

Physiological activities of *Aronia melanocarpa* extracts on extraction solvents

Hye-Mi Park, Joo-Heon Hong*

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

추출용매에 따른 아로니아 추출물의 생리 활성

박혜미 · 홍주현*

대구가톨릭대학교 식품공학전공

Abstract

The objective of this study was to investigate the physiological activities of *Aronia melanocarpa* extracts on extraction solvents (through hot water extraction, 50% ethanol extraction, and 50% methanol extraction). The yield of 50% ethanol extract, 84.50%, was higher than that of the hot water extract (84.05%) and of the 50% methanol extract (76.20%). The total sugar content of the extraction solvent, 35.56~37.68 g/100 g, did not significantly differ. The total anthocyanin content of the 50% methanol extract, 395.10 mg/100 g, was higher than of 50% ethanol extract (318.61 mg/100 g) and of the hot water extract (252.82 mg/100 g). The anthocyanin composition of the cyanidin-3-galactoside, 364.65 mg/100 g, was higher than that of the cyanidin-3-arabinoside (163.06 mg/100 g) and of the cyanidin-3-glucoside (35.69 mg/100 g) in the 50% methanol extract. The DPPH radical scavenging activities of the 50% ethanol and the 50% methanol extracts at 100-1,000 µg/mL were 7.96-70.01%, and 8.90-69.21%, respectively. The superoxide radical scavenging activities of all the extracts improved with an increase in the treatment concentration. The FRAP of the 50% ethanol extract and the 50% methanol extract at 100-1,000 µg/mL were 57.14-817.87 µM and 67.32-812.78 µM, respectively. The tyrosinase inhibitory activity of the 50% ethanol extract, 23.03-33.82% (100-1,000 µg/mL), was higher than that of the other extracts. The cancer cell growth inhibition activity of the 50% ethanol extract (76.86% at 1,000 µg/mL) on HeLa cell line was significantly higher than of the hot water and of the 50% methanol extracts. These results suggest that the 50% ethanol extract from *Aronia melanocarpa* may be a useful for functional food material in the food industry.

Key words : black chokeberry, *Aronia melanocarpa*, extraction solvents, antioxidant activities, HeLa cell

서 론

아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 장미과에 속하는 베리류로 북부 아메리카 지역에서 자생한다(1). 학명에 따라 black chokeberry(*Aronia melanocarpa*), red chokeberry(*Aronia arbutifolia*) 및 purple chokeberry(*Aronia prunifolia*)로 나누어지나, 일반적으로 아로니아(*Aronia melanocarpa*)에 모두 포함시킨다(2). 폴란드, 덴마크, 네덜란드 등 유럽에서 주로 재배, 생산되는 아로니아는 2007년 국내에 처음 도입되어 충북 옥천, 강원 원주 등지에서 소규모로 재배하

기 시작하여 현재 의령, 단양 등으로 확산되어 농촌 소득 경쟁력 향상에 많은 영향을 끼치고 있다.

아로니아의 주요 유용성분으로는 polymeric proanthocyanidins, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cyanidin-3-O-galactoside, cyanidin-3-O-arabinoside 등으로 다양한 생리적 기능을 가지고 있어 식품 및 기능성소재로 널리 사용되고 있다(3). 대표적으로 아로니아에 풍부하게 함유되어 있는 폴리페놀 성분에 대한 라디칼 소거활성, 항산화 효과에 대한 연구가 활발히 이루어져 있으며(4-6), 인간대장암 세포주, 자궁암 세포주와 같은 암세포주에 대한 종양억제활성에 대한 연구도 이루어지고 있다(7,8). 당뇨 유발 쥐 및 고지혈증 유발 쥐에게 아로니아 주스를 투여하여 혈당 및 지질

*Corresponding author. E-mail : jhhong@cu.ac.kr
Phone : 82-53-850-3218, Fax : 82-53-850-3218

저해 효과(9) 및 심혈관질환 저해 효과(10-12)를 확인하여 건강에 유익하다고 보고되고 있으며, 가벼운 콜레스테롤 혈증을 가진 사람이 아로니아 주스 섭취를 하였을 경우 동맥 혈압에 좋은 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 또한 위 보호효과(13), 면역조절 기능활성(14) 등 각종 만성질환의 예방효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 아로니아에 함유되어 있는 주요 안토시아닌은 cyanidin-3-O-galactoside, cyanidin-3-O-arabinoside 및 cyanidin-3-O-xyloside이며(6), 일반적으로 phenyl group 중의 OH기가 증가하면 청색이 진해지고, methoxyl group이 증가하면 OH기보다 전자 공여 능력이 크기 때문에 bathochromic shift 현상이 더 크게 일어나 빨간색이 진해지는 경향이 있다고 알려져 있다(15). 안토시아닌은 안토시아닌의 배당체로써 가수분해 시키면 aglycone인 안토시아닌과 당으로 분해된다. 안토시아닌과 결합할 수 있는 대부분의 당류는 glucose, galactose, xylose, arabinose, rhamnose 등이며, 결합하여 monoside, bioside, triside 등으로 구성되고 있으며 경우에 따라서 당 고리에 방향족 혹은 비방향족 유기산이 결합되기도 하고 그 결합방법 및 위치에 따라 자연계에 수백종이 존재하고 있다(16,17). 그 중에서도 아로니아는 현존하는 베리류 중 안토시아닌을 얻을 수 있는 가장 유용한 소재로 알려져 있어(18), 안토시아닌의 다양한 기능성을 쉽게 식품소재에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성을 가지는 아로니아를 기능성식품 소재로 활용하고자 추출용매별로 추출하였으며 추출물의 항산화 활성 및 자궁암 세포주에 대한 항암 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 국내 산으로 경상북도 칠곡군 소재의 (주)웰추럴로부터 제공받아 이용하였다. 씨를 제거한 아로니아를 동결건조하여 분쇄기(FM-909W, Hanil Co., Sejong, Korea)로 분쇄하여 -70°C 이하의 압소에 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다.

