

Blueberry 추출물의 항산화 효과

김태춘¹ · 배강순¹ · 김일광 · 천현자*

자연과학대학 자연과학기술학부, 1: 원광대학교 생명자원과학대학

Antioxidative Activities of Solvent Extracts from Blueberry

Tae-Choon Kim¹, Kang Soon Bae¹, Il Kwang Kim, Hyun Ja Chun*

Division of Natural Science, College of Natural Sciences, 1: College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University

Recent interest in the possible protective effects of dietary antioxidant compounds against human degenerative disease has prompted investigation of foods such as blueberries, which have a high antioxidant capacity. This study was performed to determine the antioxidative activity of methanol extract and solvent fractions from blueberry. Blueberry was extracted with methanol and then fractionated with n-hexane, EtOAc, BuOH and water to get active fractions. And their antioxidant capacities in each fraction were determined by using the DPPH and FRAP assay, and tyrosinase inhibitor. Ethyl acetate fraction of blueberry exhibited antioxidant capacity.

Key words : Blueberry, antioxidant capacity, DPPH, FRAP, tyrosinase inhibitor

서 론

자유라디칼(free radical)은 생체 내에서 슈퍼옥사이드(O₂), 과산화수소(H₂O₂), 수산화기(OH) 및 일중산소(¹O₂)와 같은 활성 산소종의 산화적 대사산물로 생성된다. 이들은 생체 내에서 단백질, 생체막, DNA 등에 작용하여 생체 막 지질의 산화를 유발시켜 과산화지질을 생성하고 DNA의 산화적 손상으로 암을 비롯한 다양한 성인병 발병에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁾

자유라디칼에 의한 지방질 산화 및 DNA의 손상을 억제시키는 방법으로 항산화물질의 첨가가 효과가 있는 것으로 알려지면서 천연 또는 합성 항산화물질을 개발하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다.²⁻⁴⁾

현재 합성 항산화물질인 BHA(butylated hydroxyanisole)와 BHT(butylated hydroxytoluene)가 식품에 첨가되어 사용되고 있으나 장기 식용에 따른 부작용으로 변이성의 독성이 지적되어 안정하고 효력이 강한 항산화물질을 찾으려는 연구가 천연물을 중심으로 활발하게 진행되고 있다.⁵⁻¹⁰⁾

블루베리는 진달래과 산앵두나무속(Ericaceae, Vaccinium

spp.)이며 15 - 21℃의 온도와 pH 4.5 - 5.5의 산성토양에서 잘 자라는 다년생 온대 과수로, 고관목성(highbush blueberry), 저관목성(lowbush blueberry), 레빗아이(rabbiteye blueberry)로 나뉘며 여름에 익은 블루베리의 열매를 따서 과일로 사용하고 있다.

블루베리의 약리 작용으로는 망막의 로돕신 합성을 촉진하며, 항 궤양 및 항 열 작용, 정장작용, 혈소판 응고억제작용 및 항산화작용이 있는 것으로 알려져 있다. 특히, 세계 10대 장수 식품의 하나로 선정되어질 정도로, 주요 채소 및 과일 중에 최고의 항산화 활성물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다.

블루베리에 대한 연구로는 블루베리의 페놀성분의 활성산소 라디칼의 흡수효과,¹¹⁾ 산화적 스트레스 억제효과,¹²⁾ 항산화 효과,¹³⁾ 이노작용,¹⁴⁾ 블루베리 품종에 따른 성분의 변화¹⁵⁾ 등에 대하여 보고 되었으며 항균 및 항암활성에 대한 연구 등 다양한 연구가 진행되고 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 그러나 국내에서는 블루베리에 대한 연구가 전무한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 과실로 많이 애용되고 있는 블루베리를 시료로 사용하여 노화의 원인으로 알려져 있는 유리 활성 산소의 생성을 억제시키는 항산화 효과를 free radical 소거법인 DPPH법과 환원력을 측정하는 FRAP(ferric-reducing antioxidant power)법을 이용하여 측정하였으며, 멜라닌 형성을 방해하여 항 노화 작용을 유도하는 유효물질의 존재 가능성을 알아보기 위해 버섯 tyrosinase의 활성 억제효과를 측정하여 항 노화과정

