

한국산 배과피 폴리페놀 분획군의 생리활성효과

안봉전 · 이진태 · 곽재훈 · 박정미 · 이진영 · 손준호 · 배종호¹ · 최 청^{2,*}

대구한의대학교 화장품공학과, ¹대구미래대학, ²영남대학교 생물산업공학부

(2003년 12월 4일 접수, 2004년 2월 5일 수리)

한국산 배과피의 기능성 원료로서의 기능성을 알아보기 위하여 폴리페놀 성분을 분획하여 그 생리활성 및 암세포 증식능에 대하여 살펴보았다. 전자공여능에서는 50 ppm에서 분획물 II, III에서 80% 이상으로 나타났으며 SOD 유사능은 분획물 II, III의 500 ppm군에서 50-60%의 효과가 인정되었다. 통풍과 관련있는 xanthine oxidase 실험에서는 분획물 I의 저해 효과는 미미하였으나 II와 III에서는 50 ppm에서도 80%에 이르는 높은 저해효과가 관찰되었으며, 유선암세포(MDA) 생육억제 실험에서는 분획물 II보다 III가 높은 증식억제능을, 2,000 ppm에서는 약 60%의 억제능을 나타내었고, 전립선암(PC-3)의 세포억제효과에서는 III보다 II에서 오히려 억제 효과가 높았고, 500 ppm에서 약 23%의 억제효과가 관찰되어 한국산 배과피의 기능성 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

Key words: 배과피, 폴리페놀, DPPH, SOD, xanthine oxidase, MTT, 저해제

서 론

배는 생식용으로 재배되고 배속식물은 동양계중 남방형인 일본배, 북방형인 중국배 및 유럽계인 서양배 등 3종류이다. 이와 같은 배속식물은 현 재배종을 포함하여 30여 종이 분포하고 있으나, 이들 모두 발상지는 중국의 서부와 남서부로 알려져 있다. 우리 나라의 배 재배는 삼한시대와 신라의 문헌에서 배에 관한 기록이 있고 고려에서도 재배를 장려했다는 기록을 보아 역사는 매우 길다.¹⁾ 배에 함유된 영양성분은 먹을 수 있는 가식율이 80-82%, 수분함량이 85-88%에 이른다. 주성분은 탄수화물이며 당분은 10-13%로 품종에 따라 차이가 많고 단백질 함량은 0.3% 내외로서 다른 과실과 큰 차이가 없다. 지방질은 0.2%, 섬유소는 0.5%로 다른 과실에 비해 다소 적은 편이며 무기질은 나트륨, 칼슘, 마그네슘 함량이 75%를 차지하고 있어 강한 알칼리 식품으로 건강 지향적인 식품으로 잘 알려져 있다.²⁾ 예로부터 배 잎과 껍질, 과실을 민간요법으로 사용하여 왔는데, 잎은 알푸진과 단령질 성분이 3% 함유되어 토사광란에 특효약으로서, 껍질은 부스럼이나 피부질환에, 과일은 가래기침, 숙취, 해열, 배변, 연육 등에 쓰여져 왔었다.³⁾ 그러나 우리 일상생활에서 오랫동안 식품으로 애용되어왔던 배의 생리활성 기능에 대한 연구는 매우 미비한 것이 사실이다. 우리는 배의 껍질부분에 상대적으로 많이 존재하는 폴리페놀류를 분획하고 배의 폴리페놀⁴⁾ 성분에 대한 생리활성 검증의 일환으로 전자공여능, 항산화, SOD 유사활성, 항암실험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료. 본 실험에 사용된 배과피는 신고 품종으로 과피

만을 모아 공시재료로 사용하였다.

