

국내산 아로니아 열매 추출물의 항산화 활성 및 A549 세포에 대한 세포독성 연구

김동욱¹ · 박미혜² · 김미라^{3*}

¹경북대학교 식품영양학과 석사, ²경북대학교 식품영양학과 박사, ³경북대학교 식품영양학과, 장수생활과학연구소 교수

Study on Antioxidant Activity and Cytotoxicity to A549 Cells of Korean Aronia Fruit Extracts

Dong Wook Kim¹, Mi Hye Park² and Meera Kim^{3*}

¹Master, Dept. of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

²Ph. D., Dept. of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

³Professor, Dept. of Food Science and Nutrition, Center for Beautiful Aging, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

ABSTRACT

The extracts of aronia (*Aronia melanocarpa*) fruits grown in Korea were prepared with hot water and ethanol. The functional compounds, antioxidant activity, and cytotoxicity of the ethanol extract from aronia fruit (EA) and the water extract from aronia fruit (WA) were analyzed. The contents of total polyphenol, total flavonoid, and total vitamin C of EA were significantly higher than those of WA. In the analysis of phenolic compounds using an HPLC, the rutin contents of EA and WA were 90.59 mg/100 g and 72.54 mg/100 g, respectively. The antioxidant activity was evaluated by DPPH and ABTS radical scavenging activity analysis and FRAP assay. EA showed a significantly higher antioxidant activity than WA in all three analyses. The cytotoxicity to human lung cancer cells (A549) was analyzed using SRB assay. As a result of the SRB assay, the cytotoxicity of EA and WA to A549 cells at a concentration of 500 µg/mL was 68.99% and 54.25%, respectively, indicating that both EA and WA have high cytotoxicity to A549 cells. Therefore, the biological activity of aronia fruit extracts was verified through this study, and these extracts are expected to be used as functional food materials.

Key words: aronia, antioxidant activity, A549 cells, cytotoxicity, HPLC

서 론

최근 서구화된 식습관, 가공식품 섭취 증가, 운동 부족 등으로 인해 동맥경화, 고혈압, 당뇨병, 암과 같은 여러 가지 성인병의 발병률이 증가하고 있다. 이로 인해 부작용이 적으면서 성인병 예방에 효과적인 천연물질에 대한 관심이 증가하고 있다(Lim SJ & Kim SH 2001). 산소는 체내에서 일어나는 에너지 대사에 필수적이지만, 일부 산소는 생체에 악영향을 끼치는 활성산소로 전환된다(Lee SO 등 2005). 활성산소종(Reactive Oxygen Species; ROS)은 열, 자외선 등 물리적 요인, 환경적인 요인, 대사작용 및 효소작용과 같은 생체 내 생리대사에 의해 생성되고, 그 종류로는 hydroxyl radical, hypochlorite, superoxide radical, singlet oxygen 등이 있다(Bohr VA 2002). 이러한 활성산소종은 고분자 세포 성분들과 쉽게 반응하여 산화적 스트레스 환경을 조성하고, 단백질

과 DNA의 변성, 지질 과산화 등을 유도하며, 이로 인해 암, 노화, 류마티스 관절염, 염증반응, 죽상경화증 및 철분 과잉 증 등과 같은 각종 질병들을 유발한다고 알려져 있다(Halliwell B & Gutteridge JMC 1984; Wiseman H 1996). 이러한 활성산소종의 생성과 산화작용을 방지하기 위해 경제적이고 항산화력이 우수한 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxyanisole)와 BHT(butylated hydroxytoluene) 등이 자주 사용되고 있으나, 과량 섭취하거나 체내에 축적되었을 경우, 인체에 심각한 부작용을 일으킬 수 있다. 따라서 항산화력이 우수하며 독성과 부작용의 위험이 적은 비타민 C, 비타민 E, 파이토케미컬(phytochemical)인 폴리페놀(polyphenols), 플라보노이드(flavonoids) 화합물과 같은 천연 항산화제를 함유한 천연물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Williams GM 등 1990).

아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 북아메리카에서 자생하는 장미과에 속하는 낙엽관목의 베리류이다(Wu X 등 2004). 최근 아로니아 열매의 항산화 활성(Bermudez-Soto MJ & Tomas-Barberan FA 2004), 항암 활성(Lala G 등 2006), 항염

* Corresponding author : Meera Kim, Tel: +82-53-950-6233, Fax: +82-53-950-6229, E-mail: meerak@knu.ac.kr

증 활성(Ohgami K 등 2005), 항당뇨 활성(Badescu M 등 2014), 면역조절 기능(Gasiorowski K 등 2000) 등 생리활성과 관련된 연구들이 활발히 수행되었으며, 아로니아 열매에는 안토시아닌과 같은 폴리페놀 화합물, 플라보노이드 등의 성분이 다량 함유되어 있다고 보고되었다(Oszmianski J & Wojdylo A 2005). 또한, Kang AR 등(2018)은 에스트로젠을 결핍시킨 쥐에게 아로니아 추출물을 투여했을 때 갱년기 증후군이 개선되었다고 보고하였고, Ju SY 등(2019)은 아로니아 추출물이 흰쥐에서 콜레스테롤의 소장 흡수를 억제한다고 보고하여 아로니아가 다양한 생리활성을 가지고 있음을 보여주었다.