* 교신저자 : 천현자, 익산시 신동동 344-2 원광대학교 자연과학대학

· E-mail : hjchun@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6918

· 접수 : 2004/11/22 · 수정 : 2004/12/24 · 채택 : 2005/01/27

의 기초 자료로 알아 보기 위하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 검액조제

본 실험에서 사용한 블루베리는 Winterglow 상표의 블루베리를 구입하여 시료로 사용하였다. 시료를 메탄올에 용해시켜 상온에서 24시간 3회 추출한 다음, 이 추출액을 여지로 여과하고, 감압 농축하고 동결 건조시켜 메탄올 추출물을 얻었다. 계속하여 메탄올 추출물을 n-hexane, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물의 순서로 분획 추출하고, 여액을 감압 농축하여 용매 분획물을 얻었다(Fig. 1). 시료의 조제는 DPPH 라디칼 소거법에 사용하는 경우에는 시료를 메탄올용액에 10mg/ml의 저장용액(stock solution)을 만들어 놓고 methanol에 희석하여 사용하였으며, tyrosinase 저해활성 측정법에서는 시료를 0.05M sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 녹인 후 냉장 보관하면서 sodium phosphate buffer에 희석한 다음 사용하였다.

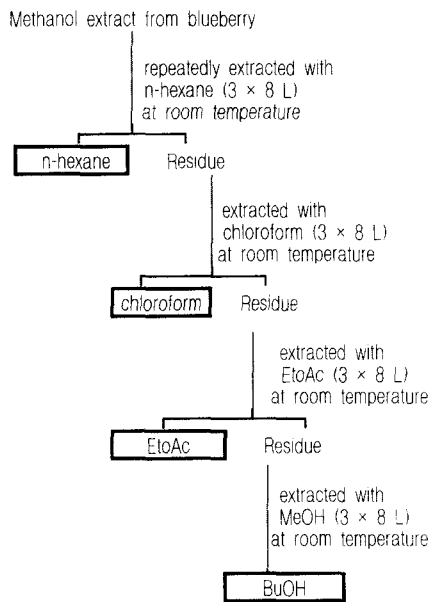


Fig. 1. Extraction of blueberry

2. DPPH 라디칼 소거법에 의한 항산화활성 측정

각 시료의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 전자공여능(electron donating ability)은 Yoshida¹⁹⁾ 등의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료는 메탄올에 5mg/ml의 농도로 녹인 후 희석하여 사용하였다. 각 추출물이 첨가된 메탄올 용액 0.8ml에 0.35 mM DPPH 시약 0.2ml를 가하고 잘 섞은 후 암소에서 10분간 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 dose-response 곡선으로부터 50%의 자유라디칼 소거능(IC₅₀) 값을 구하였다. 이때 IC₅₀(μg/ml)은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 값을 50% 감소시키는 시료의 농도를 나타냈다. 대조군(blank)으로는 시료 대신 메탄올을 넣고 측정하며, 비교군(control)으로는 ascorbic acid, BHA 및 a-tocopherol을 사용하였다.

3. FRAP(ferric-reducing antioxidant power) 측정

Oyaizu²⁰⁾ 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료는 DMSO에 10mg/ml의 농도로 녹인 후 희석하여 사용하였다. 각 추출물이 첨가된 DMSO 용액 0.4ml에 0.2M phosphate buffer(pH 6.6)와 potassium ferricyanide(1%,w/v)를 각각 0.4ml씩 가하고 잘 섞은 혼합액을 50℃에서 20분간 배양시킨 후 trichloroacetic acid(10%, w/v) 0.4ml를 가한 다음 2,000rpm으로 10분간 원심분리 시켰다. 상침액 0.5ml를 취한 후 여기에 FeCl₃(0.1%, w/v) 0.1ml를 가한 후 700nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)으로는 ascorbic acid, BHA 및 tocopherol을 사용하였다.