Sephadex LH-20에 의한 폴리페놀군 분획. 배로부터 박피된 과피 3kg에 80% 에탄올을 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 원심분리(1,690×g, 30 min)하여 상정액과 침전물을 얻었고 이 침전물에 다시 80% 에탄올을 가하고 위와같은 추출 과정을 4회 반복하였다. 배추출물로부터 Sephadex LH-20에 의해 분획된 폴리페놀화합물군을 감압농축한 후 동결건조하여 본 실험에 사용하였다(Fig. 1).⁵⁾

전자공여능에 의한 항산화 측정. 폴리페놀류의 전자공여 작용(electron donating ability, EDA)은 Blois⁶⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 1.0 ml에 2×10⁻⁴ M의 α,α-diphenyl-β-picryl-hydrazyl(DPPH) 1.0 ml를 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도감소율로 나타내었다.

$$\text{전자 공여능(\%)} = \left(\frac{1 - \text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

SOD(Superoxide Dismutase) 유사활성 측정. Superoxide dismutase 유사활성능은 Marklund⁷⁾의 방법에 따라 각 시료액 0.2 ml에 Tris-HCl의 완충용액(50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.5) 3.0 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후, 1.0 N HCl 0.1 ml를 가하여 반응을 정지시킨 후 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. SOD 유사활성능은 시료 첨가구와 첨가하지 않은 경우의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{SOD-유사활성능(\%)} = \left(\frac{1 - \text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

Xanthine oxidase 저해활성. Xanthine oxidase 활성 저해 측정에는 Stirpe와 Corte⁸⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 반응구는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 xanthine 2 mM을 녹인 기질액 0.4 ml에 xanthine oxidase(0.2 unit/ml)

*연락처

Phone: 82-53-810-2952; Fax: 82-53-815-1891

E-mail: cchoi@yumail.ac.kr

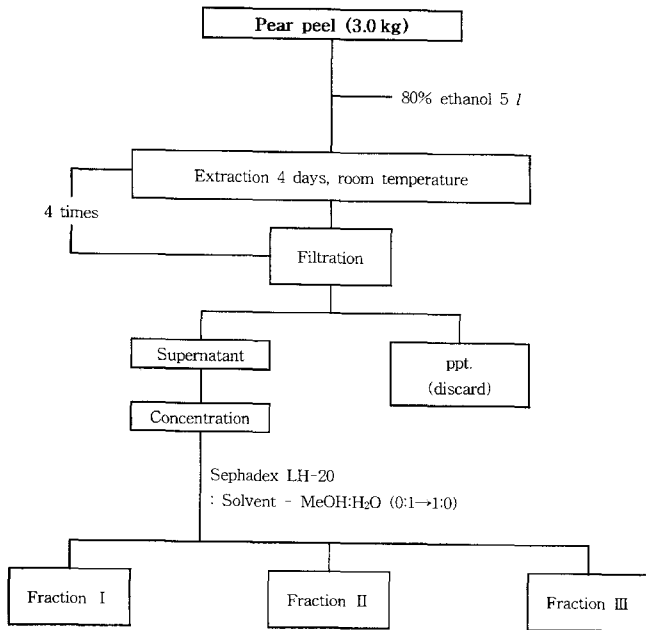


Fig. 1. Procedure for isolation of polyphenol from pear peel.

0.2 ml와 시료액 0.2 ml를 가하고 대조구에는 시료액 대신 증류수를 0.2 ml 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid(TCA) 1 ml를 가하여 반응을 종료시키고 원심분리하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하여, 다음 식으로 저해율(%)을 구하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(\frac{1 - \text{반응구의 uric acid 생성량}}{\text{대조구의 uric acid 생성량}} \right) \times 100$$

세포배양. 본 실험에 이용한 세포 PC-3, MDA-MB-231은 Korean Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하였다. 각 세포의 배양은 10% fetal bovine serum과 penicillin G(25 unit/ml), streptomycin(25 µg/ml)를 첨가한 RPMI 1640 배지를 사용하였으며 37°C, 5% CO₂의 환경에 적응시켜 배양하였다.