따라서 본 연구에서는 국내산 아로니아 열매의 항산화 활성 및 암세포에 대한 세포독성 효과를 확인하기 위하여 아로니아 열매를 열수 및 70% 에탄올로 추출하여 추출물의 기능성 성분인 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 총 비타민 C의 함량을 분석하였고, high performance liquid chromatography(HPLC)를 통해 페놀성 화합물의 함량을 측정하였으며, 항산화 활성을 확인하기 위해 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능, 2,2'-amino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS) 라디칼 소거능, ferric reducing antioxidant power(FRAP) assay를 측정하였고, A549(인체 폐암 세포)에 대한 세포독성을 측정하기 위하여 sulforhodamine B (SRB) assay를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 아로니아 열매는 2019년 우리나라 경북에서 재배하여 수확한 것을 구입하여 사용하였다.

2. 시약

실험에 사용된 DPPH, ABTS, dimethyl sulfoxide(DMSO), L-ascorbic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, quercetin은 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하였으며, fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin solution, 0.25% trypsin EDTA solution은 Gibco BRL(USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified eagle's minimal essential medium(DMEM/High glucose)은 Hyclone Co.(USA)에서 구입하여 사용하였다.

3. 아로니아 열매 추출물 제조

아로니아 열매를 에탄올과 증류수로 추출하였다. 에탄올 추출물(EA)은 아로니아 열매 80 g에 70% 에탄올 400 mL를 가하고, 25℃에서 12시간 동안 교반하여 2회 반복 추출한 다

음, 여과지(Whatman No. 2, England)로 여과한 후 감압농축기(Eyela, Tokyo Rikakikai Co, Japan)로 농축하고 동결건조기(VD-400F, TAITEC Co, Japan)로 동결건조하여 제조하였다. 또한 열수 추출물(WA)은 아로니아 열매 80 g에 증류수 400 mL를 가한 뒤 항온수조에서 60℃를 유지하면서 12시간 동안 2회 반복 추출한 다음, 여과지로 여과한 후 감압농축기로 농축하고, 동결건조기로 건조하여 제조하였다. 제조된 추출물은 -18℃에서 냉동 보관하며 실험에 사용하였다.

4. 총 폴리페놀 함량 측정

아로니아 열매 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu(FC)법에 따라 분석하였다(Singleton VL & Rossi JA 1965). 아로니아 추출물 1 mL에 증류수 5 mL, Folin-Ciocalteu 시약 0.5 mL를 가해 교반하여 혼합하였다. 8분 후 7% Na₂CO₃ 10 mL를 첨가하고, 증류수로 부피를 25 mL로 맞춘 다음 암소에서 2시간 동안 방치하고, UV/visible spectrophotometer(UV-1800, Shimadzu, Japan)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 검량곡선을 작성하여 구하였다. 3회 반복하여 측정하였고, g당 gallic acid mg당량(mg GAE/g)으로 나타내었다.

5. 총 플라보노이드 함량 측정

아로니아 열매 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Moreno MI 등(2000)의 방법을 이용하여 측정하였다. 각 시료 0.5 mL에 10% aluminum nitrate 1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL와 80% 에탄올 4.3 mL를 혼합한 다음 40분 동안 암소에서 방치한 후 UV/visible spectrophotometer를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 표준물질로 검량곡선을 작성하여 구하였다. 3회 반복하여 측정하였고 g당 quercetin mg당량(mg QE/g)으로 나타내었다.

6. 총 비타민 C 함량 측정

아로니아 열매 추출물의 총 비타민 C 함량은 식품공전(Ministry of Food and Drug Safety, 2020)에서 고시한 2,4-dinitrophenyl hydrazine(DNPH)을 이용한 정량법으로 측정하였다. 시료 2 g과 metaphosphoric acid-acetic acid를 1:1의 비율로 혼합한 다음, 묶은 metaphosphoric acid-acetic acid 100 mL에 녹인 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액 2 mL에 indophenol 용액을 2~3방울 떨어뜨려 적색이 나타나게 하고, metaphosphoric acid thiourea 2 mL 가한 다음 DNPH 1 mL를 가하여 3시간 동안 37℃ 항온수조에서 반응시켰다. 반응 후, 얼음물에서 냉각시키면서 85% H₂SO₄ 5 mL를 천천히 가하고, 30분 동안 실온에서 방치한 다음 UV/

visible spectrophotometer를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 3회 반복 실험하였고, L-ascorbic acid를 표준물질로 검량곡선을 작성하여 시료 중 총 비타민 C 함량을 계산하였다.

7. 페놀성 화합물의 HPLC 분석

아로니아 열매 추출물에 함유된 페놀성 화합물의 정량 분석을 위해 페놀성 화합물인 gallic acid, rutin, myricetin, quercetin 및 caffeic acid를 HPLC(Prominence, Shimadzu, Japan)을 이용하여 분석하였다. 아로니아 열매 추출물을 증류수로 용해한 후, 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 Table 1의 조건으로 분석하였으며, Shimadzu Class-VP version 6.14 SP1 software로 데이터를 수집 및 분석하였다.

8. DPPH 라디칼 소거능 측정

아로니아 열매 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 Blois MS(1958)의 방법을 이용하여 측정하였다. 농도별 시료 1 mL에 7.5×10^{-5} M DPPH 용액 2 mL를 혼합하고, 37°C에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 UV/visible spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였고, DPPH 라디칼 소거 활성은 아래의 식을 이용하여 백분율로 나타내었으며, 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었고, IC₅₀을 구하였다.

