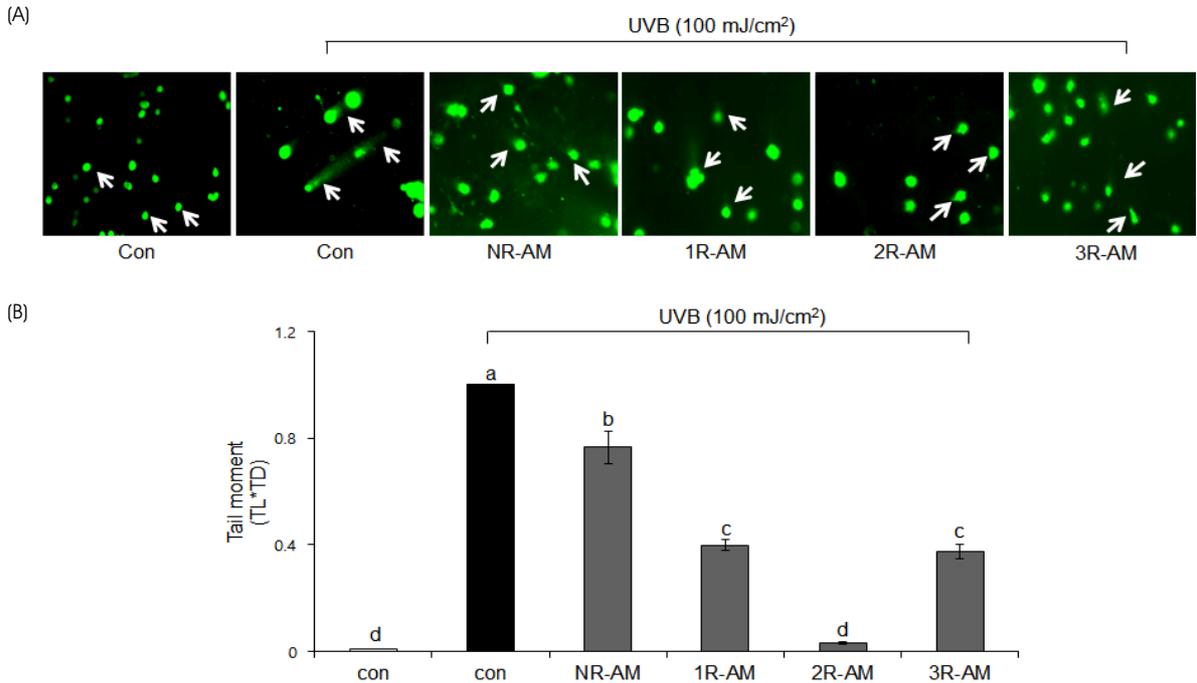


Fig. 3. Inhibitory effect of AMs during repair of UVB-induced DNA damage on HDF cells. HDF cells were cultured in 96-well plates and exposed to the indicated fluorecent of UVB. Single cells were embedded in agarose immediately after UV irradiation, electrophoresed and photographed using a fluorescent microscope to determine the "Tail moment" of each Tail length * % DNA in tail (representing the extent of DNA damage). NR-AM, none roasted-*Astragalus membranaceus*; 1R-AM, 1st roasted-*Astragalus membranaceus*; 2R-AM, 2nd roasted-*Astragalus membranaceus*; 3R-AM, 3rd roasted-*Astragalus membranaceus*; (A) Representative images of wild and UVB-induced HDF cells. (B) Tail DNA intensity was quantified by each 3 arrow points in the Fig. 1A. Results are significantly different among groups by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

$\mu\text{g/g}$ 로 가장 높게 측정되었다. 황기의 플라보노이드 화합물 분석 결과를 정리하면, 2R-AM 추출물에서 calycosin 및 formononetin의 함량이 가장 높게 측정되었고 calycosin-7-O- β -D-glucoside의 함량은 NR-AM 추출물에서 가장 높았으며 formononetin-7-O- β -D-glucoside의 함량은 1R-AM 추출물에서 가장 높았다. 또한 황기와 볶음 황기 추출물에서 daidzein과 배당체는 측정되지 않았다. 황기의 주요 성분을 정량하기 위한 크로마토그램은 Fig. 1에 나타내었다.