MTT assay. 폴리페놀류의 암세포주에 대한 증식 억제효과는 Carmichael 등의 방법⁹⁾을 변형하여 MTT assay를 실시하였다. 암세포주를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well이 되게 180 µl 분주하고 시료를 일정농도로 제조하여 20 µl 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 48시간 배양하였고, 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 20 µl를 첨가하여 4시간 더 배양하였다. 배양종료 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 150 µl를 가하여 30분간 교반 한 후 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포주의 성장억제효과를 측정하였다. 세포증식 억제효과는 다음과 같은 계산식으로 구하였다.

$$\text{암세포증식억제효과}(\%) = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

Table 1. Contents of total polyphenol isolated from pear peel (unit: %)

	Fraction I	Fraction II	Fraction III
Contents	5.7	55.8	71.6

통계처리. 본 연구의 통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하여 실시하였으며, Student-Newman-Keuls multiple range test를 이용하여 평균값의 유의성을 5% 이내의 한계로 조사하였다.

결과 및 고찰

배과피 추출. 배 과피로부터 폴리페놀 화합물군을 분획하기 위해서 배과피를 80% 에탄올 5 l에 침지하여 추출하여 실온에서 4회 추출한 액을 여과한 후 농축하여 Fig. 1과 같이 sephadex LH-20을 통과시켜 분획한 결과 세부분으로 나눌 수 있었으며, 폴리페놀 화합물군을 정량한 결과 각각 5.7, 55.8, 71.6%로 나타났다(Table 1). 위와 같이 배과피를 분획한 결과 대체로 메탄올 함량이 낮은 농도에서 폴리페놀이 대부분 용출되는 것으로 보아 sephadex LH-20에 대해 흡착력이 약한 폴리페놀이 구성되어있다는 것을 추정할 수 있었다. 이러한 과정은 일반적인 약용식물에서 폴리페놀을 분획할 때 메탄올 10%까지는 그대로 용출시킨 후에 분획을 시작한 Nonaka의 방법⁵⁾을 응용하여 실시하였다. 배 과피에는 다양한 폴리페놀을 함유하고 있으나 그 산화효소의 작용으로 정제과정을 거치는 동안 화합물이 불안정하여 복잡한 정제과정을 거치기 어려운 점이 있어 분획물 I, II, III를 얻어 각종 생리활성실험을 실시하였다.

전자공여능. 생체막 구성성분을 파괴하며 각종 산화작용을 나타내는 활성산소를 소거하여 줄 수 있는 활성을 알아보기 위하여 배 과피로부터 추출한 폴리페놀의 분획물을 50 ppm에서 1,000 ppm으로 조제하여 전자공여능을 살펴보았다(Fig. 2). 분획물 II, III는 50 ppm에서부터 80% 이상의 전자공여능을 보였으며, 분획물 I의 경우에는 1,000 ppm에서 약 40%의 전자공여능을 나타내었다. 이 등¹⁰⁾의 함초의 열수추출물의 경우 500 ppm에서 60% 정도의 전자공여능을 보인 것과 비교할 때 우수한 전자공여능을 나타냄을 알 수 있었다. 이는 배과피 polyphenol에 포함되어 있는 hydroxyl group이 DPPH와 결합하기에 용이한 구조를 가졌기 때문이라 사료된다.¹¹⁾

SOD(Superoxide Dismutase) 유사활성. 생체내에서 superoxide radical을 과산화수소로 전환시키는 SOD의 유사능은 Fig. 3에서와 같이 분획물 I은 그 활성이 미약하였으나, 분획물 II, III의 경우 100 ppm에서 20%대, 500ppm에서 50-60%의 효과를 나타내었으며, 1,000 ppm에서는 85.4%와 90.4%로 증가되는 것을 알 수 있었다. 분획물간에는 I < II < III의 순서대로 그 활성이 큰 것을 알 수 있었다. 이와 같이 500 ppm의 높은 농도에서 SOD 유사능이 증가되는 것으로 보아 유사활성은 다른 식물의 폴리페놀과 유사한 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 Uchida 등¹²⁾, Nice 등¹³⁾의 SOD 유사활성실험에서의 결과와도 매우 유사한 결과를 나타내고 있다.