Table 1. The conditions for HPLC analysis of phenolic compounds in aronia fruit extracts

Items	Conditions		
Instrument	Prominence		
Column	Phenomenex C18 RP column (5 μ m, 250 $\times$ 4.6 mm)		
Column temperature	30°C		
Flow rate	1 mL/min		
Injection volume	10 μ L		
Wavelength	265 nm	Gallic acid	
	320 nm	Caffeic acid	
	370 nm	Rutin, myricetin, quercetin	
Gradient condition	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	75	15
	15	75	15
	20	50	50
	35	30	70
	50	0	100
Mobile phase	A: 2% acetic acid in water		
	B: 2% acetic acid in methanol		

DPPH 라디칼 소거능(%) =

$$\frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

9. ABTS 라디칼 소거능 측정

아로니아 열매 추출물의 ABTS 라디칼 소거능을 통한 항산화 활성 평가는 Re R 등(1999)의 방법을 이용하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 12시간 동안 30°C의 암소에서 방치한 후 5 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 413 nm에서 흡광도가 0.7이 되도록 희석하였다. 희석한 ABTS 시약 4 mL에 농도별로 제조한 시료 40 μ L를 혼합하여 1분 동안 반응시킨 후 413 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였고, ABTS 라디칼 소거 활성은 DPPH 라디칼 소거 활성을 구하는 식과 동일한 식을 이용하여 백분율로 나타내었고, 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었으며, IC₅₀을 구하였다.

10. FRAP 측정

FRAP 값은 Benzie F & Strain J(1996)의 방법으로 측정하였다. 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl를 용매로 한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ), 20 mM FeCl₃ · 6H₂O를 10:1:1(v/v/v)의 비율로 FRAP 시약을 제조하여 각 농도별 시료 0.5 mL에 FRAP 시약 3.5 mL를 가해 혼합한 후, UV/ visible spectrophotometer를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하고, 37°C에서 5분간 방치한 다음 흡광도를 다시 측정하였다. 시료의 환원력을 확인하기 위해 FeSO₄ · 7H₂O를 표준물질로 한 검량곡선을 작성하여 FRAP 값을 구하였다. 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

11. 세포주 배양

암세포주는 한국세포주은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)로부터 A549(인체 폐암세포)를 분양받아 본 실험에 사용하였다. 배지는 DMEM 배지에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 복합배지로 조제하였고, 각 세포는 CO₂ incubator(37°C, 5% CO₂)에서 계대배양하여 사용하였다.

12. SRB Assay

SRB assay는 Doll R & Peto R(1981)의 방법을 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 배양한 암세포를 5×10^4 cells/mL의 농도로 분주하고 24시간 동안 배양한 후 농도별 시료를 각각 100 μ L씩 첨가하여 37°C의 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 배양 후 각 well의 배양액을 모두 제거하고,

10% TCA를 100 μ L를 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 방치한 후 TCA를 제거하고, 96 well plate를 멸균수로 5회 세척한 뒤 실온에서 건조하였다. 건조한 well에 1% acetic acid로 녹인 0.4% sulforhodamine B를 100 μ L씩 첨가하여 30분간 반응시킨 후 1% acetic acid로 5회 세척한 뒤 상온에서 건조하였다. 10 mM tris buffer(pH 10.5)를 100 μ L 첨가한 후 ELISA reader(Versamax, Molecular Device, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. SRB assay를 통한 암세포에 대한 세포 독성은 아래와 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{\text{시료 무첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구의 흡광도} - \text{시료 첨가구의 흡광도}} \times 100$$

13. 통계분석

실험결과는 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타내었고, SPSS 통계프로그램(10.0 version)을 이용하여 분산분석(analysis of variance) 및 *t*-test를 실시하여 유의성 검증을 하였으며, 사후검증으로 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 아로니아 열매 추출수율

아로니아 에탄올 추출물(EA)과 아로니아 열수 추출물(WA)의 추출수율은 Table 2와 같이 EA는 7.85%, WA는 9.34%로 나타났으며, WA와 EA 사이의 유의적인 차이는 없었다.

2. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

EA와 WA의 총 폴리페놀 함량은 Table 2에 나타난 바와 같이 각각 40.26 mg GAE/g, 35.45 mg GAE/g으로 EA의 총 폴리페놀 함량이 유의적으로 더 높게 나타났다. Hong JH (2018)은 80% 메탄올로 추출한 베리류의 총 폴리페놀 함량이 strawberry 19.48 mg GAE/g, raspberry 19.59 mg GAE/g,

blueberry 17.51 mg GAE/g, cranberry 28.67 mg GAE/g이라고 보고하여 본 실험의 아로니아 열매 추출물이 이들 베리류 추출물에 비해 총 폴리페놀 함량이 비교적 높은 것을 확인할 수 있었다. 폴리페놀은 anthocyanins, flavanols, flavonols, resveratrol과 phenolic acid를 포함하며, phenolic hydroxyl groups를 가지고 있어 단백질과 같은 거대분자와 결합하여 radical을 제거해 산화를 억제한다. 이러한 폴리페놀은 항심혈관질환, 항암, 항산화, 항염증, 항노화 작용 등 여러 가지 생리활성과 건강증진 효과가 있어 매우 중요한 파이토케미컬로 알려져 있는데(Cha JY 등 1999; Xia EQ 등 2010), 본 연구에서 아로니아 추출물의 총 폴리페놀 함량이 높게 나타나 항산화, 항암 등의 생리활성에 기여할 것으로 기대되었다.