추출물의 제조

10 g의 아로니아 동결건조 분말에 증류수, 50% 에탄올 및 50% 메탄올을 고형분 대비 20배 첨가하여 증류수 첨가구는 100°C에서, 50% 에탄올 및 50% 메탄올 첨가구는 80°C에서 4시간 동안 환류냉각추출기(CA-1112, Eyela Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 추출하였다. 추출물은 불순물을 제거하기 위하여 여과지(No.1, Whatman International Ltd., Leicestershire, England)를 이용하여 여과시켰다. 여과된 용액은 감압농축기(N-1N, Eyela Co., Tokyo, Japan)를 사용하여

여 감압농축한 뒤, 동결건조(FreeZone 2.5, Labconco Co., Kansas, MO, USA)하여 -70°C 이하의 압소에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

추출수율 및 총 당 함량 측정

추출수율은 각각의 추출물을 동결건조 시켜서 건물 중량을 구한 다음 추출물 제조에 사용한 원료 건물량에 대한 백분율로 나타내었다.

총 당 함량 측정은 phenol-sulfuric acid법(19)에 따라 시료 1 mL에 5% phenol 1 mL를 첨가하고 충분히 혼합하여 반응시킨 후 94% H₂SO₄ 5 mL를 첨가하고 실온에서 20분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co., Uppsala, Sweden)를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 당 함량은 glucose(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

총 안토시아닌 함량 측정

총 안토시아닌 함량 측정은 Lee 등(20)의 방법에 따라 시료 0.1 g에 pH 1.0 buffer(0.2 M KCl+ 0.2 M HCl) 또는 pH 4.5(0.2 M potassium phosphate+0.1 M citric acid) 2 mL를 각각 혼합한 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 520 nm와 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 안토시아닌 함량은 아래와 같이 cyanidin-3-O-glucoside를 기준으로 계산하였다.

Total anthocyanin content(mg/100 g) =

$$\times Mw \times DF \times 1,000$$

$$\times 1$$

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

Mw = molecular weight of cyanidin-3-glucoside = 449.2 g/mol

DF = dilution factor

ϵ = the molar absorptivity = 26,900 L/cm·mol

안토시아닌 조성

아로니아 추출물 동결건조 분말의 안토시아닌 조성은 HPLC(Waters 2695, Waters Co., Miliford, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. Column은 XBridge™ C18 Column(5 μ m, 4.6 \times 150 mm)(Waters Co., Miliford, MA, USA)을 사용하였고 column 온도는 30°C였으며, 검출기는 photodiode array detector(Waters 2996, Waters Co.)로 535 nm에서 검출하였다. 이동상 용매로는 Water:HCOOH (90:10, v/v)와 Acetonitrile:Methanol:Water:HCOOH(22.5:22.5: 40:10, v/v)를 사용하여 유속은 1.0 mL/min, 시료주입량은 10 μ L였다. 안토시아닌의 표준물질은 cyanidin-3-O-galactoside, cyanidin-3-O-glucoside 및 cyanidin-3-O-arabinoside 3종을 Sigma-Aldrich Co.로부터 구입하였고 HPLC chromatogram에서 retention time의 비교로 동정하였으며, peak area의 실측치와 표준물질의

농도간 계산에 의해 안토시아닌 조성을 산출하였다.

총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 페놀 함량 측정은 Folin-Denis법(21)에 따라 시료 1 mL에 1 N Folin Ciocalteu reagent 1 mL를 첨가하고 충분히 혼합하여 반응 시킨 후 20% Na₂CO₃ 1 mL를 첨가하고 실온의 암소에서 30분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 tannic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

총 플라보노이드 함량 측정은 Jia 등(22)의 방법에 따라 시료 1 mL에 5% NaNO₂ 150 µL를 혼합하여 실온에서 6분간 반응 시킨 다음 10% AlCl₃ 300 µL와 혼합하여 다시 실온에서 5분간 반응 시킨 후 1 N NaOH 1 mL와 혼합한 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 rutin(Sigma-Aldrich Co.)을 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

ORAC(oxygen radical absorbance capacity) 측정

ORAC 측정은 Talcott와 Lee(23)가 항산화 활성 측정에 사용한 분석법을 이용하였다. 본 시험에서 아로니아 추출물 동결건조 분말 및 Trolox의 농도별 희석과 실험용 시료의 제조에는 중성 phosphate buffer(61.6:38.9, v/v, 0.75 M K₂HPO₄와 0.75 M NaH₂PO₄)를 사용하였다. 검량 곡선을 작성하기 위하여 항산화 활성 비교 표준액으로 Trolox (Water soluble analogue of vitamin E, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich Co.) 10 µL를 phosphate buffer 50 mL에 용해하여 제조하였고, 측정기기는 multilabel plate readers(VICTOR3, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 485 nm에서 전자가 여기되고 538 nm에서 방출되게 조절하여 본 실험에 적용되었다.

DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical 소거활성 측정(24)은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)의 환원력을 이용하여 측정하였다. 즉, 시료 0.5 mL에 4×10⁻⁴ M DPPH용액(99.9% ethyl alcohol에 용해) 5 mL를 혼합하여 실온에서 15분간 반응 시킨 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

DPPH radical scavenging activity(%)=

$$1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \times 100$$

Superoxide radical 소거활성 측정

Superoxide radical 소거활성 측정은 Nishikimi(25)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료 500 µL에 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.5) 100 µL, 100 µM phenazine methosulfate(PMS) 200 µL를 혼합하여 반응 시킨 후 500 µM nitro blue tetrazolium(NBT) 200 µL 및 500 µM β-nicotinamide adenine dinucleotide(NADH) 400 µL를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide radical 소거활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

Superoxide radical scavenging activity(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

FRAP(ferric reducing antioxidant power) 측정

FRAP 측정은 Benzie와 Strain(26)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. FRAP 용액은 25 mL acetate buffer(300 mM, pH 3.6)를 37°C에서 가온한 후, 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma-Aldrich Co.) 2.5 mL와 20 mM ferric chloride(FeCl₃) 2.5 mL를 첨가하여 제조하였다. 시료 30 µL에 제조된 FRAP 용액 900 µL와 증류수 90 µL를 넣은 후 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP는 FeSO₄·7H₂O(Sigma-Aldrich Co.)을 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성은 Kameyama 등(27)의 방법을 응용하여 96 well plate에 시료 100 µL, 0.175 M phosphate buffer(pH 6.8) 40 µL, 5 mM L-DOPA 40 µL를 순서대로 넣고 mushroom tyrosinase(2,000 U/mL, Sigma-Aldrich Co.) 20 µL를 첨가하여 37°C 배양기에서 10분간 반응시킨 다음 생성된 DOPA chrome을 microplate reader(UVM-340, ASYS Co., Eugendorf, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

Tyrosinase inhibition activity(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

자궁경부암세포 생육 저해활성 측정

인간 자궁경부암 세포주인 HeLa는 한국세포주은행으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. RPMI 1640배지에 10%

fetal bovine serum, 2% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator(MCO-18AIC, SANYO Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan)에서 배양하였다. 배양된 세포주를 2×10⁴ cell/well로 96 well plate에 첨가하여 24시간 배양하고 시료를 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 PBS 완충용액에 녹인 MTT 용액(5 mg/mL)을 각 well에 10 µL씩 첨가하고 다시 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원 되도록 하였다. 배양종료 후 생성된 formazan결정이 흐트러지지 않게 배양액을 완전히 제거한 후 각각의 well에 100 µL씩 DMSO를 첨가하고 실온에서 10분간 반응시켜 formazan결정을 완전히 용해한 다음 microplate reader (UVM-340, ASYS Co.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하여 상대적인 세포생존율로 나타내었다.

통계처리

실험결과는 3회 반복실험의 평균±표준편차로 나타내었고 SPSS(19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였고 각 측정 평균값의 유의성(p<0.05)은 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

추출수율, 총 당 및 총 안토시아닌 함량

추출용매에 따른 아로니아의 추출수율, 총 당 및 총 안토시아닌 함량은 Table 1과 같다. 추출수율은 50% 에탄올 추출물에서 84.50%로 가장 높은 수율을 나타내었으며, 열수추출물 및 50% 메탄올 추출물에서 각각 84.05%와 76.20%순이었으며, 열수추출물에서 높은 수율을 나타낸 것으로 보아 수용성 성분이 많을 것으로 판단된다. Wangenstein 등(28)은 품종이 다른 4종의 아로니아 80% 에탄올 추출물의 추출 수율이 9.4~19.7%라고 보고하였으며, Kang(29)은 안토시아닌을 함유하고 있는 국내산 베리류인 블루베리, 라즈베리, 오디, 딸기에 대한 80% 에탄올 추출물의 추출 수율이 16.74~23.21%라고 보고하였다. 본

Table 1. Extraction yield, total sugar and total anthocyanin contents of extracts from *Aronia melanocarpa*

Extraction solvents	Yield (dry basis, %)	Total sugar (glucose g/100 g)	Total anthocyanin (C3G ¹⁾ mg/100 g)
hot water	84.05±0.49 ²⁾	35.80±2.37 ^{NS3)}	252.82±11.49 ^c
50% ethanol	84.50±0.29 ^a	37.68±3.07	318.61±5.82 ^b
50% methanol	76.20±0.57 ^b	35.56±1.60	395.10±1.86 ^a

¹⁾C3G, cyanidin-3-O-glucoside

²⁾Means±SD (n=3) within each column (a-c) followed by the same letter are not significantly different (p<0.05)

³⁾NS, not significant

연구에서 사용한 아로니아 추출물은 상대적으로 높은 수율을 나타내었는데, 이는 아로니아의 씨를 제거한 후 동결건조한 분말을 사용하여 추출물을 제조하였기 때문이라고 사료된다.

