

저온고압 추출공정을 이용한 매자나무 수피의 항산화 및 항암활성 증진

김 영 · 하지혜 · 정명훈 · 정을권² · 정애란² · 김진철 · 안주희 · 이현용^{1*}

강원대학교 BT 특성화학부대학, ¹강원대학교 생명공학연구소, ²명진농장

Enhancement of the Antioxidant and Anticancer Activities of *Berberis koreana* Bark by Using a Low Temperature and High-Pressure Extraction Process

Ling Jin, Ji Hye Ha, Myoung Hoon Jeong, Eul Kwon Chung², Ae Ran Chung²,
Jin Chul Kim, Ju Hee Ahn, and Hyeon Yong Lee^{1*}

College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

¹Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

²Myung Jin Farm Cooperation

Abstract This study was conducted to characterize the enhanced antioxidant and anticancer activities of *Berberis koreana* bark following a low temperature and high pressure extraction process. The results indicate that the *B. koreana* bark extracted as described showed a 93% increase in DPPH radical scavenging activity. Inhibition activity of xanthine oxidase was highest by this extraction process. In addition the growth of human lung cancer cells (A549), human stomach cancer cells (AGS), human breast cancer cells (MCF-7) and human liver cancer cells (Hep3B) were inhibited by 70.8%, 86.2%, 84.3% and 62.5% respectively. These data indicate that this low temperature and high pressure extraction technique results in the efficient extraction of bioactive compounds from rigid plant materials. This process could also be combined with other techniques to improve extraction yields and identify new biologically active substances from relatively hard plants.

Key words: *Berberis koreana* bark, low temperature and high-pressure extraction, antioxidant activity, anticancer activity

서 론

암은 전 세계적으로 가장 널리 퍼져있는 질병으로 해마다 많은 인구가 사망하고 있으며 암으로 인한 사망률이 전체 사망률 중에서 가장 높은 수치를 내며 암 발생률도 해마다 증가하는 추세이다(1), 암의 정확한 원인은 아직까지 밝혀지지 않았지만 산화적 스트레스가 암 유발의 주요한 원인으로 보고되어 있다. 산화작용은 생체에서 끊임없이 일어난다. 인간은 호흡에 산소를 이용하는 생물체로서 산화적 스트레스에 대한 노출은 불가피하다(2). 최근 환경오염, 농약의 남용, 흡연, 음주, 식생활에서 방부제를 비롯한 기타 식품첨가제의 과다 사용 등은 산화적 스트레스를 일으키는 원인으로, 세포막과 단백질을 분해하고 DNA 합성 억제 등의 손상이 유발하며 세포노화를 촉진시키고 암 유발인자를 자극하여 암을 초래하여 인류의 생명건강을 위협하고 있다(2,3). 암의 치료방법에 대해 많은 연구를 이루어지고 있지만 현재 많이 사용되는 암치료방법의 대부분은 방사선 및 합성 화학약품으로 강한 독성을 보여 인체에 심각한 부작용을 야기하는 것으로 보고되어 있다(4). 따라서 최근에는 부작용이 적고 항산화

및 항암활성이 높은 천연 약용작물에 대한 연구가 항암영역에서의 새로운 방안으로 대두되고 있다.

매자나무는 미나리아재비목 매자나무과의 낙엽관목으로 약효를 가지는 한국 특산종 수목종의 하나로서 학명은 *Berberis koreana*이다. 약용 한방에서 사용하고 있는 매자나무는 소염, 진통, 호흡기질환, 항암, 항결핵, 항균, 유아설사 등에 효과가 있다고 알려져 있다(5). 그러나 매자나무는 예로부터 통증 완화용 약재로 많이 사용되어 왔음에도 불구하고 현대적인 연구가 미미하여 그 효과를 입증한 결과가 전무한 실정이며 이에 대한 연구가 필요하다.

또한 매자나무는 수목자원으로 목질부의 조직이 단단하여 활성 성분의 용출과 추출 수율 면에서 한계를 가지고 있으며, 기존의 추출공법으로는 추출수율이 낮아 활성물질의 활용 극대화가 어렵고 에너지 소비가 많으며 열로 인해 많은 유용성분의 파괴, 단백질의 변성, 성분의 손실, 가용성분 위주의 추출과 열에 대하여 불안정한 것 등의 단점을 드러내고 있다(6). 저온고압 추출기술을 이용하면 상기의 문제들을 개선할 수 있을 것으로 보인다.