또한 EA와 WA의 총 플라보노이드 함량은 Table 3과 같이 각각 13.90 mg QE/g, 11.49 mg QE/g으로, EA의 총 플라보노이드 함량이 유의적으로 높게 나타났다. Hong JH (2018)은 80% 메탄올로 추출한 여러 가지 베리류의 총 플라보노이드 함량이 strawberry 0.45 mg QE/g, raspberry 1.02 mg QE/g, blueberry 1.59 mg QE/g, blackberry 3.75 mg QE/g, cranberry 3.21 mg QE/g, mulberry 5.27 mg QE/g으로 보고하였는데, 아로니아 열매 추출물의 총 플라보노이드 함량이 이들 베리류에 비해 높은 것으로 나타났다. 플라보노이드는 3개의 탄소 단위가 2개의 페놀 고리로 결합된 화합물로 anthocyanins, flavonols, flavones, catechins 및 flavanones 등이 이에 속한다. 플라보노이드는 과일과 채소 등에 존재하며, 천연 산화 방지제로 작용하여 free radical, 지질 과산화에 대한 항산화 효과뿐만 아니라, 항동맥경화, 항암, 항염증 등의 효과를 가지고 있다고 보고되었다(Hertog MGL 등 1993; Croft KD 1998). 본 연구의 아로니아 열매 추출물에도 플라보노이드가 상당량 함유되어 있어 항산화 관련 생리활성 효과를 높일 것으로 생각된다.

3. 총 비타민 C 함량

EA와 WA의 총 비타민 C 함량은 각각 71.19 mg/100 g,

Table 2. Extraction yields and contents of total polyphenols, total flavonoids, and total ascorbic acid in ethanol extract and water extract from aronia fruit

Sample ¹⁾	Yield (% w/w)	Total polyphenols (mg GAE/g) ²⁾	Total flavonoids (mg QE/g) ³⁾	Total vitamin C (mg/100 g)
EA	7.85 $\pm$ 2.9	40.26 $\pm$ 0.82 ^{4)***5)}	13.90 $\pm$ 0.45**	71.19 $\pm$ 0.53***
WA	9.34 $\pm$ 1.7	35.45 $\pm$ 0.89	11.49 $\pm$ 0.96	59.75 $\pm$ 3.70

¹⁾ EA: ethanol extract from aronia fruit, WA: water extract from aronia fruit.

²⁾ mg of gallic acid equivalents/g of sample.

³⁾ mg of quercetin equivalents/g of sample.

⁴⁾ Values are means of triplicate with standard deviation (n=3).

⁵⁾ Means are significantly different between EA and WA by student's *t*-test (** *p*<0.01, *** *p*<0.001).

59.75 mg/100 g으로 측정되어 EA가 WA에 비해 총 비타민 C 함량이 유의적으로 높은 것으로 나타났다(Table 2). Catana L 등(2017)의 연구에서 생아로니아 열매의 비타민 C 함량을 31.85 mg/100 g으로 보고하였는데, 본 연구의 EA와 WA 추출수율을 고려하여 비타민 C 함량을 비교해볼 때 에탄올과 열수 추출과정을 거치면서 아로니아 열매의 비타민 C 함량이 감소한 것으로 보인다. Njoku PC 등(2011)의 연구에 의하면 감귤류 과일을 온도별로 착즙하였을 때, 온도가 20℃에서 80℃로 높아질수록 열에 의해 비타민 C가 파괴되어 비타민 C의 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 Ryu IH & Kwon TO(2012)의 연구에서도 100℃로 추출한 오디의 열수 추출물에서는 비타민 C가 검출되지 않았으나, 오디 착즙액에서는 19.4 mg/100 g의 비타민 C가 함유되어 있다고 보고하여 비타민 C가 가공온도에 영향을 받는 것을 보여주었다. 본 연구에서도 WA의 추출온도는 60℃이고, EA의 추출온도는 25℃로 EA에 비해 추출온도가 높은 WA에서 비타민 C가 더 많이 파괴된 것으로 사료된다. 한편, Park YK 등(2008)의 연구에서 품종별 복분자 에탄올 추출물은 15.17~21.64 mg/100 g의 비타민 C를 함유하고 있다고 보고하여 이와 비교해볼 때 본 연구의 아로니아 추출물의 비타민 C 함량이 매우 높은 것을 확인할 수 있었다. 비타민 C는 생체 내에서 항산화 및 환원제로서 중요한 역할을 하며, 각종 질병을 유발할 수 있는 자유라디칼을 환원시켜 세포손상으로부터 세포를 보호해 주는데(Bsoul SA & Terezhalmay GT 2004), 아로니아에 다량의 비타민 C가 함유되어 있어 높은 항산화력을 나타낼 것으로 예상되었다.

4. 페놀성 화합물의 HPLC 분석

EA와 WA의 페놀성 화합물을 HPLC로 분석한 결과를 Table 3에 나타내었다. EA의 페놀성 화합물의 함량은 rutin 90.59 mg/100 g, myricetin 2.48 mg/100 g, gallic acid 2.06 mg/100 g, quercetin이 1.70 mg/100 g이었고, caffeic acid는 불검출되었다. WA의 페놀성 화합물의 함량은 rutin 72.54 mg/100 g, myricetin 2.85 mg/100 g, gallic acid 2.74 mg/100 g, quercetin 1.36 mg/100 g으로 분석되었고, caffeic acid는 불검출되었다. EA가 WA에 비해 rutin과 quercetin의 함량이 높았고, WA가 EA에 비해 gallic acid와 myricetin의 함량이 높았다. 분석 결과, EA와 WA 모두에서 rutin 함량이 가장 높게 나타났는데, rutin은 quercetin에 rutinose가 결합된 배당체 구조를 가지고 있는 페놀성 화합물로 지질 과산화, 인체 내 산화효소 저해 등 항산화 효과가 우수한 물질이다(Jeon HJ 등 2016). Kim JS 등(2018)의 선행연구에 의하면 나무딸기, 복분자, 블랙베리 에탄올 추출물을 HPLC 분석하였을 때 rutin의 함량이 각각 0.74 mg/100 g, 5.05 mg/100 g, 0.5 mg/100