총 당을 분석한 결과, 35.56~37.68 g/100 g으로 추출용매 별로 유사하였고, 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 총 안토시아닌 함량은 50% 메탄올, 50% 에탄올 및 열수 추출 순으로 유의적인 차이를 나타내었는데, 50% 메탄올 추출물에서 395.10 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 50% 에탄올 및 열수추출물에서 각각 318.61 mg/100 g 및 252.82 mg/100 g이었다. Rugina 등(8)은 품종에 따른 아로니아 열매의 총 안토시아닌 함량이 176.18~366.16 mg/100 g이라고 보고하였으며, 그 중에서도 *Aronia melanocarpa* cultivar Viking은 277.13 mg/100 g, *Aronia melanocarpa* cultivar Aron은 176.18 mg/100 g을 함유하고 있어 본 연구에서 사용된 *Aronia melanocarpa*의 총 안토시아닌 함량이 높음을 확인하였다.

안토시아닌 조성

추출용매별 아로니아 추출물의 안토시아닌 조성은 Table 2와 같다. 50% 메탄올 추출물에서 cyanidin-3-O-galactoside, cyanidin-3-O-arabinoside 및 cyanidin-3-O-glucoside가 각각 364.65 mg/100 g, 163.06 mg/100 g 및 35.69 mg/100 g으로 가장 많이 함유되어 있었으며, 열수, 50% 에탄올 및 50% 메탄올 추출물 모두 cyanidin-3-O-galactoside가 64.72~79.84%로 가장 높은 조성을 보여주었다. Hwang 등(4)은 국내산 아로니아를 70% 에탄올로 10배 첨가하여 추출한 추출물의 안토시아닌 함량을 분석한 결과 cyanidin-3-galactoside가 93.3 mg/g 및 cyanidin-3-arabinoside의 함량은 37.1 mg/g 함유되어 있다고 보고하였다. 본 연구에서 사용한 추출물의 HPLC분석에 따른 안토시아닌 함량은 열수추출물, 50% 에탄올 및 50% 메탄올 추출물에서 각각 170.97 mg/100 g, 341.38 mg/100 g 및 563.4 mg/100 g으로 Table 1의 총 안토시아닌 함량과 유사한 경향을 나타내었다. Wangenstein 등(28)은 품종이 다른 4종의 아로니아 80% 에탄올 추출물의 안토시아닌 조성을 비교한 결과 *Aronia melanocarpa* cultivar Moskva가 252 mg/100 g, *Aronia melanocarpa* cultivar Hugin이 249 mg/100 g이었으며,

Table 2. Anthocyanin compositions of extracts from *Aronia melanocarpa*

Anthocyanin compositions	water		50% ethanol		50% methanol	
	mg/100 g	%	mg/100 g	%	mg/100 g	%
cyanidin-3-O-galactoside	136.51	79.84	241.45	70.73	364.65	64.72
cyanidin-3-O-glucoside	7.58	4.44	14.85	4.35	35.69	6.34
cyanidin-3-O-arabinoside	26.88	15.72	85.08	24.92	163.06	28.94
Total	244.09	84.28	356.3	75.08	500.34	71.06

Aronia melanocarpa cultivar Nero가 447 mg/100 g 및 *Aronia prunifolia*에서 737 mg/100 g으로 나타나 본 연구에서 사용된 아로니아 품종이 상대적으로 높은 안토시아닌 함량을 나타냄을 확인하였다. 안토시아닌 조성은 추출물 모두 cyanidin-3-O-galactoside, cyanidin-3-O-arabinoside 및 cyanidin-3-O-glucoside 순이었다. Bijak 등(30)은 아로니아 50% DMSO 추출물의 안토시아닌 조성 분석에서 cyanidin-3-O-galactoside, cyanidin-3-O-arabinoside, cyanidin-3-O-xyloside 및 cyanidin-3-O-glucoside 순이었으며, g당 함량은 각각 64.04 mg, 23.38 mg, 3.19 mg 및 3.14 mg 함유하고 있다고 보고하였다.

총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 ORAC

추출용매에 따른 아로니아 추출물의 총 페놀, 총 플라보노이드 함량 및 ORAC은 Table 3과 같다. 총 페놀 함량은 열수추출물에서 80.14 mg/g으로 가장 낮은 함량을 나타내었으며, 50% 에탄올 및 50% 메탄올 추출물이 각각 121.38 mg/g 및 122.43 mg/g으로 상대적으로 함량이 높았다. 이는 품종이 다른 4종의 아로니아 80% 에탄올 추출물의 총 페놀 함량이 98~175 mg/g 함유하고 있다는 Wangenstein 등(28)의 보고와 유사함을 알 수 있었다. 선행 연구에 따르면 아로니아에 함유되어 있는 페놀성 물질은 항산화 활성(31), 대장암 억제(32), 간 보호 효과(33), 심장 보호 효과(34) 등 다양한 건강증진 기능(35-37)을 나타낸다고 보고되어 있다. 총 플라보노이드 함량은 열수 추출, 50% 에탄올 및 50% 메탄올 추출물에서 각각 56.98 mg/g, 104.58 mg/g 및 104.19 mg/g으로 총 페놀 함량과 유사한 경향을 나타내었다. ORAC은 열수추출물, 50% 에탄올 및 50% 메탄올 추출물에서 g당 각각 715.66 μ M, 768.15 μ M 및 780.77 μ M로 나타나 50% 에탄올 및 50% 메탄올 추출조건의 항산화 활성이 높았다. Rugina 등(8)은 품종에 따른 아로니아의 ORAC을 조사한 결과 g당 35.3~42.3 μ M로 보고하였으며, 평균적으로 39.8 μ M을 나타낸다고 보고하였다. Hong(38)은 Acai 추출물의 ORAC값이 137.73~562.94 μ M/g로 보고하여 다른 베리류에 비해 Acai의 항산화 활성이 높다고 보고하였는데, 본 연구에서 사용한 아로니아 추출물의 항산화 활성이 보다