저온고압 처리는 최근 식품에서 영양소와 비영양성의 식물성 화합물질 섭취에 있어 가장 효율적으로 활용 될 수 있는 기술이다(7). 저온고압 기술은 식품에서 열처리가 없거나 최소 처리하여 식품을 생산 할 수 있는 방법으로서 식품의 영양성분, 맛, 향기, 비타민 함량 등의 손실을 최대한으로 줄일 수 있다. 작은 분자로 구성된 아미노산과 비타민은 저온고압에 의한 영향을 적게 받고, 거대 분자물질의 단백질, 효소, 다당류, 핵산 등은 형태적 및 구조적 변화가 유발되기 때문이다(8).

저온고압 기술을 약용식물의 유용 성분을 추출하는데 적용할 수 있는데, 그에 목적을 두고 사용하는 것을 저온고압 추출이라

*Corresponding author: Hyeon Yong Lee, College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Korea
Tel: 82-33-250-6455
Fax: 82-33-256-4819
E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr
Received February 24, 2009; revised May 6, 2009;
accepted May 7, 2009

고 한다. 저온고압 기술은 약용식물의 중요 구성 성분의 추출이 단시간 내에 가능하며, 불순물이 거의 없고, 높은 순도의 단일 성분을 쉽게 얻을 수 있다. 그것은 저온고압 하에서 단백질의 변성되거나, 세포막이 비가역적으로 분해되어 막 투과성이 증가됨에 따라 물질 이동이 용이하게 되어 용매가 세포 안으로 들어가 보다 많은 성분이 세포 밖으로 쉽게 용출되어 나오는 것으로 추정하고 있다. 또한 저온고압 추출을 통하여 에너지 수준이 제한된 수소결합, 전기적 결합, 반데르발스 결합과 같은 약한 결합들에 의한 결합은 분리되어 신물질의 용출이 가능한 것으로 보인다(8,9).

따라서 본 연구에서는 저온고압 추출공정을 이용하여 전통적인 기존 추출공정과 비교함으로써 저온고압 추출공정에 따른 매자나무 수피의 항산화 및 항암활성 증진을 확인하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 매자나무는 경기도에 분포하는 한국 특산종인 *Berberis koreana*로써 2007년, 국립산림과학원 광릉시험림으로부터 묘목을 지원받아 사용하였다.

시약

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 alpha minimum essential medium(α -MEM)은 Gibco(Carlsbad, CA, USA)사로부터 구입하였고, Hepes buffer는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 혈청은 Gibco사의 fetal bovine serum(FBS)과 horse serum을 이용하였고 gentamycin sulfate, trypsin-EDTA는 Sigma사의 것을 사용하였다. 세포염색을 위한 SRB(sulforhodamine B)는 Sigma사로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

추출조건

저온고압 추출은 매자나무 시료 100 g을 진공포장한 후, 고압 추출장치(Ishin autoclave, Yangju, Korea)를 이용하여 5,000 bar 압력으로 25°C에서 각각 5분과 15분간 저온고압 추출을 실행하였다. 저온고압 추출이 끝난 매자나무 시료는 수직환류냉각기가 부착된 추출 플라스크에 각각 10배의 증류수를 사용하여 60°C에서 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 대조군으로 사용된 추출 방법은 통상적인 열수 추출공정으로 100 g의 매자나무 시료를 수직환류냉각기가 부착된 추출 flask에 각각 10배의 증류수를 사용하여 100°C에서 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물을 감압여과한 후 여액을 회전증발기(rotary vacuum evaporator N-N series, Eyela, Tokyo, Japan)로 감압농축하고 다시 농축액을 동결건조하여 분말 상태의 추출물을 실험에 사용하였다.

DPPH radical에 대한 전자공여능 측정

추출물의 전자공여작용(electron donating abilities, EDA)은 각각의 추출물에 대한 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)의 전자공여 효과(10)를 측정함으로써 각 시료의 환원력을 측정하였다. 1 mg/mL의 농도로 조절된 각 시료 10 μ L와 에탄올 1 mL, 100 mM sodium acetate buffer(pH 5.5) 990 μ L를 분주한 시험관에 0.5 mM DPPH 용액(Abs. EtOH soln.) 0.5 mL를 넣어 교반하고 암실에서 30분간 반응을 유도한 후, 잔존 radical의 농도를 UV spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 측정하였다. 대조군은 50 μ M ascorbic acid를 사용하여 실험군과 비교하였다.

