

Antioxidant activities of blueberry hot water extracts with different extraction condition

Gyeong-A Ko¹, Moa Son², Hye Rim Kang³, Ji Hee Lim⁴, Geun Hyung Im⁴,
Somi Kim Cho^{1,2,3,5*}

¹Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, SARI, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²School of Biomaterials Science and Technology, College of Applied Life Sciences,
SARI, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

³Faculty of Advanced Convergence Technology and Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

⁴JeKiss Co., Ltd. Research Institute, Jeju 695-916, Korea

⁵Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

추출조건에 따른 블루베리 열수추출물의 항산화 활성 비교

고경아¹ · 손모아² · 강혜림³ · 임지희⁴ · 임근형⁴ · 김소미^{1,2,3,5*}

¹제주대학교 생명공학부, ²제주대학교 바이오소재공학과, ³제주대학교 차세대융복합과학기술협동과정,
⁴(주)제키스, ⁵제주대학교 원예산업연구소,

Abstract

Five extraction conditions (AE, autoclave extraction; OE, oven extraction; HWSE, hot water and sonication extraction; HWASE, hot water acidified with 0.5% (v/v) acetic acid and sonication extraction; and BE, boiling extraction) were examined to compare the effects of different hot water extraction methods on the antioxidant properties of blueberries. The extraction yields of the AE, OE, HWSE, HWASE, and BE were 7.94%, 8.35%, 8.55%, 9.15%, and 8.50%, respectively. The polyphenol and flavonoid contents of AE were 3.47 mg GAE/g and 1.59 mg RE/g, respectively, which were highest contents among others. Those of OE were ranked second to the highest. The total anthocyanin content of HWSE (5.29 mg/g) was significantly higher than that of others whereas that of AE showed the lowest content (0.96 mg/g). The order of ABTS radical and alkyl radical scavenging activities was as follows: AE > BE > OE > HWSE > HWASE. The antioxidant properties were considerably correspondent with the total polyphenol and flavonoid content. DPPH radical scavenging activity was quite high in HWSE, AE, and BE extraction, however, there were no significant differences among the five extraction methods in the aspect of Fe²⁺ ion chelating activities. Moreover, AE showed the highest SOD activity, and protected the dermal fibroblast the best against H₂O₂-induced cytotoxicity. In conclusion, it was suggested that the autoclave extraction (AE) would be the most effective method for preparing blueberry hot water extracts with relatively high antioxidant activities.

Key words : blueberry, antioxidant activity, hot water extraction

서 론

최근 들어 삶의 질이 향상됨에 따라 건강에 대한 관심이 커 가면서 자연식품에 대한 관심도 높아지고 있다. 이러한 관심과 웰빙(well-being) 트렌드가 맞물리면서 식품 안전성에 대한 관심도 함께 높아져 인체에 부작용이 없는 천연소재를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다(1). 대표적 자연식품인 과실에는 강력한 항산화제인 비타민과 플라보노이드와 같은 페놀성 화합물이 풍부하게 존재하며, 이 성분들은 활성산소를 제거하는 역할을 수행한다(2). 활성산소에

*Corresponding author. E-mail : phd.kim.somi@gmail.com
Phone : 82-64-754-3348, Fax : 82-64-756-3351
Received 16 February 2015; Revised 7 May 2015; Accepted 26 May 2015.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, nitric oxide, hydrogen peroxide 등이 존재하며, 이러한 활성산소는 정상적인 대사과정 중 미토콘드리아와 같은 세포 내 소기관에서 자연적으로 생성된다. 생체 내에는 이들에 대한 방어기작이 자체적으로 존재하지만(3), 과도한 스트레스 등과 같은 여러 요인에 의해 산화-항산화 시스템의 균형이 깨지면서 체내에 활성산소가 다량으로 존재하게 되면 조직과 세포에 산화적 스트레스가 가해져 암, 심장병, 당뇨 등의 질병이 발생하게 된다. 따라서 이러한 활성산소를 제거하는 항산화 작용은 인체 내의 산화적 스트레스를 감소시켜 질병 예방에 크게 기여한다(4-6).

블루베리는 진달래과(Ericaceae) 산앵두나무속(Vaccinium)에 속하는 관목성 식물로, 전 세계적으로 400 여종이 분포하고 있으며, 래빗아이 블루베리(*Vaccinium ashei*), 하이부시 블루베리(*Vaccinium corymbosum*) 및 로우부시 블루베리(*Vaccinium myrtillus*) 세 종류가 대표적인 상업 과실로 재배되고 있다(7). 페놀성 물질과 플라보노이드계 색소인 안토시아닌(anthocyanin)이 풍부한 블루베리(blueberry)는 뛰어난 항산화 효과로 2002년 미국 타임지에서 세계 10대 슈퍼 푸드 중 하나로 선정되었으며, 항암(8), 항당뇨(9), 항치매(10) 및 신경질환(11)에 효과가 있다는 보고가 있다. 블루베리 추출물의 활성을 높이기 위해 메탄올 또는 아세톤 등과 같은 유기용매를 이용하여 추출물을 제조하고, 이러한 추출물에 대한 생리활성의 물질 함량과 항산화 효능에 대해 많은 연구 결과들이 보고된 바 있다(12-14). 하지만, 이러한 유기용매 추출법을 이용한 식품 제조는 가공과정 중 유기용매를 제거하는 과정이 필요하며 이 과정에서 잔류독성 문제가 발생하는 단점을 가지고 있다(15).