Table 3. Total phenolic, total flavonoid contents and ORAC (oxygen radical absorbance capacity) of extracts from *Aronia melanocarpa*

Extraction solvent	Total phenolic (TA) ¹⁾ (mg/g)	Total flavonoid (rutin mg/g)	ORAC (μ M TE/g FW)
hot water	80.14±0.69 ^{b2)}	56.98±2.64 ^b	715.66±12.99 ^b
50% ethanol	121.38±2.12 ^a	104.58±0.93 ^a	768.15±17.83 ^a
50% methanol	122.43±1.42 ^a	104.19±1.36 ^a	780.77±34.70 ^a

¹⁾TA, tannic acid

²⁾Means±SD (n=3) within each column (a-b) followed by the same letter are not significantly different (p<0.05)

우수함을 확인하였다.

DPPH 및 superoxide radical 소거활성

추출용매에 따른 아로니아 추출물의 DPPH 및 superoxide radical 소거활성은 Fig. 1과 같다. DPPH radical 소거활성을 분석한 결과 100 μ g/mL에서 1,000 μ g/mL으로 농도가 증가함에 따라 열수추출물의 경우 4.99~47.78%로 가장 낮은 활성을 나타내었으며, 50% 에탄올 및 50% 메탄올 추출물이 각각 7.96~70.01% 및 8.90~69.21%로 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 모든 구간에서 시료 처리 농도가 증가함에 따라 DPPH 소거활성이 증가하였으며 열수 추출물보다 50% 에탄올 및 50% 메탄올 추출물의 활성이 우수함을 확인하였다. Hwang 등(4)은 70% 에탄올로 추출한 아로니아 추출물의 DPPH radical 소거활성을 조사한 결과 500 μ g/mL에서 약 80%로 같은 조건에서 추출한 블루베리보다 2배정도 높은 활성을 나타내었다고 보고하였다. Superoxide

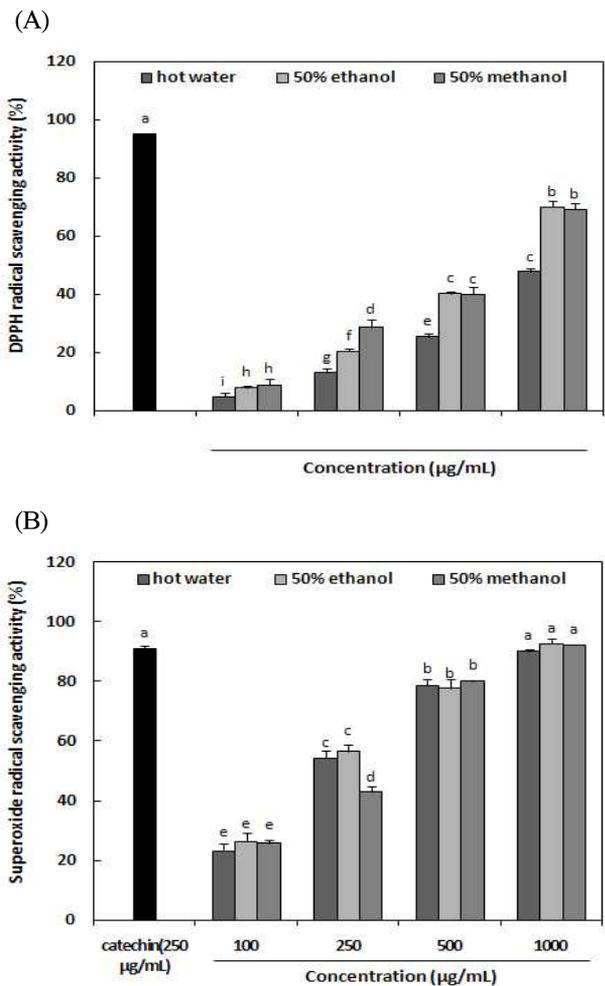


Fig. 1. DPPH (A) and superoxide radical scavenging activity (B) of extracts from *Aronia melanocarpa*.

Means±SD (n=3) with different letters above a bar are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

radical 소거활성을 분석한 결과 추출용매에 따른 활성의 차이가 유의적으로 나타나지 않았으나, 모든 시료에서 농도 의존적으로 증가하였다. 100~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 열수 추출물이 23.14~90.13%, 50% 에탄올 추출물에서 26.38~92.72% 및 50% 메탄올 추출물이 25.73~92.23%의 높은 활성을 나타내었다. 특히 모든 추출방법에서 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 항산화 활성이 90.13~92.72%로 나타나 양성 대조군으로 사용한 catechin(91.10%)과 유사한 활성을 나타내어 아로니아의 superoxide radical 소거활성이 우수함을 확인하였다. Jeong(39)은 아로니아를 주성으로 추출한 분말의 superoxide radical 소거활성을 조사한 결과 양성대조군으로 사용한 녹차 카테킨 EGCG와 비타민C의 SC50값은 각각 3.01 ppm, 8.84 ppm으로 나타나 아로니아 추출물의 활성이 EGCG(epigallocatechin gallate)보다 약 2.2배 낮은 활성을 보여주었으나 비타민C보다는 약 1.22배 우수한 활성을 나타내었다고 보고하였다.