$$EDA(\%) = (1 - \frac{As}{Ac}) \times 100$$

As: 실험군(추출물 첨가)의 흡광도

Ac: 대조군(추출물 무첨가)의 흡광도

Xanthine oxidase 저해 활성

매자나무 시료의 항산화 활성 측정을 위해 xanthine oxidase 저해활성(11)을 측정하였다. 1 mg/mL의 농도로 조절된 각 시료 1 mL에 40 mU의 xanthine oxidase 0.1 mL 및 0.07 M phosphate buffer(pH 7.5) 2.9 mL를 가하여 25°C에서 15분간 예열 시켰다. 여기에 0.15 mM xanthine 2 mL를 가하고, 다시 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후 290 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 allopurinol 30 μ M을 이용하여 비교하였다.

Inhibition ratio of xanthine oxidase (%) =

$$(1 - (\text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{시료 무첨가구의 흡광도})) \times 100$$

세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용한 세포주는 암세포주로 인간 폐암세포주인 A549(Lung carcinoma, Human), 인간 위암세포주인 AGS(Stomach adenocarcinoma, Human), 인간 유방암세포주인 MCF-7(Breast adenocarcinoma, Human), 간암세포주인 Hep3B(Hepatocellular carcinoma, Human)를 사용하였고, 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상세포는 인간 신장세포인 HEK293을 사용하였다. 세포 배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 alpha minimum essential medium(α -MEM)은 Gibco사로부터 구입하였고, Hepes buffer는 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. 혈청은 Gibco사의 fetal bovine serum과 horse serum을 이용하였고 gentamycin sulfate와 trypsin-EDTA는 Sigma사의 것을 사용하였다. 세포염색을 위한 sulforhodamine B(SRB)는 Sigma사로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

정상세포 독성 및 항암활성 측정

매자나무 추출물의 정상세포에 대한 독성을 알아보기 위해 인간 신장세포인 HEK293를 사용하였고 항암활성을 알아보기 위해 인간 폐암세포인 A549, 인간 유방암세포인 MCF-7, 인간 위암세포인 AGS, 인간 간암세포인 Hep3B를 사용하였으며 sulforhodamine B(SRB) assay(12)방법을 이용하여 세포독성과 항암활성을 측정하였다. SRB assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 HEK293, A549, AGS, MCF-7, Hep3B(in 10% FBS media)의 농도를 4.5×10^4 cell/mL로 96 well plate의 각 well에 100 μ L씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL로 100 μ L씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10%(w/v) TCA(Trichloroacetic acid) 100 μ L를 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 4-5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액을 100 μ L씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 잔여 염색액의 제거를 위하여 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4-5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 μ L를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader (THERMO max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Selectivity는 SRB assay를 이용하여

각각의 시료 농도에서 정상세포에 대한 세포독성 및 각 암 세포주에 대한 생육 억제 활성을 측정 한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 계산하였다(13).

$$\text{Selectivity} = \frac{\text{암세포 생육억제활성}}{\text{정상세포의 세포독성}}$$

각 추출공정을 통한 매자나무의 Scanning Electron Microscope(SEM) 관찰

추출수를 증진 및 활성의 증진 효과를 나타내는 추출물의 특성을 알아보기 위하여 각 추출공정 처리 후 매자나무 시료를 저진공주사전자현미경(Low Vacuum-Scanning Electron Microscope, $\times 400$)으로 구조와 모양을 관찰하였다. 각 매자나무 시료의 조직을 수직 및 수평으로 절단하여 고진공증착기(Polaron SC502 sputter coater)에서 gold coating한 후 저진공주사현미경(Hitachi Science Systems, S-3500N, Tokyo, Japan)을 이용하여 각각의 시료를 단면 확대하여 관찰하였다(20).

HPLC분석

각 추출공정을 통해 매자나무 추출물의 성분차이를 알아보기 위하여 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC; High-Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 상호 비교 분석했다.

HPLC 기기는 BIO-TEK instrument(Italy)사 HPLC 500 series의 BIO-TEK 522 controller Pump와 BIO-TEK HPLC 535 UV Detector(254 nm)를 사용하였고, column은 Alltech사의 Prevail C18 ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 250 \text{ mm}$)을 사용하였다. 공정에 따른 매자나무 추출물의 성분분석을 위해 시료를 HPLC 분석용 water에 녹여 $0.2 \mu\text{m}$ syringe filter로 여과하고 각각 1 mg/mL 의 농도로 조제하여 Injection volume $20 \mu\text{L}$ 로 측정하였다. 이동상은 물과 메탄올(40:60, v/v)의 혼합용액을 사용하였고 유속은 0.8 mL/min 로 흘려주었다(17).