Table 3. Contents of total phenolic compounds in ethanol extract and water extract from aronia fruit

Sample	Phenolic compound (mg/100 g)				
	Gallic acid	Rutin	Myricetin	Quercetin	Caffeic acid
EA ¹⁾	2.06	90.50	2.48	1.70	ND ³⁾
WA ²⁾	2.74	72.54	2.85	1.36	ND

¹⁾ EA: ethanol extract from aronia fruit.

²⁾ WA: water extract from aronia fruit.

³⁾ ND: Not detected.

g이라고 보고하여, rutin이 여러 베리류에서 검출되는 페놀성 화합물이며, 본 연구의 아로니아 열매 추출물에 함유된 rutin 함량이 이들 베리류에 비해 상당히 높은 것을 확인할 수 있었다.

5. DPPH 라디칼 소거능

EA와 WA의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 대조군인 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 27.18 µg/mL로 나타났으며, EA와 WA의 IC₅₀ 값은 각각 68.33 µg/mL, 75.44 µg/mL로 EA가 WA에 비해 DPPH 라디칼 소거능이 높은 것으로 나타났다. Jin DH 등(2016)은 폴란드산 아로니아를 70% 에탄올과 열수로 추출하고 DPPH assay를 실시한 결과 IC₅₀ 값이 각각 129 µg/mL, 250 µg/mL라고 보고하여, 본 연구의 국내산 아로니아 추출물이 좀 더 높은 DPPH 라디칼 소거능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 EA와 WA의 농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 경향을 보였으며, 실험한 모든 농도에서 EA가 WA보다 유의적으로 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보여 추출용매에 따라 DPPH 라디칼 소거능에 차이를 보였다. EA는 최고 농도인 300 µg/mL에서 80.83%의 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보여 우수한 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 나타났으며, WA도 EA에 비해 DPPH 라디칼 소거능이 다소 낮았지만 300 µg/mL에서 77.30%의 라디칼 소거능을 나타내 우수한 항산화 활성을 보여주었다. 이는 앞의 실험결과에서 항산화 활성을 가지는 총 폴리페놀 화합물과 총 플라보노이드 화합물 및 비타민 C의 함량이 WA보다 EA에 더 많이 함유되어 있었는데, 이러한 항산화성 화합물들이 DPPH 라디칼 소거를 위한 전자공여능에 기여했기 때문으로 생각된다. 또한 Lim HJ 등(2015)의 연구에서 70% 에탄올로 추출한 acaiberry, blueberry, corni, mulberry의 DPPH 라디칼 소거능이 500 µg/mL에서 각각 59.4%, 32%, 77.5%, 62%라 보고하여, 본 연구에서 측정된 아로니아 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 이들 베리류에 비해 저농도에서도 높게 나타나, 아로니아의 항산화 활성

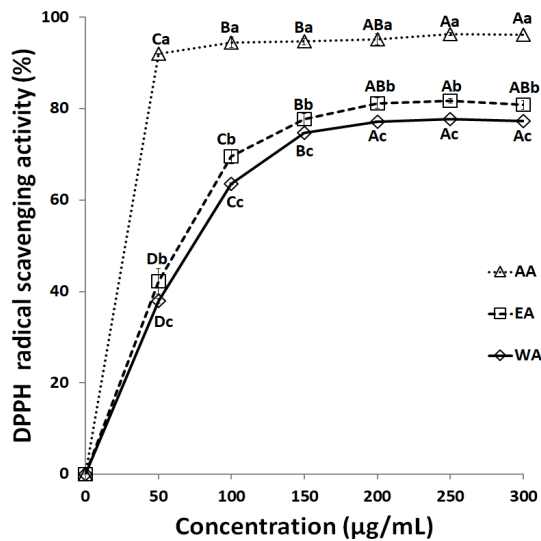


Fig. 1. The electron donating ability of ethanol extract and water extract from aronia fruit using the DPPH assay. EA: ethanol extract from aronia fruit, WA: water extract from aronia fruit, A.A: ascorbic acid. Means with different capital letters (A~D) are significantly different among the different concentrations in the same sample by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). Means with different small letters (a~c) are significantly different among the different samples in the same concentration by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

이 우수한 것을 확인할 수 있었다.