따라서 본 연구에서는 잼(16), 쿠키(17), 머핀(18) 등과 같은 제품 제조 시에 활용도가 높은 열수추출법에 주목하고, (1)가압멸균기를 이용한 추출(autoclave extraction, AE), (2)180°C에 예열된 전기오븐에서 20분간 방치한 추출(oven extraction, OE), (3)끓인 증류수에 15분간 혼합 후 sonication한 추출(hot water sonication extraction, HWSE), (4)끓인 증류수에 0.5% (v/v) acetic acid를 첨가 후 sonication한 추출(hot water with 0.5% (v/v) acetic acid sonication extraction, HWASE), (5)끓인 증류수에 블루베리를 넣고 15분간 끓인 열탕추출(boiling extraction, BE)등의 방법으로 블루베리 추출물을 제조한 후, 각 추출조건에서의 추출수율, 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량, 총 안토시아닌 함량을 측정하였다. 각 추출물에 대해 ABTS 라디칼, alkyl 라디칼-, DPPH 라디칼-소거능, ferrous ion chelating 효능, superoxide dismutase(SOD) 유사활성, human dermal fibroblast 세포에서 H₂O₂에 처리에 의한 산화스트레스 억제 효과를 측정함으로써 항산화 활성을 비교하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 블루베리는 래빗아이종(*Vaccinium ashei*)으로 제주도 조천읍 소재의 블루베리 농가에서 재배한 것을 2.5 kg 구매하여 -70°C에서 냉동 보관하면서 추출시료로 사용하였다. 대조 표본(No.2013/015)은 제주대학교 아열대원예산업연구소 문정용 박사에 의해 확인되었고, 아열대원예산업연구소 식물 표본실에 보관하였다. 또한 모든 시약들은 Sigma Chemical(St. Louis, MO, USA), Ameresco Inc.(Solon, Ohio, USA)와 Invitrogen Gibco(Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

열수추출물의 제조

추출물의 제조는 20 g fresh blueberry에 증류수 400 mL를 가하여 믹서기를 이용해 마쇄한 후 아래와 같이 5가지 조건으로 열수추출을 하였다. 각각의 추출물은 whatman No.2 여과지를 이용하여 여과시킨 후, 여액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 30°C에서 감압 농축하였다. 냉동건조기(PVTFD10R, Ilsin, Korea)를 사용하여 온도 -60~80°C에서 48시간동안 동결 건조하여 분말상태로 만들어 냉동 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 각각의 블루베리 열수추출물은 autoclave(SX700, Tomy, Tokyo, Japan)를 이용하여 0.25 MPa, 121°C에서 20분간 가압가열처리 한 후 추출(autoclave extraction, AE), 180°C에 예열된 전기오븐에서 20분간 방치하여 추출(oven extraction, OE), Gulcin 등(19)의 방법을 변형하여, 끓인 증류수에 15분간 혼합 후 sonication하여 추출(hot water sonication extraction, HWSE), Timothy 등(20)의 방법을 변형하여 끓인 증류수에 0.5%(v/v) acetic acid를 첨가한 후 sonication하여 추출(hot water with 0.5%(v/v) acetic acid sonication extraction, HWASE), 끓인 증류수에 15분간 끓여 열탕추출(boiling extraction, BE) 방법을 이용하여 추출하였다.

추출수율, 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량

추출수율은 각각의 추출물을 동결 건조시켜서 건조중량을 구한 다음 추출물 조제에 사용한 원료 물량에 대한 백분율로 나타내었다. 총 폴리페놀 함량은 Cheung 등(21)의 방법을 약간 변형하여 DW 1,375 µL에 125 µL의 시료를 넣은 후 0.5 mL Folin-Ciocalteu's 시약을 넣고 3분 후에 1 mL의 Na₂CO₃를 가한 다음 실온에서 30분 동안 정치한 후 분광광도계(Sunrise, Tecan, Salzburg, Austria)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 함량은 gallic acid equivalents (mg GAE/g)로 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(22)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 40 µL에 5% NaNO₂ 6µL를 첨가하여 5분간 반응시킨 후 10% AlCl₃ 12 µL를 혼합하여 6분간 반응시킨 다음 1 N NaOH

40 μ L를 첨가한 후 분광광도계(Sunrise, Tecan)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 함량은 rutin equivalents (mg RE/g)로 나타내었다.

총 안토시아닌 함량 측정

총 안토시아닌 함량은 pH differential method(23)에 따라 측정하였다. pH buffer로는 pH 1.0 buffer(0.2 M KCl+0.2 M HCl)와 pH 4.5 buffer(0.2 M potassium phosphate+0.1 M critic acid)를 사용하였다. 1,900 μ L pH 1.0 buffer와 1,900 μ L pH 4.5 buffer에 각각 100 μ L 시료를 혼합한 후 15분간 정치한 후 분광광도계(UV1800, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 520 nm와 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 안토시아닌 함량은 아래와 같이 cyanidin-3-glucoside를 기준으로 계산하였다.

$$\text{Total anthocyanin content(mg/L)} = \frac{A \times Mw \times DF \times 1000}{\epsilon \times l}$$

$$A = (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{\text{pH 4.5}}$$

$$Mw = \text{molecular weight of cyanidin-3-glucoside} = 449.2 \text{ g/mol}$$

$$DF = \text{dilution factor}$$

$$\epsilon = \text{the molar absorptivity} = 26,900 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$l = \text{cm}$$

ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical 소거능 측정은 기존에 보고된 방법(24)을 변형하여 수행하였으며, ABTS 용액은 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, ABTS)와 2.45 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 를 혼합해 16시간 동안 암소에 보관하여 준비하였으며, OD 값이 0.700 ± 0.005 에 도달하게 DW로 희석하였다. 분광광도계(UV1800, Shimadzu)를 이용하여, 큐벳에 900 μ L ABTS 용액과 100 μ L 시료를 혼합하여 실온에서 2분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정했으며, α -tocopherol을 양성대조군으로 사용하였다.

ESR을 이용한 radical 소거능 측정

Alkyl radical 소거능은 Hiramoto 등(25)의 방법에 따라 측정하였다. 20 μ L DW, 40 mM 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH), 40 mM alpha-(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron(4-POBN)과 농도별 시료 20 μ L를 차례로 첨가하여 37°C 항온수조에서 30분간 반응시킨 다음 capillary tube로 옮겨 electron spin resonance(ESR) spectrometer (JES-FA200, JEOL, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 측정조건은 magnetic field 336.000 mT, power 7 mW, sweep time 30초, sweep width 10 mT, frequency 9.43GHz, modulation width 0.2 mT, amplitude 500, time constant 0.03초로 하여 측정하였다.