통계분석

SPSS program(ver. 12.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)의 t-test로 검정하였으며 모든 data는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

추출공정에 따른 추출물의 추출수율

Table 1에 매자나무 수피 추출물의 추출조건별 수율을 나타냈다. 추출 수율 측정을 통해 저온고압 공정을 통한 매자나무 추출물이 일반 추출공정을 통한 추출물에 비해 약 1.3배 수율이 향상됨을 확인하였다(Fig. 7). 초고압 공정을 통한 복분자의 면역활성(19)에 관한 연구에서 추출 수율이 초고압 5분, 15분 처리 추출물의 수율이 일반 열수 추출에 비해 각각 약 1.8, 1.9배까지 증가하였다고 보고되어 있는 바 이는 고압 공정을 통해 조직 및 세포벽의 변형 및 파괴로 조직과 세포내의 활성 성분이 대량으로 용출되며 기존의 추출 방법으로 용출이 어려웠던 성분의 용출이 가능해졌기 때문으로 사료되며, 특히 본 논문에 해당하는 목질계 시료의 활성성분 용출에 걸림돌로 작용하였던 목질계의 단단한 조직을 느슨하게 함으로써 수율 증진에 기여하였음을 알 수 있다. 저온고압 추출물 중 5분 저온고압 처리 한 매자나무 추출수율이 11.41%로 가장 높은 수율을 나타내었으며 15분 저온고압 처리한 매자나무 추출수율도 11.04%를 나타내며 큰 차이를 나타내지 않았다. 상기 결과를 통해 저온고압 추출공정이 매자나무 추출 수율 증가에 기여하였으며 5분 공정이 가장 효율적이라 사료된다.

Table 1. Comparison of the extraction yield from *B. koreana* bark according to different extraction processes

Sample	Solvent	Temp.	High Pressure	Yield (% w/w)
WE*		100°C	-	8.39 \pm 0.21
HPE5 [†]	water	60°C	5 min	11.41 \pm 0.42
HPE15 [‡]			15 min	11.04 \pm 0.18

※ Each value were compared with control at $p < 0.05$ by student t-test.
*water extraction at 100°C.

[†]high-pressure extraction for 5 minute at 60°C with water.

[‡]high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water.

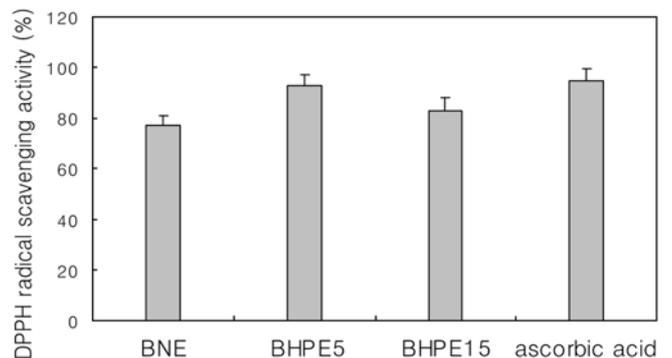


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of *B. koreana* bark according to different extraction processes. (BNE, *B. koreana* bark extracts by normal extraction at 100°C with water; BHPE5, *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 5 minute at 60°C with water; BHPE15, *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water.) Each value were compared with control at $p < 0.05$ by student t-test. Mean values \pm standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

DPPH radical에 대한 전자공여능

전자공여능 측정에 사용된 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)는 안정한 자유 라디칼로서 전자나 수소를 받아 비가역적으로 안정한 분자를 형성하여 환원됨에 따라, 흡광도가 감소하게 된다. 각 추출물에서 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대하여 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있다(2,14). 추출공정에 따른 매자나무 수용성 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하여 비교한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 1 mg/mL 의 농도로 조절된 매자나무 각 추출물의 DPPH radical 소거 활성은 일반 열수추출물, 저온고압 15분 처리한 추출물, 저온고압 5분 처리한 추출물의 순으로 증가되었으며 일반 열수추출물에 비교했을 때 저온고압 추출물의 DPPH radical 소거 활성은 5% 이상 증가 되었으며 특히 5분 저온고압 처리한 추출물이 93%의 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 저온고압 추출공정을 통해 매자나무 세포 및 조직의 파괴로 인한 활성 물질의 용출이 증가되었으며 또한 15분 이상의 저온고압 처리가 활성 물질의 변성 및 파괴에 효과적으로 기여하는 것으로 사료된다.