6. ABTS 라디칼 소거능

EA와 WA의 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 대조군인 L-ascorbic acid의 IC_{50} 값은 $6.7 \mu\text{g/mL}$ 로 ABTS 라디칼 소거능이 높았고, EA의 IC_{50} 값은 $11.18 \mu\text{g/mL}$, WA의 IC_{50} 값은 $11.51 \mu\text{g/mL}$ 로 측정되어 EA가 WA에 비해 ABTS 라디칼 소거능이 높은 것으로 나타났다. 이는 앞의 DPPH 라디칼 소거능 분석 결과와 마찬가지로 WA에 비해 EA에 총 폴리페놀 화합물과 총 플라보노이드 및 비타민 C 등 항산화 활성 관련 화합물이 더 많이 포함되어 있기 때문으로 사료된다. 또한 EA와 WA 두 추출물 모두 $50 \mu\text{g/mL}$ 농도에서 97.49%의 높은 ABTS 라디칼 소거능을 보여 우수한 항산화 활성을 가지고 있는 것이 확인되었다. Lim HJ 등(2015)의 연구에 의하면 70% 에탄올로 추출한 acaiberry, blueberry, corni, mulberry의 ABTS 라디칼 소거능이 $500 \mu\text{g/mL}$ 에서 각각 83.1%, 59.8%, 90.5%, 61.8%로 보고되어 이들과 비교할 때 아로니아 추출물은 낮은 농도에서도 높은 ABTS 라디칼 소거능을 나타내 높은 항산화 활성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다. 한편, Jin DH 등(2016)의 연구에서 폴란드산 아로니아를 70% 에탄올과 열수로 추출하고 ABTS assay를

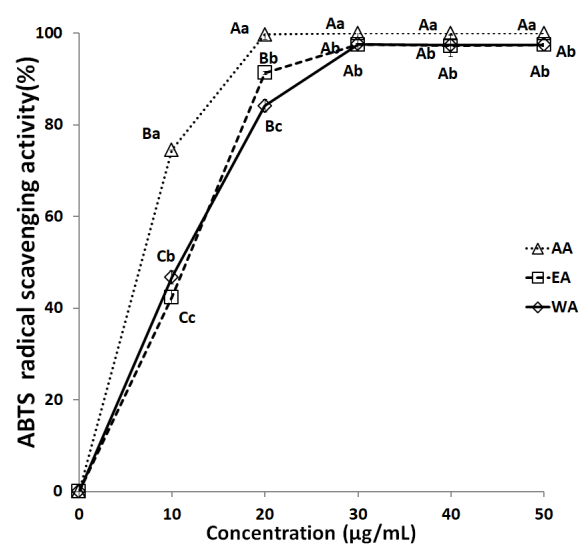


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of ethanol extract and water extract from aronia fruit.

EA: ethanol extract from aronia fruit, WA: water extract from aronia fruit, A.A: ascorbic acid. Means with different capital letters (A~C) are significantly different among the different concentrations in the same sample by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). Means with different small letters (a~c) are significantly different among the different samples in the same concentration by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

실시한 결과, IC_{50} 값이 각각 $523 \mu\text{g/mL}$, $982 \mu\text{g/mL}$ 라고 보고하여, 본 연구의 국내산 아로니아 추출물의 ABTS 라디칼 소거능이 더 우수한 것으로 나타났다.

7. FRAP Assay

FRAP value는 EA와 WA 모두 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가하였는데(Table 4), Nam JS 등(2015)의 연구에서도 아로니아 착즙액의 농도가 증가함에 따라 FRAP 활성이 증가하였다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다. FRAP assay에서도 EA가 WA에 비해 FRAP value가 유의적으로 높게 나타나, DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능의 결과와 일치하였다. DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능은 라디칼의 소거 활성을 측정하는 방법이고, FRAP assay는 시료의 환원력을 측정하는 방법으로 이들 실험의 항산화 측정 원리는 다르지만 본 연구에서 수행한 이들 항산화 실험에서 아로니아 추출물의 항산화 활성이 우수하였으며, WA에 비해 EA의 항산화 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

8. SRB Assay

SRB assay는 생존한 세포의 핵 단백질을 SRB 시약으로 염색하여 세포증식 억제효과를 확인하여 세포독성을 측정하

Table 4. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of ethanol extract and water extract from aronia fruit

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	FRAP values (FeSO_4 eq μM)	
	EA ¹⁾	WA ²⁾
50	24.09 $\pm$ 0.14 ^{D3)*4)}	16.67 $\pm$ 0.58 ^D
100	47.15 $\pm$ 0.65 ^{C*}	35.10 $\pm$ 1.06 ^C
150	70.77 $\pm$ 3.22 ^{B*}	52.72 $\pm$ 0.23 ^B
200	93.03 $\pm$ 1.86 ^{A*}	69.37 $\pm$ 0.17 ^A

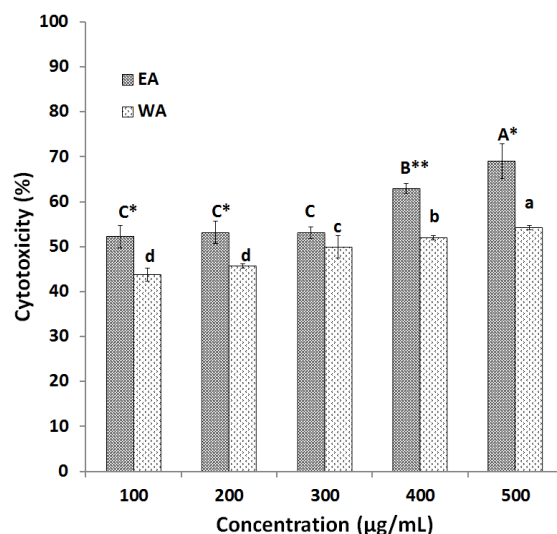
¹⁾ EA: ethanol extract from aronia fruit.

²⁾ WA: water extract from aronia fruit.

³⁾ Means with different capital letters (^{A~D}) in the same sample are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

⁴⁾ Means are significantly different between EA and WA by student's *t*-test (* $p < 0.05$).