볶음 황기의 세포 생존율

황기 추출물이 HDF 세포에서 독성이 있는지 확인하기 위해 추출물을 각각 50, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 후 MTS assay를 수행하였다. NR-AM 추출물은 97~105%의 생존율을 보였으며, 1R-AM 94~100%, 2R-AM 95~100% 및 3R-AM 102~107%의 세포 생존율을 보였다 (Fig. 2). R-AM 추출물은 모두 세포 독성을 보이지 않았으며, 이 결과를 바탕으로 세포 생존율에 영향을 주지 않는 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 이후 연구를 진행하였다.

볶음 황기의 자외선에 의한 DNA 손상 억제 효과

황기 추출물이 UVB 처리에 따른 HDF 세포의 DNA 손상 반응 회복에 미치는 영향을 확인하기 위하여 single cell gel electrophoresis assay를 수행하였다 (Fig. 3). 자외선에 처리하였을 때, DNA가 손상되어 tail의 길이가 길어진 것을 확인하였다. NR-AM 추출물을 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 tail DNA가 UVB 처리군에 비해 24% 정도 억제되었고, 1R-AM 60%, 2R-AM 97% 및 3R-AM 66%가 억제되었고 모두 UVB 처리군에 비해 유의성 있게 tail DNA 생성을 억제하였다. 특히, 2R-AM에서 tail DNA가 가장 적게 생성된 것을 확인할 수 있었다.

볶음황기의 성분과 효능의 상관관계 분석

본 연구의 결과로 볶음 조건에 따라 황기의 총 페놀 함량, 플라보노이드 함량, 항산화 활성 및 DNA damage의 변화에 대한 상관관계를 알아보기 위해 상관분석을 실시하였다 (Table 4). 볶음 처리는 ABTS (-0.800), DPPH (-0.741) 및 DNA damage (-0.659)로 음의 상관관계를 보였고, TPC (0.682), calycosin (0.622) 및 formononetin (0.590)로 양의 상관관계를 보였다.

Table 4. The correlation coefficients between antioxidant activities and AM¹⁾ contents

Factors ²⁾	Roasting	ABTS ⁺ (IC ₅₀ value)	DPPH (IC ₅₀ value)	TPC	Calycosin	Formononetin	DNA damage
Roasting	1	-0.800**	-0.741**	0.682*	0.622*	0.590*	-0.659*
ABTS ⁺ (IC ₅₀ value)		1	-0.994**	-0.978**	-0.947**	-0.732**	0.826**
DPPH (IC ₅₀ value)			1	-0.993**	-0.967**	-0.726**	0.827**
TPC				1	0.968**	0.690*	-0.803**
Calycosin					1	0.828**	-0.905**
Formononetin						1	-0.977**
DNA damage							1

1) AM: *Astragalus membranaceus*

2) Factors: TPC, total phenol contents

Significant at *p < 0.05, **p < 0.01

고 찰

오존층의 파괴로 인해 매년 지표면에 도달하는 자외선이 증가하고 이에 따른 피부 염증 및 피부암 유발이 증가하고 있다. 자외선에 의해 생체내의 단백질, 효소 및 DNA의 손상이 일어나 암과 같은 질병을 유발하게 된다 [30]. 이러한 자외선에 의한 손상을 억제하기 위하여 비타민C, 폴리페놀 및 플라보노이드 등을 이용하고 있지만, 안정성 등의 문제가 있어 천연소재를 이용한 자외선보호 소재 개발이 요구되고 있다 [31]. 본 연구에서는 천연 소재로 사용되며 다양한 생리활성을 가지고 있는 황기를 볶음 공정을 통하여 성분 변화와 자외선을 보호 효능을 비교하였다.