약용식물의 항산화 활성을 측정(15) 연구에서 1 mg/mL 농도의 오가피, 음약팍 및 산수유 추출물이 약 70-77%의 라디칼 소거능을 나타낸 것과 비교하여 본 실험 결과에서 매자나무의 각 추출물이 77% 이상의 양호한 전자 공여능을 나타냄으로써 매자나무 수피의 높은 항산화 활성을 확인할 수 있다.

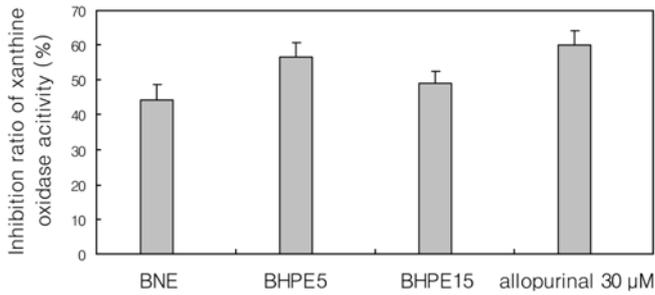


Fig. 2. Comparison of inhibition ratio of the xanthine oxidase activity by *B. koreana* bark according to different extraction processes. (BNE, *B. koreana* bark extracts by normal extraction at 100°C with water; BHPE5, *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 5 minute at 60°C with water; BHPE15, *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water.) Each value were compared with control at $p < 0.05$ by student t-test. Mean values±standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

Xanthine oxidase 저해 활성

생체내의 유리기 생성계의 하나인 xanthine oxidase는 xanthine을 기질로 하여 uric acid를 생성 하는 효소이다. 주로 purine체의 대사산물인 hypoxanthine을 xanthine으로, xanthine을 다시 산화시켜 uric acid를 생산하는 반응의 촉매로 작용한다(16). Xanthine oxidase를 저해하게 되면 free radical의 생성이 억제되어 항산화, 항노화 및 항암 등의 효과를 기대할 수 있다. 매자나무 추출물의 xanthine oxidase 활성 저해율을 측정하여 Fig. 2에 나타냈다. 결과에서 확인할 수 있듯이 1 mg/mL로 조절한 매자나무의 각 추출물의 Xanthine oxidase 저해 활성은 44%의 활성을 나타낸 일반 열수 추출물보다 저온고압 추출물에서 더 높은 활성을 나타내었으며 60°C에서 고압을 5분간 처리한 저온고압 추출물에서 56.68%의 가장 높은 활성을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해 저온고압 추출이 활성성분의 용출 극대화로 인한 매자나무의 항산화 활성 증진에 기여를 하는 동시에 15분 이상의 저온 고압 처리가 항산화 활성 성분의 파괴 및 변성을 야기하여 활성 감소에 영향을 준다는 것을 알 수 있다. 또한 초고압 시스템의 적용에 관한 연구(21)에서는 통상적으로 약용작물들의 활성 성분 용

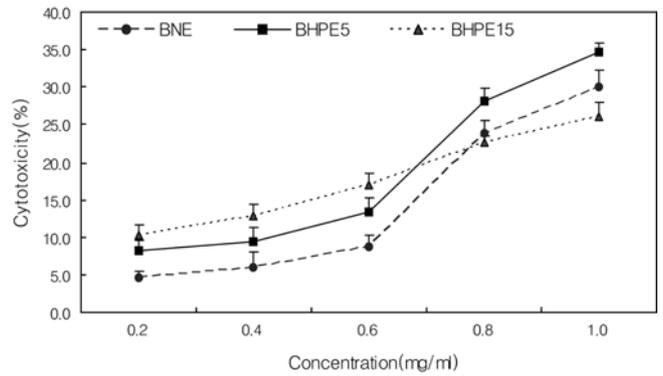


Fig. 3. Cytotoxicity of *B. koreana* bark on human normal cell line, HEK293. (BNE, *B. koreana* bark extracts by normal extraction at 100°C with water; BHPE5, *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 5 minute at 60°C with water; BHPE15, *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water.) Each value were compared with control at $p < 0.05$ by student t-test. Mean values±standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

출을 목적으로 하기 위해 15분 이내의 초고압 추출 시간을 사용하는 것으로 보고되어 있다.