4. Tyrosinase 저해활성 측정

시료 추출물 40uL을 96-well microtiter tray에 취한 다음, 여기에 0.05M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 80uL 및 0.05M tyrosine 40uL를 각각 가하고 분광 광도계를 이용하여 475nm에서 색소 보정용 흡광도(CCabs)를 측정한 후, 여기에 tyrosinase (250 unit/mL) 40uL를 가하고 37에서 10분간 반응시킨 후 475nm에서 흡광도(Tabs)를 측정하였다. 그리고 tyrosinase 대신에 buffer 40uL를 첨가하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정한 blank 값(Babs), 시료용액 대신에 buffer 40uL를 첨가하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정한 control 값(Cabs)으로부터 다음의 식에 의해 저해 활성을 계산하였다.²¹⁾

$$\text{Inhibitory effect(\%)} = 1 - (\text{Tabs} - \text{CCabs} - \text{Babs}) / \text{Cabs} \times 100$$

5. 통계처리

실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 수득물

Blueberry 1.0kg에 메탄올을 넣고 상온에서 교반하며 추출한 후 추출액을 여과하여 감압 농축하고 동결건조시켜 메탄올추출물을 얻었다. 다시 메탄올 추출물을 연속추출법을 이용하여 각각의 용매 분획물을 분획 추출하고, 여액을 감압 농축하여 용매 분획물들을 얻었다. 각 추출물을 0.4 μm필터로 여과한 후, 여과액을 증류기로 35℃에서 감압 농축시킨 후 냉동 건조하여 건조증량을 얻었으며 각 용매별 수득율을 Table 1에 나타내었다. 추출물의 수득율은 시료의 건조증량에 대한 추출물 함량의 백분비로 하였다.

2. 전자공여능(electron donating ability)

전자공여능은 지질과산화 반응의 연쇄반응에 관여하는 산화성 라디칼에 전자를 제공하여 연쇄반응을 정지시킨다. 특히 DPPH법은 간단하면서도 대량으로 측정이 가능한데 이 물질은 라디칼을 갖는 물질 중에서 비교적 안정한 화합물로 항산화 물

질의 전자 공여능으로 인하여 방향족화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 메탄올 용액에서는 보라색으로 발색된다. 그러나 항산화 활성을 갖는 물질을 만나면 항산화 활성물질이 DPPH의 라디칼을 포획하기 때문에 보라색이 소실된다. 따라서 미지시료의 항산화 활성을 쉽게 측정할 수 있으며 실제 항산화 활성과도 연관성이 매우 높은 장점이 있다.

블루베리의 메탄올 추출물의 농도변화에 따른 항산화 활성을 DPPH법으로 측정된 결과는 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보는바와 같이 추출물의 농도가 증가함에 따라 항산화 활성은 증가되었다. 메탄올 추출물의 IC₅₀ 값이 92.00µg/ml로 비교적 좋은 항산화 활성을 나타내었다. 따라서 메탄올 추출물을 연속추출법으로 용매 분획하여 분획물들의 항산화 활성을 측정하였으며 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 물 분획물을 제외한 모든 분획물에서 항산화 활성이 나타났다. 특히, 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 활성을 보였으며 IC₅₀ 값이 18.89µg/ml로 표준 항산화물질인 ascorbic acid의 17.39µg/ml와 BHA의 18.48µg/ml의 값과 거의 유사한 값을 보여 좋은 항산화물질로서의 가능성을 보여주었다. 에틸아세테이트 분획물의 농도 변화에 따른 항산화 활성은 Fig. 3에 나타내었다.