폴리페놀은 활성산소를 분해하여 DNA를 보호하고 세포구성 단백질 및 효소를 보호해주는 항산화 능력이 뛰어나고, 플라보노이드는 전자나 수소 원자를 제공하여 free radical을 제거하는 항산화제로 알려져 있으며 항산화 효과는 총 페놀 및 플라보노이드의 함량과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다 [32-34]. 황기의 볶음 공정을 통한 항산화 활성을 비교하였을 때, ABTS radical scavenging assay에서는 NR-AM과 1R-AM 추출물 사이에 활성의 차이가 매우 컸지만 반복 열처리를 한 2R-AM 및 3R-AM 추출물과는 통계적으로 활성의 차이는 없었다. 반면, DPPH radical scavenging assay에서는 반복적인 볶음 공정 시 반복 수에 의해 활성이 증가하는 것을 확인하였으며, 통계적으로 유의성 있는 활성의 차이를 보였다. 열처리를 한 황기 추출물의 항산화 활성이 증가한 것은 190°C 이상의 고온을 처리하면 조직에 미세한 균열이 생기고 갈변화가 진행이 되면서 항산화 활성이 증가한 것으로 보여지며 [35], 이러한 경향은 카시아 토라 [18]의 연구결과와 유사하게 나타났다. 또한 DPPH 라디칼 소거능에서는 유기 매질에 용해된 라디칼을 사용하고, ABTS 라디칼 소거능에서는 친수성 및 유기 매질에 용해된 라디칼을 사용하므로 기질

과의 결합 정도가 달라져서 라디칼 제거 활성의 차이를 보일 수 있다 [36]. 그러므로 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능에서 IC₅₀값이 다르게 나타날 수 있고 ABTS 라디칼 소거능의 IC₅₀값이 더 낮다는 보고도 있다 [37]. 총 페놀 함량 측정을 한 결과 NR-AM 추출물에 비해 1R-AM 추출물에서 함량이 약 3배 정도 증가하였다가 반복 볶음처리 시 함량이 점점 감소하는 경향을 보였다. 이러한 경향은 볶음 참깨 [38]의 연구결과와 유사하였다. 황기의 플라보노이드 화합물인 calycosin 및 formononetin의 함량은 열처리 시 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. Calycosin과 formononetin의 배당체인 Calycosin-7-O-β-D-glucoside 및 Formononetin-7-O-β-D-glucoside 또한 함량의 변화가 일어났는데 1R-AM 추출물에서 Calycosin-7-O-β-D-glucoside은 함량이 감소하였고, Formononetin-7-O-β-D-glucoside은 함량이 증가하였다가 감소하는 경향을 나타냈다. 이것은 formononetin의 또 다른 배당체 형태인 formononetin-7-O-β-D-glucoside"-O-malonate 및 formononetin-7-O-β-D-glucoside"-O-acetate가 열처리시 분해되어 formononetin-7-O-β-D-glucoside로 전환되고 2R-AM 추출물에서 배당체가 aglycone의 형태로 전환되었기 때문이라고 사료된다 [39]. 황기에서 daidzein과 배당체를 분리하였다는 보고가 있었지만 [12], 본 연구에서는 daidzein과 배당체는 검출되지 않았다. 이것은 Kim의 연구결과와 유사하게 나타났다 [40]. Daidzein 및 daidzein- O-β-D-glucoside은 극성보다는 비극성 용매에 잘 용해되어 극성도가 큰 물 추출에서는 적합하지 않은 것으로 판단되며 추출 용매에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

피부가 자외선에 노출 되었을 때, 물리적, 생화학적 변화가 유발되어 산화적 스트레스를 일으키고 DNA 손상이 일어난다 [41]. 피부의 표피층에 속하는 HDF 세포는 자외선이나 외부자극에 가장 직접적으로 손상을 받는다. 볶음 공정을 통한 황기의 자외선에 의해 손상된 HDF 세포의