Xanthine oxidase 저해효과. 통풍을 일으키는 원인 물질인

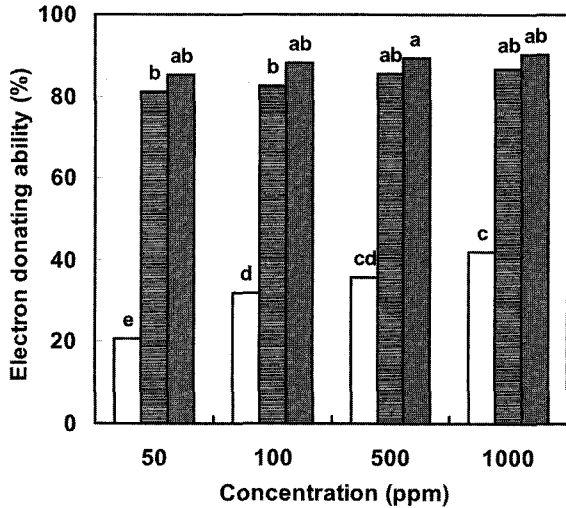


Fig. 2. Electron donating abilities of polyphenol isolated from pear peel. □: fraction I, ▨: fraction II, ■: fraction III. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at p<0.05.

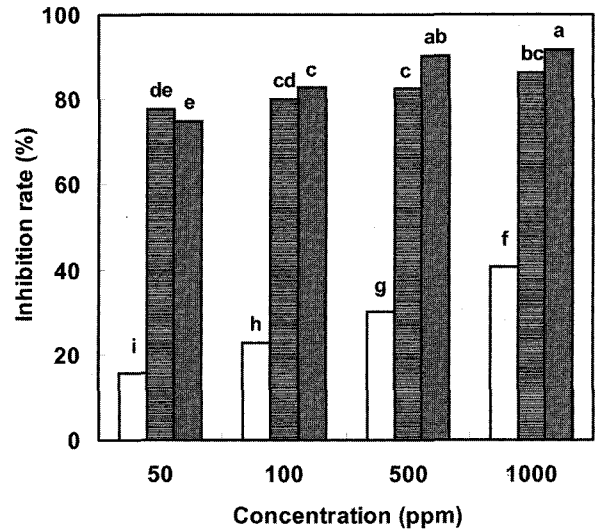


Fig. 4. Inhibition effect of polyphenol isolated from pear peel on xanthine oxidase. □: fraction I, ▨: fraction II, ■: fraction III. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at p<0.05.

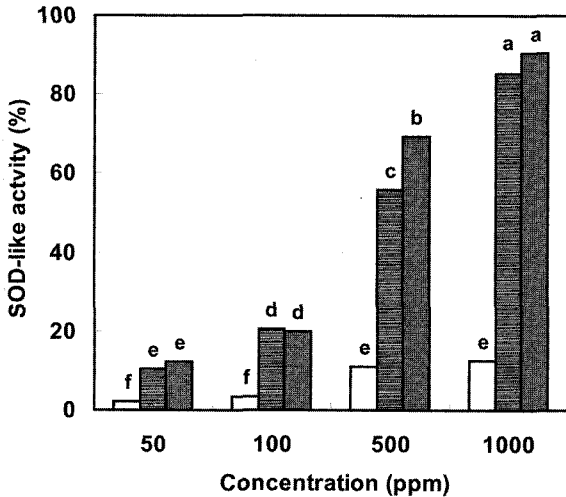


Fig. 3. SOD-like activity of polyphenol isolated from pear peel. □: fraction I, ▨: fraction II, ■: fraction III. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at p<0.05.