DPPH radical 소거능은 Nanjo 등(26)의 방법에 따라 측정

하였다. 에탄올에 용해시킨 60 μ M DPPH 30 μ L와 농도별로 준비한 시료 30 μ L를 섞은 후 10초간 교반하여 2분 동안 실온에서 반응시킨 후에 capillary tube로 옮겨 ESR spectrometer(JES-FA200, JEOL, Tokyo, Japan)에서 측정하였다. 측정조건은 magnetic field 336.000 mT, power 5 mW, sweep time 30초, sweep width 10 mT, frequency 9.43 GHz, modulation width 0.8 mT, amplitude 500, time constant 0.03초로 하여 측정하였다. 양성대조군으로는 catechin을 사용하였다.

Ferrous ion chelating assay

Fe^{2+} ion chelating activity의 측정(27)은 250 μ L의 시료에 5 μ L의 2 mM FeCl_2 를 가한 후, 10 μ L의 5 mM ferrozine을 넣어서 10분 동안 실온에서 반응시켰다. 반응물은 분광광도계(Sunrise, Tecan)를 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 양성대조군으로 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)를 사용하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

블루베리 추출물의 SOD 유사활성은 SOD assay kit-WST (Dojindo, Kumamoto, Japan)를 이용하여 분석하였다. 시료 20 μ L에 WST working solution 200 μ L와 Enzyme working solution 20 μ L를 가한 후, 37°C에서 20분간 반응시킨 다음 분광광도계(Sunrise, Tecan)를 이용하여 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 rutin을 사용하였다.

세포 독성 측정

본 실험에 사용된 human dermal fibroblast는 제주대학교 의학전문대학원 조문제 교수로부터 분양 받았다. Fibroblast 세포는 10% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin가 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium를 이용하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. H_2O_2 에 의한 산화스트레스 억제효과는 MTT assay를 이용하여 측정하였다(28). 세포를 96 well plate에 1×10^4 cell/mL로 200 μ L씩 분주하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 16시간 전 배양하였다. 추출물들은 각 농도별로 3시간 전 처리한 후 200 μ M의 H_2O_2 를 첨가하고 4시간동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 MTT 용액(5 mg/mL, Ameresco Inc.)을 4시간 동안 처리한 후 150 μ L DMSO에 녹여 분광광도계(Sunrise, Tecan)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 유의성 검증은 SPSS(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 ANOVA one way를 실시하였다.

결과 및 고찰

추출수율, 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량

추출방법에 따른 블루베리 열수추출물의 추출수율, 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량은 Table 1과 같다. 블루베리 20 g 으로부터 autoclave를 이용한 추출(AE) 시 1.59 g, 오븐을 이용한 추출(OE) 시 1.67 g, 끓인 증류수와 혼합 후 sonication 추출(HWSE) 시 1.71 g, 끓인 증류수에 0.5%(v/v) acetic acid를 첨가한 후 sonication 추출(HWASE) 시 1.83 g, 15분 동안 열탕추출(BE) 시 1.70 g을 회수하였다. 이에 따른 각 추출물 회수율은 HWASE의 경우가 9.15%로 가장 높았으며, OE, HWSE, BE 시에는 각각 8.35, 8.55, 8.50%로 큰 차이가 없었으나, AE에서는 7.95%로 가장 낮은 수율을 보였다. 식물계에 널리 분포하는 2차 대사산물인 폴리페놀 화합물은 phenolic acid, cinnamic acid, flavonoid, anthocyanin, benzoic acid 등이 있으며 항산화 효능을 지닌 주요 성분들로 보고되고 있어(29), 각 추출물의 총 폴리페놀 함량 측정된 결과, AE에서 3.47 mg GAE/g으로 가장 높은 함량을 보여주었다. 그 다음으로는 BE에서 2.69 mg GAE/g으로 두 번째로 높은 함량이 나타났고, HWSE와 OE에서는 각각 2.31 및 2.16 mg GAE/g의 함량이 나타났다. 추출수율이 가장 높았던 HWASE이 1.76 mg RE/g으로 가장 낮은 폴리페놀 함량을 나타냈다. 총 플라보노이드 함량은 총 폴리페놀 함량과 유사한 경향을 나타냈다. AE가 1.59 mg RE/g으로 가장 함량이 높았으며, BE는 1.32 mg RE/g, OE와 HWSE에서는 각각 0.89 및 0.84 mg RE/g으로 함량이 유사했으며, HWASE는 0.63 mg RE/g으로 추출물 중에서 가장 낮은 함량을 나타냈다. 따라서 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 autoclave를 이용한 추출물인 AE에서 가장 높게 나타났다. 이는 상온 물 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량인 각각 5.76 및 2.97 mg/mL(30)보다는 낮지만 Janyawat 등(31)이 보고한 frozen blueberry의 물 추출물의

Table 1. Extraction yield, total polyphenol, and total flavonoid contents of various hot water extracts

Extraction condition ¹⁾	Yield (%)	Total polyphenol (mg GAE ²⁾ /g)	Total flavonoid (mg RE ³⁾ /g)
AE	7.95	3.47±0.16 ^{a4)}	1.59±0.19 ^d
OE	8.35	2.31±0.29 ^{bc}	0.89±0.05 ^b
HWSE	8.55	2.16±0.21 ^{bc}	0.84±0.12 ^b
HWASE	9.15	1.76±0.29 ^c	0.63±0.04 ^b
BE	8.50	2.69±0.06 ^b	1.32±0.14 ^a

¹⁾AE, autoclave extraction; OE, oven extraction; HWSE, hot water & sonication extraction; HWASE, hot water & 0.5% (v/v) acetic acid & sonication; BE, boiling extraction.

²⁾GAE, gallic acid equivalent.

³⁾RE, rutin equivalent.

⁴⁾Values are mean±SD. Means with different letters among the different condition are significantly different ($p<0.01$).

총 폴리페놀(2.95 mg GAE/g) 및 플라보노이드(0.29 mg catechin equivalent(CE)/g) 함량보다는 높은 수치이다.