DNA 손상도를 측정된 결과, HDF 세포에 200 µg/mL로 각 추출물을 처리하였을 때 2R-AM 추출물에서 DNA 손상을 약 97% 정도 억제하는 것을 확인하였고 3R-AM 66%, 1R-AM 60% 및 NR-AM 24% 순으로 나타났다. 또한 실험 결과를 토대로 볶음 처리와 항산화 활성 및 함량의 변화에 대한 상관관계를 분석한 결과 볶음 처리는 ABTS (-0.800), DPPH (-0.741), TPC (0.682), calycosin (0.622), formononetin (0.590) 및 DNA damage (-0.659)로 유의적인 상관관계를 보였다. 1R-AM 추출물에 비해 2R-AM 추출물에서 총 페놀 함량이 감소하였지만 페놀 성분 이외의 다른 유효 성분인 calycosin과 formononetin의 성분들이 증가하여 DNA 손상을 억제한 것으로 보여진다 [42].

본 연구에서는 황기의 최적의 볶음 공정을 통해 황기의 항산화 활성이 증가되었고 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드계 성분인 calycosin과 formononetin의 함량 또한 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, HDF 세포에 자외선을 처리하였을 때 볶음 황기 추출물의 DNA 손상 억제효과와 변화 등을 확인하였다. 볶음 공정 후 증가된 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량이 UVB 처리된 HDF 세포에서 DNA 손상 억제에 영향을 주었을 것으로 예상된다.

요 약

본 연구는 황기의 최적의 볶음 공정을 하였을 때 항산화 활성의 변화를 확인하기 위해 DPPH, ABTS radical scavenging assay, 총 폴리페놀 함량 및 calycosin, formononetin과 이의 배당체인 calycosin-7-O-β-D-glucoside, Formononetin-7-O-β-D-glucoside의 분석을 실시하였다. 또한 UVB 처리로 산화적 스트레스를 유발한 HDF 세포에 추출물을 처리하여 DNA의 손상을 억제하는지 확인하였다. DPPH, ABTS radical scavenging assay 는 2R-AM 추출물에서 항산화 활성이 가장 좋았으며, 총 폴리페놀 함량은 1R-AM 추출물이 NR-AM과 비교하였을 때 월등히 증가하였지만, 2R-AM과 3R-AM과는 크게 차이가 없었다. 볶음 공정을 통한 황기는 calycosin와 formononetin의 함량이 2R-AM 추출물에서 가장 높게 측정되었다. HDF 세포에서 추출물들은 200 µg/mL까지 독성을 나타내지 않았으며, 추출물 모두 자외선에 의해 손상된 HDF 세포에서 DNA 보호효능을 유의성 있게 증가시켰다. 특히 2R-AM 추출물의 활성은 정상세포와 유사한 수준으로 보호효과를 나타내었다. 결과를 종합해봤을 때, 볶음공정을 통한 황기 추출물은 지표 성분의 변화로 인하여 자외선에 의한 피부보호효과를 증가하였을 것이라 판단되며 이는 건강기능식품이나 화장품 원료로서 가능성을 시사한다.