는 대표적인 실험이다(Skehan P 등 1988; Seo DH & Han DS 2003). 본 연구에서는 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 시료를 A549에 주입하여 SRB assay를 실시하였고, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. A549에 대한 세포독성은 EA는 52.25~68.99%, WA는 43.82~54.24%로 나타나 농도가 증가함에 따라 암세포 증식 억제가 증가하는 경향을 보였다. A549에 대한 세포독성은 300 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 제외한 나머지 농도에서 EA가 WA에 비해 유의적으로 높게 나타났다. Kim SH 등(2009)의 연구에서 SRB assay를 통하여 70% 에탄올 더덕 추출물을 A549에 처리하여 세포독성을 확인하였을 때 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 12.5%의 세포독성이 나타났다고 보고하였으며, Lee SH 등(2002)은 증류수 및 에탄올 황칠나무 잎 추출물을 600 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 A549에 처리하였을 때 각각 35.7%, 38%의 세포독성을 나타냈다고 보고하였다. 이러한 선행연구 결과를 통하여 본 연구의 아로니아 열매 추출물이 이들 추출물보다 A549에 대하여 높은 세포독성을 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 또한 Park HM & Hong JH(2014)의 연구에서 열수 및 에탄올 아로니아 열매 추출물이 HeLa cell(인체 자궁경부암 세포)에 대하여 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 72.59%, 76.86%의 높은 세포독성이 나타났다고 하였는데, 본 실험에서 아로니아 열매의 열수 및 에탄올 추출물이 인체폐암세포인 A549에 대해서도 높은 세포독성을 나타내 폐암세포에도 증식억제 효과가 있는 것으로 확인되었다. 한편, Cho Y & Choi MY(2015)는 HT-29세포에 대하여 rutin을 200 μM 농도로 처리하였을 때 세포 생존율이 64.13%로 낮아져 rutin이 대장암 세포의 증식을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 아로니아 열매 추출물에 다량의 rutin이 함유되어 있는 것으로 분석되어, 이러한

**Fig. 3. Cytotoxicity of ethanol extract and water extract from aronia fruit on A549 cells by SRB assay.**

EA: ethanol extract from aronia fruit. WA: water extract from aronia fruit. Means with different capital letters (A~C) are significantly different among the different concentrations of EA by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). Means with different small letters (a~d) are significantly different among the different concentrations of WA by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). Means are significantly different between EA and WA by student's *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

유용 성분들이 A549에 대한 높은 세포독성에 기여했을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 국내산 아로니아 열매의 에탄올과 열수 추출물을 제조하여 기능성 성분, 항산화 활성 및 A549에 대한 세포독성을 분석하였다. EA와 WA의 총 폴리페놀 함량은 각각 40.26 mg GAE/g, 35.45 mg GAE/g으로 분석되었으며, 총 플라보노이드 함량은 각각 13.90 mg QE/g, 11.49 mg QE/g으로 EA가 WA보다 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 유의적으로 높았다. EA와 WA의 총 비타민 C 함량은 각각 71.79 mg/100 g, 59.75 mg/100 g으로 EA가 WA에 비해 총 비타민 C 함량이 유의적으로 높았다. HPLC를 이용한 페놀성 화합물 분석에서 EA와 WA의 rutin의 함량이 각각 90.59 mg/100 g, 72.54 mg/100 g으로 rutin 함량이 가장 높게 나타났다. EA와 WA의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, EA가 WA에 비해 실험한 모든 농도에서 DPPH 라디칼 소거능이 유의적으로 높게 나타났으며, ABTS 라디칼 소거능 측정에서도

낮은 농도에서 EA가 WA에 비해 ABTS 라디칼 소거능이 유의적으로 높게 나타났다. 또한 FRAP assay에서도 FRAP value가 WA보다 EA에서 유의적으로 높아 EA가 WA에 비해 항산화 활성이 우수한 것을 확인할 수 있었다. A549에 대한 세포독성을 확인하기 위해 SRB assay 실시한 결과, 500 µg/mL에서 EA와 WA의 A549에 대한 세포독성은 각각 68.99%, 54.24%로 나타났으며, 대부분의 농도에서 EA가 WA에 비해 세포독성이 유의적으로 높게 나타났다. 이들 결과를 볼 때 아로니아 열매 추출물은 항산화 활성 및 A549에 대한 세포독성이 우수한 것으로 나타났으며, EA가 WA에 비해 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 비타민 C 함량도 높은 것으로 분석되어 향후 기능성 식품 소재로서 활용될 가치가 있다고 판단된다.