Table 1. Extraction yield of extract and solvent fractions from blueberry

Extract and fractions	Extraction yield g (w/w, %)
MeOH extract	49.06 (4.91)
n-Hexane fraction	0.27 (0.57)
Chloroform fraction	0.13 (0.28)
Ethyl acetate fraction	0.47 (1.00)
BuOH fraction	7.059 (15.02)
Water fraction	31.55 (67.14)

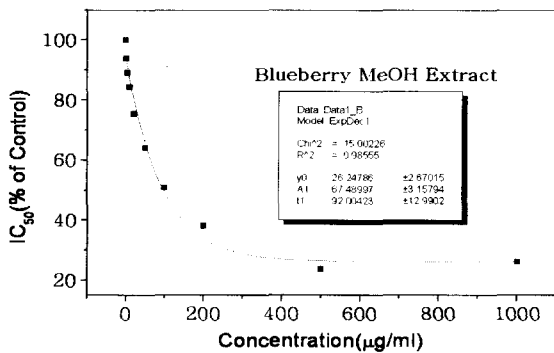


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activities of methanol extract from blueberry

Table 2. IC₅₀ values of the methanol extract and solvent fractions from blueberry in DPPH radical scavenging activity

Extract and fractions	IC ₅₀ (µg/ml)
MeOH extract	92.00 ± 2.98
n-Hexane fraction	29.39 ± 2.98
Chloroform fraction	29.15 ± 3.50
Ethyl acetate fraction	18.89 ± 1.99
BuOH fraction	54.30 ± 9.91
Water fraction	364.74 ± 40.17
BHA	18.48 ± 1.32
Ascorbic acid	17.39 ± 1.79

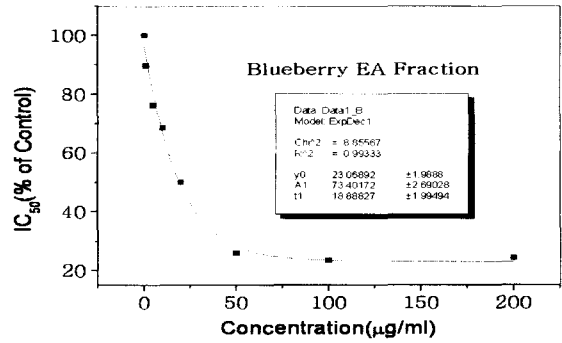


Fig. 3. DPPH free radical scavenging activities of Ethyl acetate fraction from blueberry

3. FRAP 측정

FRAP 측정법은 항산화력(antioxidant power)을 측정하는 방법으로 플라즈마(plasma)의 ferric-reducing ability를 변형하여 측정하였다. 간단히 말해서 희석한 블루베리 추출물의 항산화력은 pH 6.6의 phosphate buffer 용액에서 potassium ferricyanide와 FeCl₃ 용액(FRAP reagent)이 반응함으로써 ferric iron을 ferrous iron으로 환원시키는 그 능력에 의하여 결정된다. FRAP 시약에서 iron의 환원은 청색 생성물을 형성하며, 그것의 absorbance는 적절하게 용해된 berry 추출물이나 항산화 표준물질을 FRAP reagent에 첨가한 이후에 10분 동안 700nm에서 spectrophotometer로 측정한다. 높은 흡광도는 높은 환원력(reducing power) Fe³⁺ → Fe²⁺ 또는 환원전위(reductive potential)를 나타내며 좋은 환원제를 의미한다. 블루베리 추출물 및 분획물의 환원력을 FRAP측정법에 의해 측정한 결과는 다음과 같다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 n-hexane 분획물, 클로르포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물에서는 환원력이 나타났으며 물 분획물에서는 환원력이 거의 나타나지 않았다. 특히, 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 환원력을 보였다. 에틸아세테이트 분획물에서 가장 좋은 환원력을 보였으므로 에틸아세테이트 분획물들과 표준물질인 tocopherol과 BHT의 환원력을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 블루베리의 에틸아세테이트 분획물이 표준물질인 tocopherol과 BHT보다 환원력이 좋게 나타났다. 이러한 결과는 전자공여능에서 보여준 결과와 매우 잘 일치한다. 따라서 블루베리의 에틸아세테이트 분획물에 생리활성 물질이 함유되어 있으리라 생각된다.