총 안토시아닌 함량

안토시아닌은 적색의 색소로 블루베리를 포함한 여러 식물에 매우 광범위하게 분포되어 있다(32). Routray와 Orsat(33)에 의해 블루베리의 안토시아닌 함량은 품종이나 분석 방법에 따라 0.20~5.15 mg cyanidin-3-glucoside/g fresh weight 범위에서 다양한 함량을 나타낸다고 보고된 바 있다. 추출방법에 따른 블루베리 열수추출물의 총 안토시아닌 함량은 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 끓인 증류수에 혼합 후 sonication하여 추출(HWSE) 시에 추출물에서 fresh weight 1 g 당 6.45 mg으로 가장 높은 함량을 나타냈다. 그러나 acetic acid 첨가 후 sonication 추출(HWASE) 시에는 비록 가해진 온도와 시간은 HWSE시료와 동일하지만 HWSE보다 낮은 안토시아닌 함량(4.02 mg/g)을 나타냈다. 이는 첨가된 acetic acid가 안토시아닌의 구조변형을 유발한 것에 기인한 것으로 판단된다(34). Oven을 이용한 추출(OE) 시에는 5.29 mg/g, 15분간 끓여준 추출(BE)에서는 4.18 mg/g, autoclave를 이용한 추출(AE)에서는 가장 낮은 0.96 mg/g의 함량을 나타냈다. 따라서 총 안토시아닌 함량은 총 폴리페놀 및 플라보노이드 경향과는 전혀 다르게 나타났는데, 이는 추출 시에 가해진 온도에 반비례하는 결과로, 열에 민감한 안토시아닌의 특성(35) 때문인 것으로 예상된다.

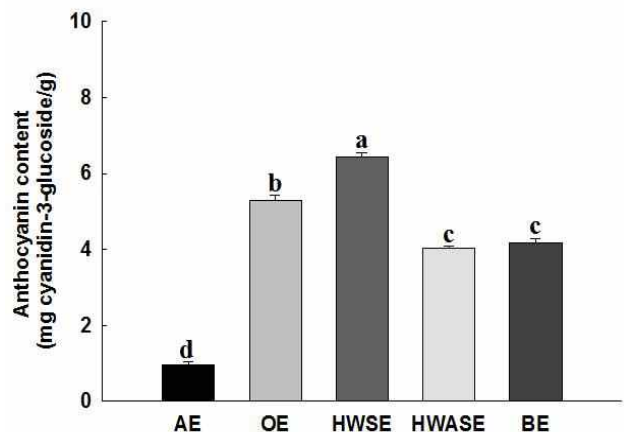


Fig. 1. The total anthocyanin content in hot water extracts.

AE, autoclave extraction; OE, oven extraction; HWSE, hot water & sonication extraction; HWASE, hot water & 0.5% (v/v) acetic acid & sonication; BE, boiling extraction. Values are mean±SD. Means with different letters above a bar are significantly different at $p<0.01$.

ABTS radical 소거능

ABTS assay는 단시간 내에 측정이 가능하고 친수성 및 소수성 물질의 항산화 활성 측정에 모두 적용할 수 있어 항산화 효능을 검증하는데 많이 사용되고 있다. ABTS가 peroxidase, H₂O₂와 반응하여 활성 양이온인 ABTS⁺이 생성

되고, 시료에 의해 ABTS⁺가 소거되면 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는데, 이때 탈색되는 정도를 라디칼 소거능으로 나타내게 된다(24). 열수추출 조건에 따른 ABTS radical 소거능은 Fig. 2에 나타내었다. 추출물의 농도가 증가함에 따라 ABTS radical 소거활성이 증가하는 경향을 보였으며, 모든 농도 범위 안에서 autoclave를 이용한 추출(AE)이 유의적 차이(p<0.05)를 보이며 가장 우수한 활성을 보였고, 15분간 끓인 추출(BE)이 다음으로 높은 활성을 나타냈다. 1,000 µg/mL 농도에서 AE와 BE에서 각각 98.13±2.78%와 87.08±8.75%의 ABTS radical 소거능으로, positive control인 α-tocopherol 68.41±5.97%보다 우수한 활성을 나타냈다. 다음으로 oven을 이용한 추출(OE), 끓인 증류수와 혼합 후 sonication한 추출(HWSE)에서는 74.84±4.03% 및 71.29±4.82%로 유사한 소거능을 보였고, acetic acid가 함유된 추출(HWASE)에서는 59.33±4.89%로 가장 낮은 소거활성을 나타냈다. 이와 같은 결과는 총 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량과 항산화 효능이 매우 깊은 상관관계를 지니고

있음을 나타내고 있다. 동일한 양의 블루베리에서 얻어지는 추출조건별 활성을 비교하기 위해 ABTS radical 소거능을 추출물 수율 대비로 계산하였을 경우에도, AE가 HWASE에 비해 1.90배 더 우수한 활성을 나타냈다(Table 2).

Alkyl radical 소거활성

Alkyl radical은 hydrocarbon reaction에서 초기반응생성물로 electron spin resonance(ESR)에 의해 쉽게 탐지될 수 있다. Alkyl radical은 자가산화과정에 관련되어 있는 radical이기 때문에 alkyl radical 소거능 또한 중요한 항산화 활성이라 할 수 있다(36). 열수추출조건에 따른 alkyl radical 소거능은 Fig. 3에 나타내었다. 500 µg/mL의 농도에서 autoclave 이용추출(AE)과 15분간 끓인 추출(BE)이 유의적 차이(p<0.05) 없이 각각 68.11±2.88% 및 67.34±7.46%의 우수한 alkyl radical 소거능을 나타냈으나, 250 µg/mL의 농도에서 AE가 BE보다 높은 활성을 나타냈다. 따라서 AE가 모든 농도 범위 안에서 가장 우수한 alkyl radical 소거능을 나타냈고 이는 ABTS radical 소거능과 일치하는 결과이다. 또한 500 µg/mL의 농도에서, oven을 이용한 추출(OE)과 끓인 증류수에 혼합 후 sonication한 추출(HWSE)이 각각 57.26±0.91% 및 57.00±3.93%로 유사한 활성을 나타냈으며, 끓인 증류수에 acetic acid를 첨가한 후 sonication 추출(HWASE) 시에는 33.75±1.92%로 가장 약한 라디칼 소거능을 나타냈다. 이러한 결과는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 ABTS radical 소거능 실험 경향과 일치한다. 또한 Alkyl radical 소거능을 수율 대비로 계산하였을 경우, AE가 HWASE에 비해 약 2.32배 더 우수한 항산화 활성을 나타냈다(Table 2).