REFERENCES

- Badescu M, Badulescu O, Badescu L, Ciocoiu M (2014) Effects of *Sambucus nigra* and *Aronia melanocarpa* extracts on immune system disorders within diabetes mellitus. *Pharm Biol* 53(4): 533-539.
- Benzie F, Strain J (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* 239(1): 70-76.
- Bermudez-Soto MJ, Tomas-Barberan FA (2004) Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices. *Eur Food Res Technol* 219(2): 113-141.
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by use of a stable free radical. *Nature* 181(4617): 1199-1200.
- Bohr VA (2002) Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 32(9): 804-812.
- Bsoul SA, Terezhalmay GT (2004) Vitamin C in health and disease. *J Contemp Dent Pract* 5(2): 1-13.
- Catana L, Catana M, Iorga E, Asanica AC, Lazar AG, Lazar MA, Belc N (2017) Vitamin C and total polyphenol content and antioxidant capacity of fresh and processed fruits of *Aronia melanocarpa*. *Scientific Papers Series B Horticulture LXI*: 433-440.
- Cha JY, Kim HJ, Chung CJ, Cho YJ (1999) Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28(6): 1310-1315.
- Cho Y, Choi MY (2015) Inhibitory effects of flavonoids on growth of HT-29 human colon cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44(3): 338-346.
- Croft KD (1998) The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* 854(1): 435-442.
- Doll R, Peto R (1981) The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66(6): 1192-1308.
- Gasiorowski K, Brokos B, Tabaka H (2000) Evaluation of the immunomodulatory activity of four compounds exerting antimutagenic effects on human lymphocytes *in vitro*. *Cell Mol Biol Lett* 5(4): 469-481.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicity oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219(1): 1-14.
- Hertog MGL, Fesken EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. *Lancet* 342(8878): 1007-1011.
- Hong JH (2018) Studies on the anthocyanins composition and enantiomeric excess of chiral volatile flavor compounds of berry species. Ph D Dissertation Chosun University, Gwangju. pp 26-29.
- Jeon HJ, Cha YH, Jang HR (2016) Isolation and rutin quantitative analysis of antioxidant substances from *Gynura procumbens* extract. *J Korean Soc Wellness* 11(4): 465-472.
- Jin DH, Shin JM, Seong JH, Lee YG, Kim DS, Chung HS, Jang SH, Kim HS (2016) Comparison of the antioxidant activities and nitrite scavenging activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extracts. *J Environ Sci Int* 25(4): 567-577.
- Ju SY, Kim JY, Noh SK (2019) Effects of aronia extract on the lymphatic absorption of cholesterol and fat in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 48(1): 1-7.
- Kang AR, Jung KI, Kim MH (2018) Effects of *Aronia melanocarpa* extracts on menopause symptoms in ovariectomized rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 47(12): 1217-1224.
- Kim JS, Moon YS, Kwak EJ (2018) Comparison of phenolic composition, content, and antioxidant activity in raspberries and blackberries. *Korean J Hort Sci* 36(1): 115-127.
- Kim SH, Choi HJ, Chung MJ, Cui CB, Ham SS (2009) Antimutagenic and antitumor effects of *Codonopsis lan-*

- ceolata* extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 38(10): 1295-1301.
- Lala G, Malik M, Zhao C, He J, Kwon Y, Giusti MM, Magnuson BA (2006) Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. Nutr Cancer 54(1): 84-93.
- Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH, Lee HJ (2002) Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifer* Lev. Korean J Med Crop Sci 10(2): 109-115.
- Lee SO, Kim MJ, Kim DG, Choi HJ (2005) Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Innotus obliquus*. J Korean Soc Food Sci Nutr 34(2): 139-147.
- Lim HJ, Lee HJ, Leem MH (2015) Antioxidant activity of acai berry, blueberry, corni, and mulberry. Korean J Aesthet Cosmet Soc 13(3): 445-452.
- Lim SJ, Kim SH (2001) The effect of each fraction of methanol extract of *Alisma canaliculatum* on blood glucose levels and lipid metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. Korean J Nutr 34(6): 619-625.
- Ministry of Food and Drug Safety (2020) Korean Food Standards Codex. <https://www.foodsafetykorea.go.kr> (accessed on 28. 12. 2020)
- Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J Ethnopharmacol 71(1-2): 109-114.
- Nam JS, Han YJ, Yeo SM (2015) Antioxidant and antimicrobial activities of various berry juices. Korean J Food Nutr 28(2): 328-334.
- Njoku PC, Ayuk AA, Okoye CV (2011) Temperature effects on vitamin C content in citrus fruits. Pak J Nutr 10(12): 1168-1169.
- Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, Koyoma Y, Jin X, Yoshida K, Kase S, Kitaichi N, Suzuki Y, Tanaka T, Ohno S (2005) Anti-inflammatory effect of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 46(1): 275-281.
- Oszmianski J, Wojdylo A (2005) *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. Eur Food Res Technol 221(6): 809-813.
- Park HM, Hong JH (2014) Physiological activities of *Aronia melanocarpa* extracts on extraction solvents. Korean J Food Preserv 21(5): 718-726.
- Park YK, Choi SH, Kim SH, Jang YS, Han JG, Chung HG (2008) Functional composition and antioxidant activity from the fruits of *Rubus coreanus* according to cultivars. J Korean Wood Sci Technol 36(1): 102-109.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical Bio Med 26(9-10): 1231-1237.
- Ryu IH, Kwon TO (2012) Sensory characteristics of granular tea and the components of mulberry fruit extracts by different extraction process. Korean J Med crop Sci 20(5): 331-338.
- Seo DH, Han DS (2003) Anticancer effects of hexane soluble extract of *Houttuynia cordata* against cancer cell lines. J Wonkwang Dent Res Inst 12(1): 263-285.
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 16(3): 144-158.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Visteca D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1988) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J Natl Cancer Inst 82(13): 1107-1112.
- Williams GM, Wang CX, Iatropoulos MJ (1990) Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. II. Chronic feeding studies. Food Chem Toxicol 28(12): 799-806.
- Wiseman H (1996) Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease. J Nutr Biochem 7(1): 2-15.
- Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S (2004) Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of ribes, aronia, and sambucus and their antioxidant capacity. J Agric Food Chem 52(26): 7846-7856.
- Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB (2010) Biological activities of polyphenols from grapes. Int J Mol Sci 11: 622-646.

Date Received	May 17, 2021
Date Revised	Jun. 17, 2021
Date Accepted	Jun. 21, 2021