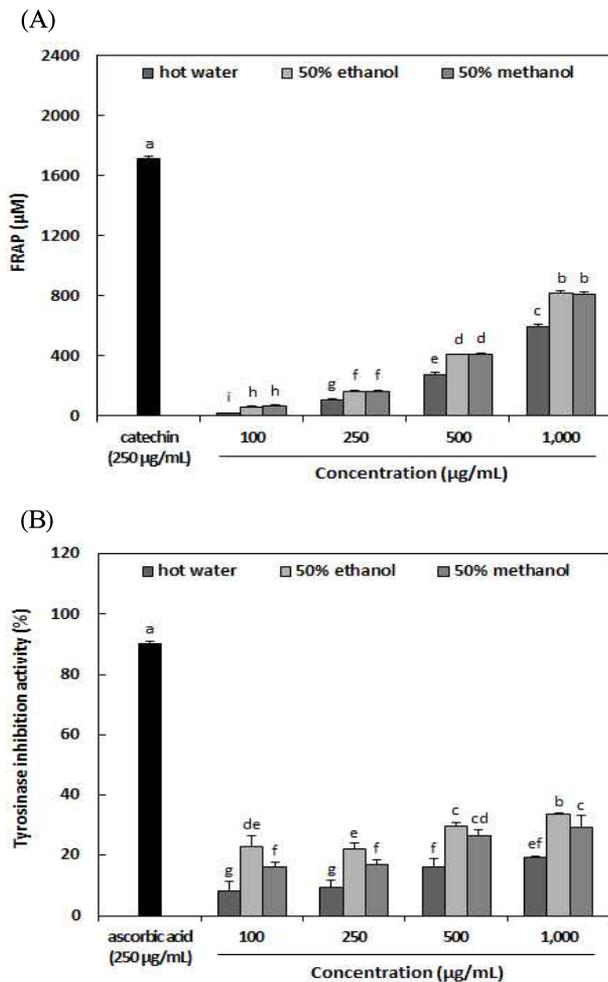


Fig. 2. FRAP (ferric reducing antioxidant power) (A) and Tyrosinase inhibitory activity (B) of extracts from *Aronia melanocarpa*.

Means \pm SD (n=3) with different letters above a bar are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

FRAP 및 Tyrosinase 저해활성

추출용매에 따른 아로니아 추출물의 FRAP 및 tyrosinase 저해활성은 Fig. 2와 같다. FRAP를 분석한 결과, 100~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 열수추출물이 20.49~595.17 μM 로 가장 낮았으며 50% 에탄올 추출물(57.14~817.87 μM) 및 50% 메탄올 추출물(67.32~812.78 μM)이 상대적으로 우수하였다. 50% 에탄올 및 50% 메탄올 추출물은 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 817.87 μM 및 812.78 μM 로 나타나 양성대조군으로 사용된 catechin(1710.44 μM)과 비교하여 0.5배 정도였으며 모든 시료에서 농도의존적으로 증가하였다. Rugina 등(8)의 보고에 따르면 품종에 따라 아로니아의 FRAP 함량은 185.0~300.2 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g FW}$ 로 보고하였으며, 평균적으로 230.5 $\mu\text{M/g}$ 의 함량을 나타냄을 확인하였다. Tyrosinase 저해활성을 분석한 결과 100~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 50% 에탄올 추출물이 23.03~33.82%로 가장 우수한 저해활성을 나타내었으며, 50% 메탄올 추출물(16.07~29.35%) 및 열수 추출물(8.26~19.12%) 순이었다. 특히 50% 에탄올 추출물 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서의 저해활성은 33.82%로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 양성대조군으로 사용된 catechin(90.03%)의 약 0.34배였다. 따라서 모든 아로니아 추출물에서 농도의존적으로 tyrosinase 저해활성이 나타남에 따라 향후 피부미백 기능성 소재로의 활용 가능성이 기대된다 하겠다.

자궁경부암세포 생육 저해활성

인간 자궁경부암세포주인 HeLa에 추출용매별 아로니아 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 배양한 후 MTT assay로 분석한 암세포생육 저해활성은 Fig. 3과 같다. 자궁경부암세포의 생육 저해활성은 50% 에탄올 추출물이 100~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 6.58~76.86%로 유의적으로 높은 저해활성을 나타내었다. 열수추출물 및 50% 메탄올 추출물은 각각 2.12~72.59% 및 7.24~71.97%로 50% 에탄올 추출물과 유사하게 높은 암세포생육 저해활성을 나타내었다. 모든 추출물에서 농도의존적으로 저해활성을 나타내었으며 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서의 저해활성은 71.97~76.86%로 양성대조군으로 사용된 doxorubicin 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 86.48%과 비교시 0.9배로 나타나 높은 저해활성을 보여주어 향후 여성을 대상으로 한 기능성식품 소재로 활용가능하다 사료된다. Rugina 등(8)은 아로니아에서 분리한 cyanidin glycosides의 자궁경부암 세포주에 대한 생존율을 확인한 결과 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 40%의 저해활성을 나타내었으며, 시료의 농도가 증가할수록 암세포생육 저해활성이 증가되었다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다. 따라서 추출용매에 따른 아로니아 추출물의 항산화 활성 및 자궁경부암 세포 생육 저해활성을 조사한 결과, 50% 에탄올 추출조건이 유용성분의 추출, 기능적 특성 및 가공비용 등을 고려하였을 때 산업적으로 적용가능하다 판단된다.