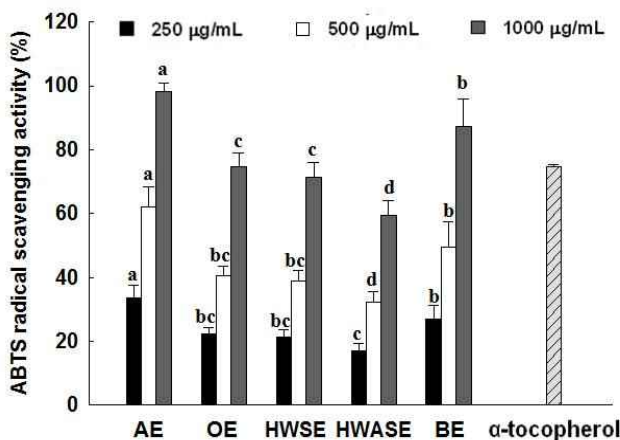


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of hot water extracts.

AE, autoclave extraction; OE, oven extraction; HWSE, hot water & sonication extraction; HWASE, hot water & 0.5% (v/v) acetic acid & sonication extraction; BE, boiling extraction. α-tocopherol (200 µM) was used as positive control. Values are mean±SD. Means with different letters among the same concentration are significantly different at p<0.05.

Table 2. Relative ratio of antioxidant activity to the yield of hot water extract

Extraction condition ¹⁾	ABTS assay	Alkyl assay	DPPH assay	SOD assay	MTT assay
AE	1.90	2.32	1.72	1.65	1.84
OE	1.36	1.86	1.39	1.36	1.06
HWSE	1.29	1.81	1.58	1.25	1.06
HWASE	1.00 ²⁾	1.00	1.00	1.00	1.00
BE	1.58	2.15	1.37	1.37	1.07

¹⁾AE, autoclave extraction; OE, oven extraction; HWSE, hot water & sonication extraction; HWASE, hot water & 0.5% (v/v) acetic acid & sonication extraction; BE, boiling extraction.

²⁾Relative ratio of antioxidant activity to yield were calculated by normalizing the ratio by that of HWASE.

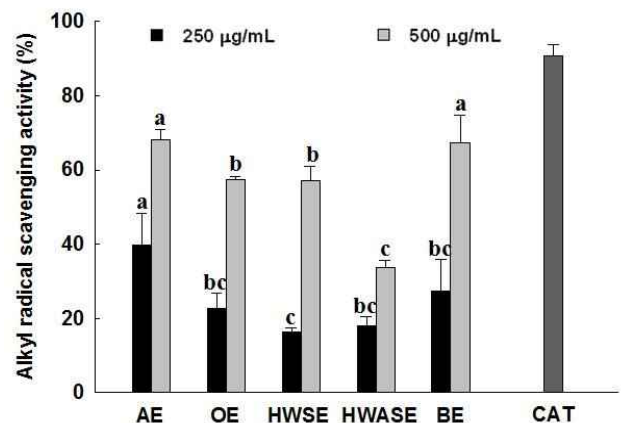


Fig. 3. Alkyl radical scavenging activity of hot water extracts.

AE, autoclave extraction; OE, oven extraction; HWSE, hot water & sonication extraction; HWASE, hot water & 0.5% (v/v) acetic acid & sonication extraction; BE, boiling extraction; CAT, catechin. Catechin (800 µM) was used as positive control. Values are mean±SD. Means with different letters among the same concentration are significantly different at p<0.05.

DPPH radical 소거활성

블루베리 열수추출물의 DPPH radical 소거능은 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 시료의 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거능이 증가하였다. 처리 농도 중 가장 고농도인 1000 µg/mL에서 최저 활성을 나타낸 acetic acid를 함유한 추출(HWASE)을 제외하고는 나머지 시료들 간의 유의적인 차이($p < 0.05$)는 없었다. 그러나 중간 농도인 500 µg/mL에서는 끓인 증류수에 혼합 후 sonication한 추출(HWSE)과 autoclave를 이용한 추출(AE)은 각각 $43.65 \pm 3.59\%$ 및 $40.33 \pm 1.13\%$ 의 소거능으로 다른 추출물에 유의적 차이를 보이며 높은 활성을 나타내어 HWSE, AE, 15분간 끓인 추출(BE), oven 이용 추출(OE), HWASE 순으로 DPPH radical 소거활성이 나타났다. 이는 HWSE가 DPPH radical 소거활성이 있는 안토시아닌(37)을 가장 많이 함유하고 있기 때문이라고 판단된다. DPPH radical 소거능을 수율 대비로 계산한 결과, HWASE 대비해서 HWSE가 1.58배 높게 나타났으며, AE는 이보다 더 높은 1.72배로 나타났다(Table 2).

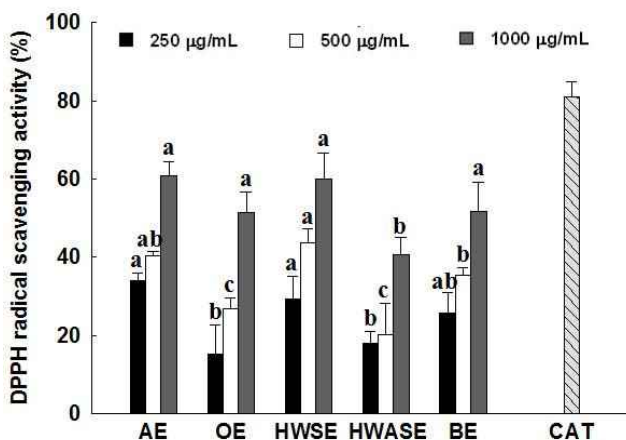


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of hot water extracts.

AE, autoclave extraction; OE, oven extraction; HWSE, hot water & sonication extraction; HWASE, hot water & 0.5% (v/v) acetic acid & sonication extraction; BE, boiling extraction; CAT, catechin. Catechin (25 µM) was used as positive control. Values are mean±SD. Means with different letters among the same concentration are significantly different at $p < 0.05$.