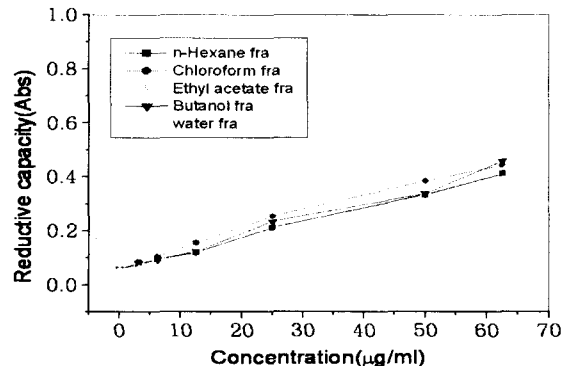


Fig. 4. Antioxidant activity of solvent fractions obtained from blueberry in FRAP assay

4. Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase는 tyrosine으로부터 3,4-dihydroxy phenylalanine (DOPA)와 DOPA quinone를 거쳐 최종적으로 흑갈색의 멜라닌 색소 형성에 관여하는 효소이며, 야채나 과일류 특히 감자의 갈변 현상을 일으키는 효소이다. 또한 피부에 암갈색의 색소물질을 침착시키는 원인이 되기도 한다. 즉 기질인 tyrosine을 효소인 tyrosinase가 산화시켜서 최종 산화 생성물인 멜라닌을 만드는 반응으로써 tyrosinase의 활성을 억제시키는 것은 산화를 방지하는 것으로 항산화 활성을 의미하게 된다. 활성을 억제시키는 물질은 항산화제로보고 tyrosinase 저해활성 측정법을 항산화활성 측정에 널리 이용되고 있다.²²⁾ 블루베리 추출물 및 분획물의 항산화활성을 tyrosinase 저해 활성 측정법을 이용해 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다. Table 3에서 보는 바와 에틸아세테이트 분획물에서 가장 좋은 효소 저해 활성을 보였으며 환원력을 측정하는 FRAP 측정법의 결과와 일치하였다. 그러나 57.6%의 저해율로 표준물질로 사용한 ascorbic acid의 73.7%보다는 다소 낮은 값을 나타내었다. 그러나 더욱 분리하여 정제하면서 tyrosinase의 저해효과를 검토함으로써 보다 효과적인 tyrosinase의 저해효과를 갖는 새로운 기능성 식품 또는 tyrosinase에 의해 발생하는 식품의 갈변현상을 막기 위한 천연 효소저해제의 개발이 가능하리라 본다.

Table 3. Tyrosinase inhibitory activities of the solvent fractions and methanol extract obtained from blueberry

Extract and Fractions	Inhibitory activity (%)
MeOH extract	39.67 ± 2.46
n-Hexane fraction	34.73 ± 2.51
Chloroform fraction	27.40 ± 1.98
Ethyl acetate fraction	45.87 ± 2.96
BuOH fraction	26.94 ± 2.02
Water fraction	30.55 ± 3.47
Ascorbic acid	73.79 ± 4.34

결 론

블루베리의 메탄올 추출물과 분획물의 시료를 전자 공여능, 환원전위법과 tyrosinase 저해 활성을 중심으로 항산화 활성에 대한 효과를 연구한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. DPPH법에 의한 전자공여능 측정에서 에틸아세테이트 분획물이 좋은 활성을 보였으며 표준물질인 ascorbic acid보다 약간 좋은 효과를 보였다. FRAP법에 의한 환원력 측정에서 에틸아세테이트 분획물이 ascorbic acid보다 좋은 활성을 보였다. Tyrosinase를 이용한 산화효소 저해율을 측정하는 실험에서도 마찬가지로 에틸아세테이트 분획물에서 좋은 저해작용을 보였으나 ascorbic acid보다는 저해율이 다소 낮았다. 이상의 결과를 종합해 보면 블루베리의 ethyl acetate 분획물이 전자공여능, 환원력, 효소활성 저해율 모두에서 효과를 보여 ethyl acetate 분획물에 항산화 활성 물질이 존재하리라 예상되어진다.