ORCID

박정용: <https://orcid.org/0000-0003-4964-4272>

이지연: <https://orcid.org/0000-0002-3622-7392>

김형돈: <https://orcid.org/0000-0003-0993-4347>

장귀영: <https://orcid.org/0000-0001-9467-453X>

서경혜: <https://orcid.org/0000-0002-8155-8051>

References

1. Im KR, Kim MJ, Jung TK, Yoon KS. Analysis of isoflavonoid contents in *Astragalus membranaceus* Bunge cultivated in different areas and at various ages. *KSBB J* 2010; 25(3): 271-276.
2. Park SY, Lim JM, Choi YH, Choi HS, Kim JH, Kim EJ, et al. Quality and sensory characteristics of soy sauces containing *Astragalus membranaceus* by aging period. *Korean J Food Preserv* 2015; 22(5): 636-643.
3. Lai PK, Chan JY, Cheng L, Lau CP, Han SQ, Leung PC, et al. Isolation of anti-inflammatory fractions and compounds from the root of *Astragalus membranaceus*. *Phytother Res* 2013; 27(4): 581-587.
4. Yin Y, Heo SI, Jung MJ, Wang MH. Antioxidant and antidiabetic effects of various sections of *Astragalus membranaceus*. *Korean J Pharmacogn* 2009; 40(1): 1-5.
5. Cho WC, Leung KN. In vitro and in vivo anti-tumor effects of *Astragalus membranaceus*. *Cancer Lett* 2007; 252(1): 43-54.
6. Kim MJ, Lim KR, Jung TK, Yoon KS. Anti-aging effect of *Astragalus membranaceus* root extract. *J Soc Cosmet Sci Korea* 2007; 33(1): 33-40.
7. Zhang J, Xie X, Li C, Fu P. Systematic review of the renal protective effect of *Astragalus membranaceus* (root) on diabetic nephropathy in animal models. *J Ethnopharmacol* 2009; 126(2): 189-196.
8. Lin LZ, He XG, Lindenmaier M, Nolan G, Yang J, Cleary M, et al. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus*. *J Chromatogr A* 2000; 876(1-2): 87-95.
9. Jia WC, Liu G, Zhang CD, Zhang SP. Formononetin attenuates hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced apoptosis and NF-κB activation in RGC-5 cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18(15): 2191-2197.
10. Wang X, Zhao L. Calycosin ameliorates diabetes-induced cognitive impairments in rats by reducing oxidative stress via the PI3K/Akt/GSK-3β signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 473(2): 428-434.
11. Kim JH, Kim MR, Lee ES, Lee CH. Inhibitory effects of calycosin isolated from the root of *Astragalus membranaceus* on melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull* 2009; 32(2): 264-268.
12. Li W, Sun YN, Yan XT, Yang SY, Kim S, Lee YM, et al. Flavonoids from *Astragalus membranaceus* and their inhibitory effects on LPS-stimulated pro-inflammatory cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells. *Arch Pharm Res* 2014;