Fe²⁺ ion chelating assay

Fe, Cu, Ni 등과 같은 금속은 지질산화과정에서 촉매로 작용한다. 특히 몇몇 식품에 함유되어 있는 hydroxy radical과 superoxide radical 등의 생성을 촉진하는 Fe²⁺, Cu²⁺ 등에 대한 결합능이 우수할수록 높은 항산화 활성을 나타낸다(38). 열수추출조건에 따른 Fe²⁺ ion chelating 효과는, 앞에서 언급한 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 다른 항산화 실험과는 달리 모든 시료에서 유의적 차이($p < 0.05$) 없이 우수한 Fe²⁺ ion chelating 효과를 확인하였다(Fig. 5). 특히, 100 µg/mL의 농도에서 positive control인 EDTA 81.05±12.88%의 소거능과 상응하거나 그보다 높은 활성을 나타내었다. 이는 금속 이온 chelating 효과와 radical 소거능

이 서로 다른 기작으로 작용하기 때문인(39) 것으로 판단된다.

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

항산화 효소 중의 하나인 superoxide dismutase(SOD)는 체내에 존재하는 superoxide를 제거하는 효소로서 세포막, DNA, 단백질 등에 손상에 대한 방어 작용을 한다(40,41). SOD 유사활성물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하여 superoxide로부터 생체를 보호한다고 알려져 있기 때문에(42), 블루베리 추출물들에 대해서도 SOD 유사활성을 측정하였다(Fig. 6). 모든 농도에서 autoclave를 이용한 추출(AE)이 유의적 차이($p < 0.01$)를 보이며 가장 우수한 활성을 나타냈으며, 이어서 BE, OE, HWSE 및 HWASE 순으로 각각 71.46 ± 3.24 , 69.67 ± 4.11 , 65.28 ± 5.56 , $56.08 \pm 4.36\%$ 의 SOD활성을 나타냈다. 이는 총 폴리페놀 및 플라보노이드

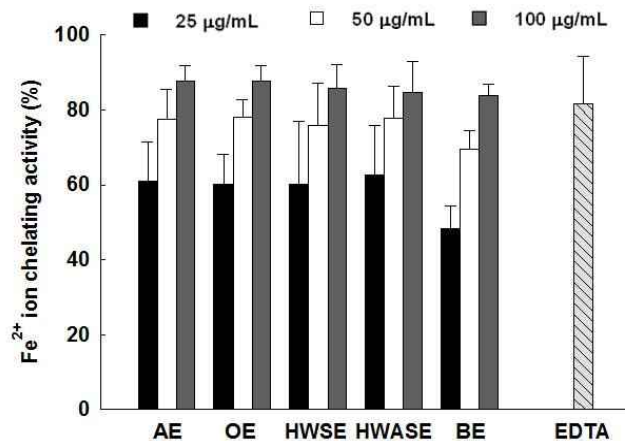


Fig. 5. Fe²⁺ ion chelating activity of hot water extracts.

AE, autoclave extraction; OE, oven extraction; HWSE, hot water & sonication extraction; HWASE, hot water & 0.5% (v/v) acetic acid & sonication extraction; BE, boiling extraction. EDTA was used as positive control. Values are mean±SD. No significant difference.

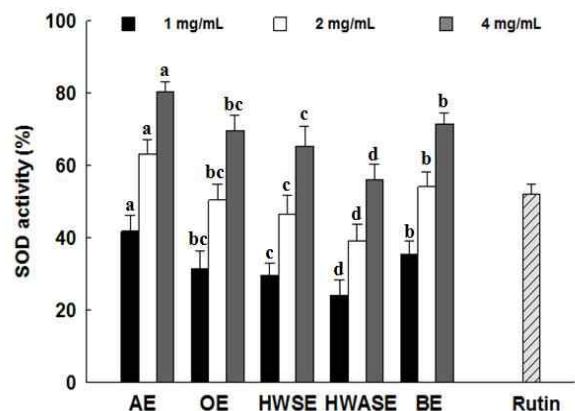


Fig. 6. SOD activity of hot water extracts.

AE, autoclave extraction; OE, oven extraction; HWSE, hot water & sonication extraction; HWASE, hot water & 0.5% (v/v) acetic acid & sonication extraction; BE, boiling extraction. Rutin (300 µM) was used as positive control. Values are mean±SD. Means with different letters among the same concentration are significantly different at $p < 0.01$.

드 함량과 ABTS, alkyl radical 소거능 실험 경향과 일치하는 결과였으며, AE가 체내에서 활성산소 제거 효과에 가장 효율적일 것으로 여겨진다. 수율대비 활성을 비교하였을 때, SOD assay에서도 AE의 SOD 유사활성이 HWASE에 비해 1.65배 높은 것으로 나타났다(Table 2).

세포 독성 측정

H₂O₂로 유도된 산화스트레스에 대해 블루베리 추출물이 human fibroblast 세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay로 측정하고 그 결과를 Fig. 7에 나타냈다. H₂O₂로 유도된 산화스트레스를 가하기 전에 블루베리 열수추출물 자체에 의한 세포독성을 테스트해 본 결과, 처리 농도 250 µg/mL까지는 모든 추출물에서 세포독성이 나타나지 않았으며,