감사의 글

이 연구는 원광대학교 2003년도 교내 연구비로 수행되었으

며, 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Aniya, Y. and Naito, A. : Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathion-S-transferase in isolated rat liver, *Biochem. Pharm.* 45: 37-43, 1993.
- Plastow, S. R., Lovell, C. R. and Young, A. R. : UVB-induced collagen changes in the skin of the hairless albinomouse, *J. Invest. Dermatol.* 88: 145-148, 1987.
- Branen, A. L. : Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 52: 59-62, 1972.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. : Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol*, 186: 1-85. 1990.
- Kasuga, A., Aoyagi, Y. and Sugahara, T. : Antioxidants activities of edible plants. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish*, 35: 852-856. 1988.
- Cha, Y. J. and Cho, Y. S. : Antioxidative activity of extracts from fruit of *Cudrania tricuspidata*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 547-551, 2001.
- Kang, M. H. et al. : Antioxidative activity of ethanol extract prepared from leaves, seed, branch and aerial part of *Crotalaria tsessiflora* L. *Kor. J. Food Sci. Tech.* 30: 547-551, 2002.
- Xing, Q., Kadota, S. Tadota, T. and Namba, T. : Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*, *Biol. Pharm. Bull.* 19: 1580-1585, 1996.
- Chun, H. J., Kim, I. K. and Woo, W. H. : Inhibitory effects on retinoic acid and melanization of B16 melanoma cell by *Epimedium koreanum* Nakai and a-MSH. *J. Kor. Chem. Soc.* 44: 533-537, 2000.
- Chun, H. J., Hwang, S. G., Lee, J. S., Baek, S. H., Jeon, B. H. and Woo, W. H. : Inhibitory effect of butyl alcohol extract from *Caesalpinia sappan* L. on melanogenesis in melan-a cells *Kor. J. Pharmacogn.* 33: 130-136, 2002.
- Zheng, W. and Wang, S. Y. : Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and ligoberries, *J. Agris. Food Chem.* 51(2): 502-509, 2003.
- Joseph, J. A., Denisova, N. A., Bielinski, D., Fisher, D. R. and Shukitt-Hale, B. : Oxidative stress protection and vulnerability in aging : Putative nutritional implications for intervention. *Mechanism of aging and Development* 116: 141-153, 2000.
- Sellappan, S., Akoh, C. C. and Krewer, G. : Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown

- blueberries and blackberries, *J. Agric. Food Chem.* 50: 2432-2438, 2002.
14. Howell, A. B. : Cranberry proanthocyanidines and the maintenance of urinary tract health, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42: 273-278, 2002.
 15. Connor, A. M., Luby, J. J., Hancock, J. F., Berkeimer, S. and Hanson, E. J. : Changes in fruit antioxidant among blueberry cultivars during cold-temperature storage, *J. Agric. Food Chem.* 50(4): 893-898, 2002.
 16. Kalt, W., Ryan, D. A. J., Duy, J. C., Prior, R. L., Ehlenfeldt, M. K. and Kloet, S. P. V. : Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries, *J. Agric. Food Chem.* 49: 4761-4767, 2001.
 17. Wang, S. Y. and Jiao, H. : Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxy radicals and singlet oxygen, *J. Agric. Food Chem.* 48(11): 5677-5684, 2000.
 18. Mcghee, T. K., Ainge, G. D., Barnett, L. E., Cooney, J. M. and Jensen, D. J. : Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats, *J. Agric. Food Chem.* 51: 4539-4548, 2003.
 19. Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Ushara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. : Studies on inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. *Chem. Pharm. Bull.* 37(7): 1919-1923, 1989.
 20. Oyaizu, M. : Studies on products of browning reaction: Antioxidative activity of products of browning reaction, *Japanese J. Nut.* 44(6): 307-312, 1986.
 21. Yun, K. A., Park, Y. J. and Bae, S. J. : Antioxidant and tyrosinase inhibitory effects of *Brassica oleracea* L. fractions, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33(1): 7-15, 2004.
 22. Hearing, V. J. : Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, *Soc. Invest. Dermatol.* 4(1): 24-27, 1999.