- 37(2): 186-192.
13. Suh CS, Chun JK. Relationships among the roasting conditions, colors and extractable solid content of roasted barley. *Korean J Food Sci Technol* 1981; 13(4): 334-339.
 14. Park MH, Kim KC, Kim JS. Changes in the physicochemical properties of ginseng by roasting. *J Ginseng Res* 1993; 17(3): 228-231.
 15. Saklar S, Urgan S, Katnas S. Microstructural changes in hazelnuts during roasting. *Food Res Int* 2003; 36(1): 19-23.
 16. Hwang IG, Kim HY, Joung EM, Woo KS, Jeong JH, Yu KW, et al. Changes in ginsenosides and antioxidant activity of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) with heating temperature and pressure. *Food Sci Biotechnol* 2010; 19(4): 941-949.
 17. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2002; 50(10): 3010-3014.
 18. Lee MH, Cho JH, Kim BK. Effect of roasting conditions on the antioxidant activities of *Cassia tora* L. *Korean J Food Sci Technol* 2013; 45(5): 657-660.
 19. Park JH, Han JS, Choi HK. Effect on quality of pan-fired green tea by 1st pan-firing time. *Korean J Med Crop Sci* 1999; 7(2): 101-106.
 20. Lee YG, Lim SU, Kim JO. Influence of roasting conditions on the flavor quality of sesame seed oil. *Agric Chem Biotechnol* 1993; 36(6): 407-415.
 21. Lee SH, Lee YR, Hwang IG, Woo KS, Kim KH, Kim KJ, et al. Antioxidant activities and quality characteristics of germinated rough rice tea according to roasting temperature, time and leaching condition. *Korean J Food Sci Technol* 2009; 41(4): 386-391.
 22. Oh BH. Pathogenesis and prevention of skin cancer. *J Korean Med Assoc* 2018; 61(11): 644-648.
 23. Kim J, Park SS, Cho N, Kim W, Cho HK. Recent variations of UV irradiance at Seoul 2004 ~ 2010. *Atmosphere* 2011; 21(4): 429-438.
 24. Chong Z, Matsuo H, Onoue S, Yamamoto H, Ito H, Katakura Y. Identification of polyphenols that repair the ultraviolet-B-induced DNA damage via SIRT1-dependent XPC/XPA activation. *J Funct Foods* 2019; 54: 119-127.
 25. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH-free radical method. *Lebenson Wiss Technol* 1997; 30(6): 609-615.
 26. van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem* 1999; 66(4): 511-517.
 27. Fazio A, Plastina P, Meijerink J, Witkamp RF, Gabriele B. Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food Chem* 2013; 140(4): 817-824.
 28. Choi EH, Lee DY, Park HS, Shim SM. Changes in the profiling of bioactive components with the roasting process in *Lycium chinense* leaves and the anti-obesity effect of its bioaccessible fractions. *J Sci Food Agric* 2019; 99(9): 4482-4492.
 29. Kim HG, Kim GW, Oh H, Yoo SY, Kim YO, Oh MS. Influence of roasting on the antioxidant activity of small black soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Lebenson Wiss Technol* 2011; 44(4): 992-998.
 30. Seo EJ, Hong ES, Choi MH, Kim KS, Lee SJ. Antioxidant and skin whitening effects of *Rhamnus yoshinoi* extracts. *Korean J Food Sci Technol* 2010; 42(6): 750-754.
 31. Nho JW, Hwang IG, Joung EM, Kim HY, Chang SJ, Jeong HS. Biological activities of *Magnolia denudata* Desr. flower extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2009; 38(11): 1478-1484.
 32. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 2009; 53(2): 75-100.
 33. Jabbari M, Jabbari A. Antioxidant potential and DPPH radical scavenging kinetics of water-insoluble flavonoid naringenin in aqueous solution of micelles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2016; 489: 392-399.
 34. Lim JA, Yun BW, Baek SH. Antioxidative Activity and nitrite scavenging ability of methanol extract from *Salvia plebeia* R. Br. *Korean J Med Crop Sci* 2007; 15(3): 183-188.
 35. Jang HL, Park SY, Nam JS. The effects of heat treatment on the nutritional composition and antioxidant properties of hempseed (*Cannabis sativa* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2018; 47(9): 885-894.
 36. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal* 2011; 24(7): 1043-1048.
 37. Lee JY, Park JY, Kim HD, Lee SE, Lee JH, Lee Y, et al. Anti-oxidant and anti-adipocyte differentiation of *Aster glehni* and *Aster yomena*. *J Nutr Health* 2019; 52(3): 250-257.
 38. Jeong SM, Kim SY, Kim DR, Nam KC, Ahn DU, Lee SC. Effect of seed roasting conditions on the antioxidant activity of defatted sesame meal extracts. *J Food Sci* 2004; 69(5): C377-C381.
 39. Lee KH, Choi HS, Choi YH, Park SY, Song J. Changes in isoflavone content and quality characteristics of Cheonggukjang prepared with *Bacillus subtilis* HJ18-3 and KACC 15935. *Korean J Food Preserv* 2014; 21(1): 121-128.
 40. Kim CS, Lee YS, Kim JS, Han YH. High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones in soybean foods. *Korean J Food Sci Technol* 2000; 32(1): 25-30.
 41. Jiang SJ, Chu AW, Lu ZF, Pan MH, Che DF, Zhou XJ. Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient. *Exp Dermatol* 2007; 16(12): 985-992.
 42. Lee MY, Han JH, Kang MH. Protective effect of Korean diet food groups on lymphocyte DNA damage and contribution of each food group to total dietary antioxidant capacity (TDAC). *J Nutr Health* 2016; 49(5): 277-287.