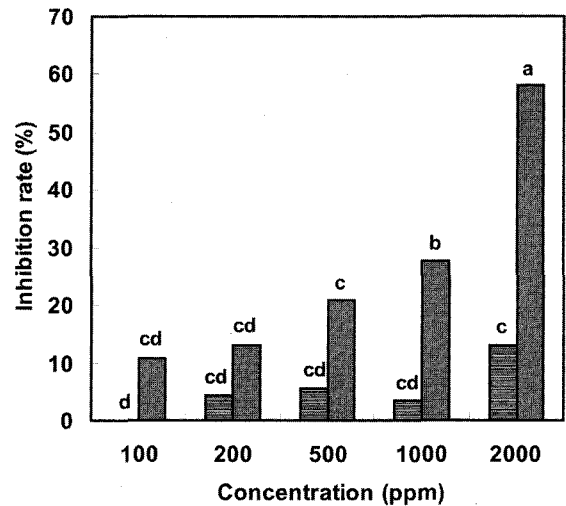


Fig. 5. Inhibition effect of polyphenol fraction II and III from pear peel on the breast adenocarcinoma cell. ▨: fraction II, ■: fraction III. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at p<0.05.

요산은 hypoxanthine과 xanthine에서 xanthine oxidase의 촉매로 산화되어 요산이 되며, 요산 생성 효소인 xanthine oxidase는 Mo와 Fe를 함유하는 flatoprotein이다. 이러한 요산을 생성하는 xanthine oxidase에 대한 활성저해능을 측정한 결과 분획물 I의 저해 효과는 매우 미미하였으나 나머지 분획폴리페놀류는 50 ppm에서도 80%에 이르는 높은 저해효과가 관찰되었다(Fig 4). 이러한 결과들은 Stripe 등¹⁴⁾과 안 등¹⁵⁾의 xanthin oxidase저해실험에서 폴리페놀류가 저해효과가 높다는 결과와도 일치하였으며, 김 등¹⁶⁾이 보고한 해조류 추출물 중 감태 메탄올 추출물이 400 ppm 농도에서 53.1%로 나타나 배 과피 추출물이 높은 저해율을 나타내었다.

암세포 증식억제능. 배과피 추출 폴리페놀의 암세포에 대한 억제능을 살펴보았다. 추출물 중 폴리페놀 함량이 높았던 분획

II, III에서 암세포증식 억제능을 볼 수 있었다. 우선 유선암세포에서는 분획물 II는 2,000 ppm에서도 그 저해능이 20% 미만의 낮은 저해능을 나타내었으나, 분획물 III의 경우에는 1,000 ppm에서는 약 30% 그리고 2,000 ppm에서는 약 60%의 유선암세포에 대한 저해능을 나타내었다. 한편, 전립선암에 대해서는 앞선 유선암의 결과와는 반대로 폴리페놀 함량이 낮은 분획물 II의 저해능이 500 ppm에서 20%를 상회하는 저해능을 나타내어 폴리페놀 함량이 많은 분획물 III보다 오히려 높게 나타났다. 저령추출물의 인간유래 위암세포인 SNU668에 대하여 water fraction에서는 1000 ppm에서 71%, ethylacetate fraction에서는 43.9%의 저해효과를 나타내었다.¹⁷⁾

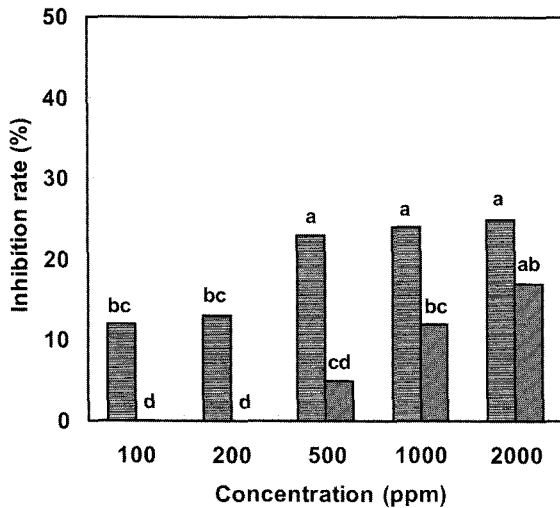


Fig. 6. Inhibition effect of polyphenol fraction II and III from pear peel on the prostate adenocarcinoma cell. □: fraction II, ■: fraction III. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