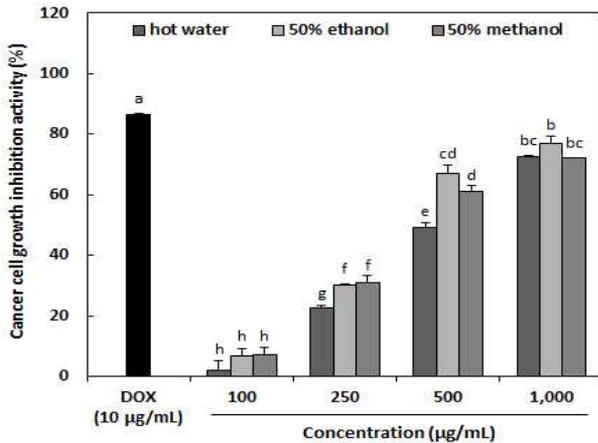


Fig. 3. Cancer cell growth inhibition activity of extracts from *Aronia melanocarpa* on HeLa cell line.

Means±SD (n=3) with different letters above a bar are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

요 약

본 연구에서는 페놀성물질 및 안토시아닌을 함유하고 있어 다양한 생리활성을 가지는 아로니아의 산업적 이용 증대 및 기능성식품 소재 개발을 목적으로 열수추출, 50% 에탄올 추출 및 50% 메탄올을 사용하여 추출물을 제조하였으며 추출용매에 따른 생리 활성을 조사하였다. 추출수율은 50% 에탄올, 열수 및 50% 메탄올 추출물 순으로 나타났으며, 총 당 함량은 35.56~37.68 g/100 g으로 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 총 안토시아닌 함량은 50% 메탄올 추출물이 395.10 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 50% 에탄올 및 열수추출물이 각각 318.61 mg/100 g과 252.82 mg/100 g이었다. 50% 메탄올 추출물의 안토시아닌 조성은 cyanidin-3-O-galactoside, cyanidin-3-O-arabinoside 및 cyanidin-3-O-glucoside 순이었으며, 100 g당 각각 364.65 mg, 163.06 mg 및 35.69 mg으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 총 페놀 함량은 50% 에탄올 및 50% 메탄올 추출물에서 각각 121.38 mg/g 및 122.43 mg/g으로 열수추출물 80.14 mg/g보다 유의적으로 높은 함량을 나타내었으며, 총 플라보노이드 함량은 총 페놀 함량과 유사한 경향을 나타내었다. ORAC은 열수 추출물, 50% 에탄올 및 50% 메탄올 추출물에서 각각 715.66 µM/g, 768.15 µM/g 및 780.77 µM/g로 나타나 50% 에탄올 및 50% 메탄올 추출조건의 항산화 활성이 높게 나타났다. DPPH radical 소거활성은 50% 에탄올 및 50% 메탄올 추출물이 100~1,000 µg/mL 농도에서 각각 7.96~70.01% 및 8.90~69.21%로 높은 활성을 나타내었으며, superoxide radical 소거활성은 모든 추출물에서 농도가 증가함에 따라 소거활성이 증가하였다. FRAP는 100~1,000 µg/mL 농도에서 50% 에탄올 추출물이 57.14~817.87 µM이었고 50% 메탄올 추출물이 67.32~812.78 µM로 나타나 높

은 함량을 보여주었다. Tyrosinase 저해활성은 50% 에탄올 추출물이 100~1,000 µg/mL의 농도에서 23.03~33.82%로 가장 우수한 활성을 나타내었다. 인간 자궁경부암세포주인 HeLa에 암세포생육 저해활성을 분석한 결과 50% 에탄올 추출물이 100~1,000 µg/mL 농도에서 6.58~76.86%로 유의적으로 높은 저해활성을 나타내었다. 따라서, 50% 에탄올 추출방법이 아로니아의 생리 활성이 우수한 추출물 제조방법으로 적합하였으며 기능성 식품 소재 개발에 있어 산업적으로 적용 가능할 것으로 사료된다.