500 µg/mL 처리 시에 HWASE와 BE에서 세포생존율이 각각 77.62±9.93%, 78.24±7.97%로 감소하였다. Fibroblast 세포에 200 µM H₂O₂를 4시간 처리하여 산화스트레스를 유발하였을 때, 비처리군보다 세포생존율이 47.41±2.77%로 감소하였다. 하지만 세포에 H₂O₂를 처리하기 전에 블루베리 추출물을 전 처리함으로써 세포생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Autoclave를 이용한 추출(AE)이 유의적 차이(p<0.01)를 보이며 60.26±3.17%로 가장 높은 생존율을 나타냈고, OE, HWSE, HWASE, BE는 각각 55.18±3.59%, 55.43±4.09%, 55.46±1.97%, 55.43±2.04%로 유사한 활성을 나타냈다. 산화스트레스에 대한 세포보호효과는 추출물 간에 큰 차이를 보이지 않았지만, 세포보호효과를 수율 대비로 계산하였을 때 HWASE이 비해 AE가 1.84배 더 높은 것으로 나타났다(Table 2). 이전 연구에서 블루베리의 phenolic 화합물이 산화 스트레스에 의한 세포보호효과를 유발하는 것으로 보고된 바 있다(43), 따라서 autoclave를 이용한 블루베리 추출물에 존재하는 폴리페놀 성분에 의해 H₂O₂ 산화 스트레스에 대한 fibroblast 세포보호효과가 나타났을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 추출방법을 달리하여 블루베리 열수추출물들간의 항산화 활성 차이를 비교하였다. Autoclave를 이용한 가압가열추출(AE), 오븐을 이용한 추출(OE), 끓인 증류수에 혼합 후 sonication한 추출(HWSE), 끓인 증류수에 산을 첨가한 후 sonication한 추출(HWASE) 및 15분간 끓여 추출(BE) 등의 방법으로 추출물을 제조하고, 총 폴리페놀, 플라보노이드 및 안토시아닌 함량을 확인하고 ABTS, alkyl 및 DPPH radical 소거능 실험과 Fe²⁺ ion chelating 활성을 확인하였다. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 모두 AE에서 각각 3.47±0.16 mg GAE/g 및 1.59±0.19 mg RE/g로 가장 높은 값을 나타냈다. 한편 이와는 반대로 총 안토시아닌 함량은 AE가 가장 낮은 함량을 나타냈으며, HWSE(5.29 mg/g)에서 가장 높은 함량을 나타냈다. ABTS와 alkyl radical 소거능 측정 결과, AE가 가장 우수한 소거능을 나타냈으며, DPPH radical 소거능 실험에서는 AE와 더불어 안토시아닌 함량이 가장 높은 HWSE이 우수한 활성을 나타냈다. Fe²⁺ ion chelating 활성 측정 실험에서는 모든 추출물이 유의적 차이 없이 높은 활성을 나타냈다. 또한 SOD activity 측정 실험에서 AE가 가장 우수한 활성을 나타냈으며, H₂O₂에 의해 유도된 세포독성 또한 AE가 가장 효과적으로 억제시켰다. 이상의 결과를 토대로 추출 조건에 따른 항산화 활성 차이를 수율 대비로 비교하였을 때, 가장 낮은 활성을 나타냈던 HWASE에 대비하여 AE는 ABTS radical scavenging activity 1.90배, alkyl radical scavenging activity

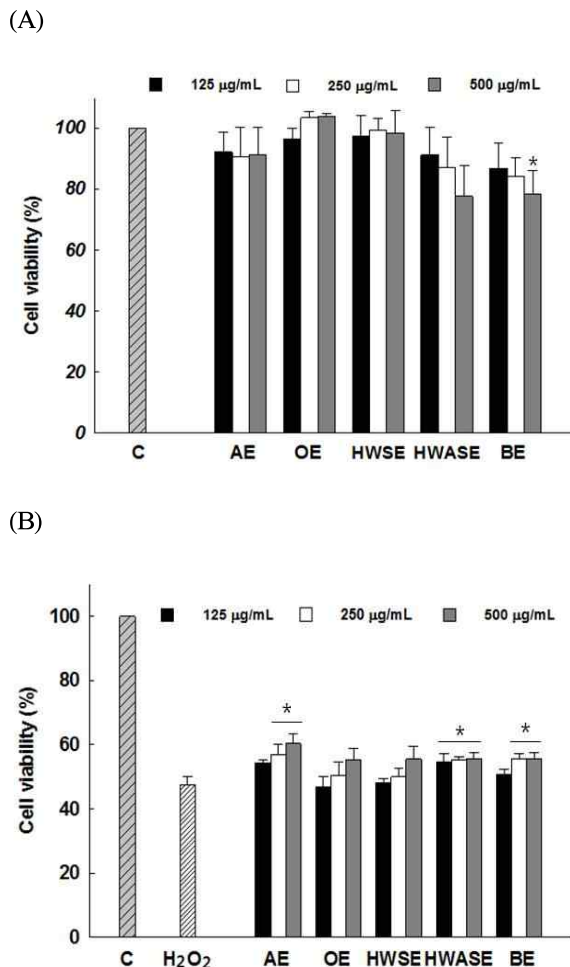


Fig. 7. Protective effects of hot water extracts on H₂O₂-induced cytotoxicity.

(A) Dermal fibroblast cells were treated for 3 h with indicated samples. Values are mean±SD. *Means indicated significant difference in comparing control at p<0.01. (B) Dermal fibroblast cells were pre-treated for 3 h with indicated samples and then incubated with 200 µM of H₂O₂ for 4 h. Values are mean±SD. *Means indicated significant difference in comparing H₂O₂ at p<0.01. C, control; AE, autoclave extraction; OE, oven extraction; HWSE, hot water & sonication extraction; HWASE, hot water & 0.5% (v/v) acetic acid & sonication extraction; BE, boiling extraction.

2.32배, DPPH radical scavenging activity 1.72배, SOD assay 1.65배, H₂O₂에 의해 유도된 세포독성에 대한 보호효능 1.84배의 우수한 항산화 활성을 나타냈다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업육성사업으로 수행된 연구결과입니다.