감사의 글

이 연구는 1999년도 농림부 첨단기술 개발사업 과제(NO. 104320)에 의하여 연구비를 지원받아 수행하였으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Challice, J. S. and Williams, A. H. (1968) Phenolic compounds of the genus *Pyrus*-II. A chemotaxonomic survey. *Phytochemistry* **7**, 1781-1785.
- Shin, Y. U., Yun, M. S., Kim, T. C., Kim, Y. S. and Lee, K. K. (1992) A study on the processing suitability of pear and Chinese jujube cultivars. *RDA J. Agric. Sci. (FM., A.E., S.& F.P.U)*, **34**, 58-65.
- Kim, J. H., (1997) In *Latest Cultivars of Pear*. Ohsung Press, Seoul, pp. 11-29.
- Lee, D. S., Woo, S. K. and Yang, C. B. (1972) Studies on the

- chemical composition of major fruits in Korea. *J. Food Sci. Technol.* **4**, 134-139.
- Nonaka, G. H. (1989) Isolation and structure elucidation of tannins. *Pure Appl. Chem.* **61**, 357-360.
- Blois, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1198-1202.
- Marklund, S. and Marklund, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallo and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.
- Stirpe, F. and Corte, E. D. (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **244**, 3855-3863.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G. Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. (1987) Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Lee, J. T. and An, B. J. (2002) Detection of physical activity of *Salicornia herbacea*. *Kor. J. Herbology* **17**, 61-69.
- Lee, S. E., Seong, N. S., Park, C. G. and Seong, J. S. (2002) Screening for antioxidive of oriental medicinal plant materials. *Kor. J. Medicinal Crop. Sci.* **10**, 171-176.
- Uchida, S., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Nonaka, G. Y., Nishioka, I., Niwa, M. and Ozaki, M. (1987) Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals. *Med. Sci. Res.* **15**, 831-834.
- Nice, D. J., Robinson, D. S. and Holden, M. A. (1995) Characterization of a heat-stable antioxidant co-purified with the superoxide dismutase activity from dried peas. *Food Chem.* **52**, 393-397.
- Stripe, F. and Corte, E. D. (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **244**, 3855-3861.
- An, B. J. (1997) Inhibitory effect of polyphenols isolated from green tea on the xanthine oxidase. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **12**, 582-585.
- Kim, O. K., Lee, T. G., Park, Y. B., Park, D. C., Lee, Y. W., Yeo, S. G., Kim, I. S., Park, Y. H. and Kim, S. B. (1996) Inhibition of xanthine oxidase by seaweed extract. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **25**, 1069-1073.
- Ha, Y. D. (2001) Antitumoral, antioxidant and antimicrobial activities of solvent fractions from *Grifola umbellatus*. *Kor. J. Postharvest Sci. Technol.* **8**, 481-487.

Biological Activity of Polyphenol Group Fraction from Korean Pear Peel

Bong-Jeun An, Jin-Tae Lee, Jae-Hoon Kwak, Jung-Mi Park, Jin-Young Lee, Jun-Ho Son, Jong-Ho Bae¹ and Cheong Choi^{2,*} (*Department of Cosmetic Engineering Daegu Haany University, Kyungsan, 712-715. Korea; ¹Department of Confectionery Decoration, Daegu Mirae College; ²Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyungsan, 712-749, Korea*)

Abstract: Biological activities and anticarcinogenicity of Korean Pear peel were investigated. Electron donating activity and superoxide dismutase (SOD)-like activity of fraction II, III were up to 80% and 50-60% at 50 ppm, respectively. Inhibitory effects on xanthine oxidase were about 80% at 50 ppm, breast adenocarcinoma was about 60% at 2,000 ppm, higher III than II. Inhibitory effect on prostate adenocarcinoma was about 23% at 500 ppm. In conclusion, Korean pear peel was expected to use as a functional material.

Key words: pear peel, polyphenol, DPPH, SOD, xanthine oxidase, MTT, Inhibitor

*Corresponding author