References

1. Tanaka T, Tanaka A (2001) Chemical components and characteristics of black chokeberry. J Jap Soc Food Sci Technol, 48, 606-610
2. Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M (2010) Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. J Med Food, 13, 255-269
3. Oszmianski J, Sapis JC (1988) Anthocyanins in fruits of *Aronia melanocarpa* (chokeberry). J Food Sci, 53, 1241-1242
4. Hwang SJ, Yoon WB, Lee OH, Cha SJ, Kim JD (2014) Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. Food Chem, 146, 71-77
5. Kim B, Ku CS, Pham TX, Park Y, Martin DA, Xie L, Bolling BW (2013) *Aronia melanocarpa* (chokeberry) polyphenol-rich extract improves antioxidant function and reduces total plasma cholesterol in apolipoprotein E knockout mice. Nutr Res, 33, 406-413
6. Oszmianski J, Wojdylo A (2005) *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. Eur Food Res Technol, 221, 809-813
7. Bermúdez-Soto MJ, Larrosa M, Garcia-Cantalejo JM, Espín JC, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT (2007) Up-regulation of tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenol-rich chokeberry juice. J Nutr Biochem, 18, 259-271
8. Rugina D, Sconta Z, Leopold L, Pintea A, Bunea A, Socaciu C (2012) Antioxidant activities of chokeberry extracts and the cytotoxic action of their anthocyanin fraction on HeLa human cervical tumor cells. J Med Food, 15, 700-706

9. Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Tancheva S, Belcheva A (2007) Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. *Methods find Exp Clin Pharmacol*, 29, 101-106
10. Broncel M, Kozirog M, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Chojnowska-Jezierska J (2010) *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit*, 16, 28-34
11. Jurgoński A, Juśkiewicz J, Zduńczyk Z (2008) Ingestion of black chokeberry fruit extract leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia. *Plant Food Hum Nutr*, 63, 176-182
12. Skoczyńska A, Jędrychowska I, Poręba R, Affelska-Jercha A, Turczyn B, Wojakowska A, Andrzejak R (2007) Influence of chokeberry juice on arterial blood pressure and lipid parameters in men with mild hypercholesterolemia. *Pharmacol Rep*, 59, 177-182
13. Niedworok J, Jankowska B, Kowalczyk E, Charyk K, Kubat Z (1997) Antiulcer activity of anthocyanin from *Aronia melanocarpa* Elliot. *Herba Polonica*, 43, 222-227
14. Gutfinger T (1981) Polyphenol in olive oils. *J Am Oil Chem Soc*, 58, 966-972
15. Fennema OR (1996) *Food chemistry*, Third edition. CRC Press Publisher, Boca Raton, Florida, USA. p 681-706
16. Francis FJ, Markakis PC (1989) Food colorants: anthocyanins. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 28, 273-314
17. Choung MG (2004) Analysis of anthocyanins. *Korean J Crop Sci*, 49, 55-67
18. Kraemer-Schafhalter A, Fuchs H, Pfannhauser W (1998) Solid-phase extraction(SPE)-a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* var Nero. *J Sci Food Agric*, 78, 435-440
19. Dubois M, Gillers KA, Hanilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *J Anal Chem*, 28, 350-356
20. Lee J, Dutst 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
21. Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult*, 16, 144-158
22. Jia Z, Tang M, Wu J (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effect on superoxide radicals. *Food Chem*, 64, 555-559
23. Talcott ST, Lee JH (2002) Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *J Agri Food Chem*, 50, 3186-3192
24. Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200
25. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun*, 46, 849-854
26. Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 230, 70-76
27. Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishiyama S, Urabe K, Hearing VJ (1993) Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPA chrome tautomerase (TRP2), and a melanogenic inhibitor. *J Invest Dermatol*, 100, 126-131
28. Wangensteen H, Bräunlich M, Nikolic V, Malterud KE, Slimestad R, Barsett H (2014) Anthocyanins, proanthocyanidins and total phenolics in four cultivars of aronia: Antioxidant and enzyme inhibitory effects. *J Funct Foods*, 7, 746-752
29. Kang HH (2009) Determination of Biological Activities of Korean Berries and their Anthocyanin Identification. PhD Thesis. Gyeongsang National University, Jinju, Korea. p 1-172.
30. Bijak M, Bobrowski M, Borowiecka M, Podśędek A, Golański J, Nowak P (2011) Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia*, 82, 811-817
31. Faff J, Frankiewicz-Jóźko A (2003) Effect of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on the exercise-induced oxidative stress in rat tissues. *Biol Sport*, 20, 15-23
32. 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. *J Natl Cancer Inst*, 54, 84-93
33. Valcheva-Kuzmanova S, Borisova P, Galunska B, Krasnaliev I, Belcheva A (2004) Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 56, 195-201
34. Bell DR, Burt TD (2007) Phenolic acids contained in

- anthocyanin enriched extracts from elderberry, bilberry and chokeberry possess endothelium dependent and independent vasorelaxation properties in porcine coronary arteries. *FASEB J*, 21, 550-557
35. Galvano F, La Fauci L, Lazzarino G, Fogliano V, Ritieni A, Ciappellano S, Bat-tistini NC, Tavazzi B, Galvano G (2004) Cyanidins: metabolism and biological properties. *J Nutr Biochem*, 15, 2-11
36. Kulling SE, Rawel HM (2008) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - a review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med*, 74, 1625-1634
37. Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM and Saura-Calixto F (2009) Tan-nins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res*, 53, 310-329
38. Hong JH (2011) Optimization of extraction conditions for functional components from Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) by response surface methodology. *J East Asian Soc Dietary Life*, 21, 713-722
39. Jeong JM (2008) Antioxidative and antiallergic effects of Aronia (*Aronia melanocarpa*) extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 37, 1109-1113

(접수 2014년 8월 11일 수정 2014년 9월 26일 채택 2014년 9월 26일)