References

- Lee YJ, Yoon BR, Kim DB, Kim MD, Lee DW, Kim JK, Lee OH (2012) Antioxidant activity of fermented wild grass extracts. *Korean J Food Nutr*, 25, 407-412
- Ames BM, Shigena MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 90, 7915-7922
- Dalton, DA, Langeberg L, Treneman NC (1993) Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiol Plant*, 87, 365-370
- Ho CT (1992) Phenolic compounds in food. In : Phenolic compounds in food and their effects on health II. Huan MT, Ho CT, Lee CY (Editors). Maple Press, New York, p 2-7
- Azuma K, Kakayama M, Koshika M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, Yamauchi Y, Ito H, Higashio H (1999) Phenolic antioxidant from the leaves of *Corchorus olitorium*L. *J Agric Food Chem*, 47, 3963-3966
- Ham SS, Hong JK, Lee JH (1997) Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs. *J Food Sci Nutr*, 2, 155-161
- Westwood MN (1993) Temperate-zone pomology. Timber Press, Portland, OR, USA, p 100-101
- Parry J, Su L, Moore J, Cheng Z, Luther M, Rao JN, WangJY, Yu LL (2006) Chemical compositions, antioxidant capacities and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. *J Agric Food Chem*, 54, 3773-3778
- Martineau LC, Couture A, Spoor D, Benhadou-Andalousi A, Harris C, Meddah B, Leduc C, Burt A, Vuong T, Le PM, Prentki M, Bennett SA, Arnason JT, Haddad PS (2006) Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Phytomedicine*, 13, 612-623
- Magdalini AP, Andriana D, Zacharoula IL, Paul C, Dorothy K, Marigoula M, Fotini NL (2009) Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behavioural Brain Research*, 198, 352-358
- Ramassamy C (2006) Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases : a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol*, 545, 51-64
- Chung HJ (2014) Comparison of total polyphenols, total flavonoids, and biological activities of black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 43, 1349-1356
- Jeong CH, Choi SG, Heo HJ (2008) Analysis of nutritional compositions and antioxidative activities of Korean commercial blueberry and raspberry. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 37, 1375-1381
- De Souza, VR, Pereira PAP, Da Silva TLT, De Oliveira Lima LC, Pio R, Queiroz F (2014) Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chem*, 156, 362-368
- Eloff JN (1998) Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *J Ethnopharmacol*, 60, 1-8
- Cho WJ, Song BS, Lee JY, Kim JK, Kim JH, Yoon YH, Choi JI, Kim GS, Lee JW (2010) Composition analysis of various blueberries produced in Korea and manufacture of blueberry jam by response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 39, 319-323
- Ji JR, Yoo SS (2010) Quality characteristics of cookies with varied concentrations of blueberry powder. *J East Asian Soc Dietary Life*, 20, 433-438
- Hwang S, Ko SH (2010) Quality characteristics of muffins containing domestic blueberry (*V. corymbosum*). *J East Asian Soc Dietary Life*, 20, 727-734
- Gulcin I, Sat IG, Beydemir S, Kufrevioglu OI (2004) Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of broccoli extracts (*Brassica oleracea* L.). *Ital J Food Sci*, 16, 17-30
- Buran TJ, Sandhu AK, Li Z, Rock CR, Yang WW, Gu L (2014) Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins. *J Food*

- Eng, 128, 167-173
21. Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC (2003) Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem*, 81, 249-255
 22. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64, 555-569
 23. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE (2005) Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method, collaborative study. *J AOAC Int*, 88, 1269-1278
 24. 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 Radic Biol Med*, 26, 1231-1237
 25. Hiramoto K, Johkoh H, Sako K, Kikugawa K (1993) DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). *Free Radial Res Commun*, 19, 323-332
 26. Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y (1996) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biol Med*, 21, 895-902
 27. Yen GC, Duh PD, Tsai HL (2002) Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem*, 79, 307-313
 28. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, 119, 203-210
 29. Naczki M, Shahidi F (2003) Phenolic compounds in plant foods : chemistry and health benefits. *Prev Nutri Food Sci*, 8, 200-218
 30. Park HM, Yang SJ, Kang EJ, Lee DH, Kim DI, Hong JH (2012) Quality characteristics and granule manufacture of mulberry and blueberry fruit extracts. *Korean J Food Cookery Sci*, 28, 375-382
 31. Vuthijumnok J, Molan AL, Heyes JA (2013) Effect of freeze-drying and extraction solvents on the total phenolic contents, total flavonoids and antioxidant activity of different rabbiteye blueberry genotypes grown in New Zealand. *IOSR J Pharmacy Biol Sci*, 8, 42-48
 32. Hong JH, Chung HS, U H, Youn KS (2002) Storage stability of anthocyanin pigment isolated from a wasted grape peels. *Korean J Food Preserv*, 9, 327-331
 33. Routray W, Orsat V (2011) Blueberries and their anthocyanins : factors affecting biosynthesis and properties. *Comprehensive Rev Food Sci Food Safety*, 10, 303-320
 34. Sari P, Setiawan A, Siswoyo TA (2005) Stability and antioxidant activity of acylated jambolan (*Syzygium cumini*) anthocyanins synthesized by lipase-catalyzed transesterification. *Int Food Res J*, 22, 671-676
 35. Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK (2010) Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci Tech*, 21, 3-11
 36. Kim H, Moon JY, Kim HJ, Lee DS, Cho M, Choi HK, Kim YS, Mosaddik A, Kim Cho S (2010) Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. *Food Chem*, 121, 429-436
 37. Hwang JW, Kim EK, Lee SJ, Kim YS, Moon SH, Jeon BT, Sung SH, Kim ET, Park PJ (2012) Antioxidant activity and protective effect of anthocyanin oligomers on H₂O₂-triggered G2/M arrest in retinal cells. *J Agric Food Chem*, 60, 4282-4288
 38. Yoo MY, Kim SK, Yang JY (2004) Characterization of an antioxidant from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 32, 307-311
 39. Graf E, Eaton JW (1990) Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic Biol Med*, 8, 61-69
 40. Kim TY, Jeon TW, Yeo SH, Kim SB, Kim JS, Kwak JS (2010) Antimicrobial, antioxidant and SOD-like activity effect of Jubak extracts. *Korean J Food Nutr*, 23, 299-305.
 41. Kang HW (2012) Antioxidative activity of extracts from *Cichorium endivia* L.. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41, 1487-1492
 42. Kitani K, Minami C, Yamamoto T, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC (2002) Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders : potentials of propargylamines for human use. *Ann N Y Acad Sci*, 959, 295-307
 43. Hurst RD, Wells RW, Hurst SM, McGhie TK, Cooney JM, Jensen DJ (2010) Blueberry fruit polyphenolics suppress oxidative stress-induced skeletal muscle cell damage *in vitro*. *Mol Nutr Food Res*, 54, 353-363