상기 연구 결과와 같이 매자나무의 높은 항산화 활성이 암 유발 원인으로 알려진 산화적 스트레스의 감소에 기여함으로써 향후 매자나무의 기능성 식품, 약품, 및 항장 소재로서의 활용을 기대할 수 있다.

정상세포 독성 측정 및 항암활성

실험에 사용된 매자나무 시료들을 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL 농도로 조절하여 인간 정상 신장 세포인 HEK293에 대한 세포독성을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 각각의 매자나무 추출물에서 농도 의존적으로 세포독성이 증가하였으며, 최고 농도인 1.0 mg/mL에서 5분 저온고압 처리한 추출물이 34.6%로 가장 높은 독성을 나타냈고, 15분 저온고압 처리한 추출물이 26.1%로 제일 낮은 세포독성을 나타냈다. 이는 5분 저온고압 처리할 때 매자나무의 활성물질의 용출이 증가되며 동시에 독성을 나타내

Table 2. Inhibition ratio of growth A549, Hep3B and selectivity of *B. koreana* bark according to different extraction processes

		Concentration (mg/mL)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
A549	WE*	Inhibition ratio	27.6±1.2 ^c	42.3±2.7	46.9±1.9 ^a	52.1±3.4 ^b	58.2±3.7 ^a
		Selectivity	6.0	7.0	5.4	2.2	1.9
	HPE5 [†]	Inhibition ratio	47.5±1.5	56±2.6 ^a	63.5±3.4 ^c	68±3.9 ^b	70.8±3.1
		Selectivity	5.8	5.9	4.8	2.4	2.0
	HPE15 [‡]	Inhibition ratio	45.7±1.1 ^a	49.7±2.3	54.5±3 ^b	55.9±3.4 ^c	60.4±3.5
		Selectivity	4.5	3.4	3.2	2.5	2.3
Hep3B	WE*	Inhibition ratio	41.1±1.1 ^c	43.6±2.6	49.8±2.9 ^b	51.2±3.2 ^c	54.6±3.4 ^c
		Selectivity	9.0	7.4	5.7	2.4	1.8
	HPE5 [†]	Inhibition ratio	52.1±1.2 ^b	55.6±3.4 ^c	57.2±3.1	59±2.3 ^a	62.5±3.7 ^c
		Selectivity	6.3	5.8	4.3	2.1	1.8
	HPE15 [‡]	Inhibition ratio	49.2±0.9	54.2±2.4 ^a	55.4±2.6 ^b	56.1±3.8 ^c	58.8±3.3 ^c
		Selectivity	4.8	4.2	3.2	2.5	2.3

※ Value are expressed as mean±SDM for data obtained from three independent experiments. ^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.005$, ^c $p < 0.01$ vs. control.

*water extraction at 100°C.

[†]high-pressure extraction for 5 minute at 60°C with water.

[‡]high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water.

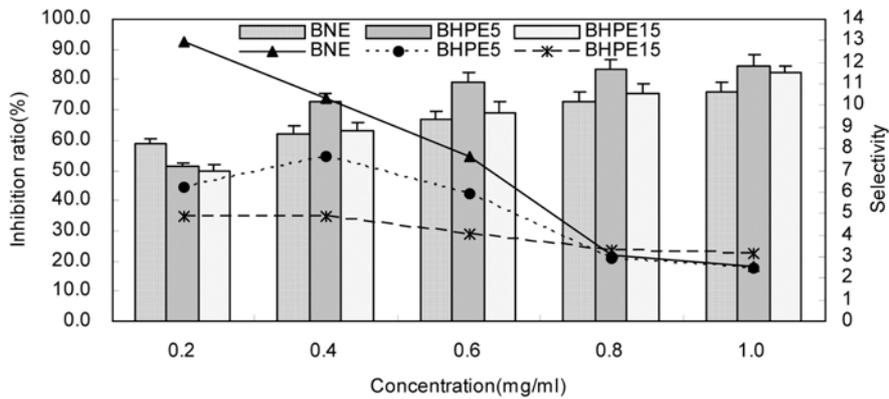


Fig. 4. Inhibition ratio of the growth of MCF-7 (bar chart, %) and selectivity (line chart) by adding the crude extracts of *B. koreana* bark. (BNE, *B. koreana* bark extracts by normal extraction at 100°C with water; BHPE5, *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 5 minute at 60°C with water; BHPE15, *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water.) Each value were compared with control at $p < 0.05$ by student t-test. Mean values \pm standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

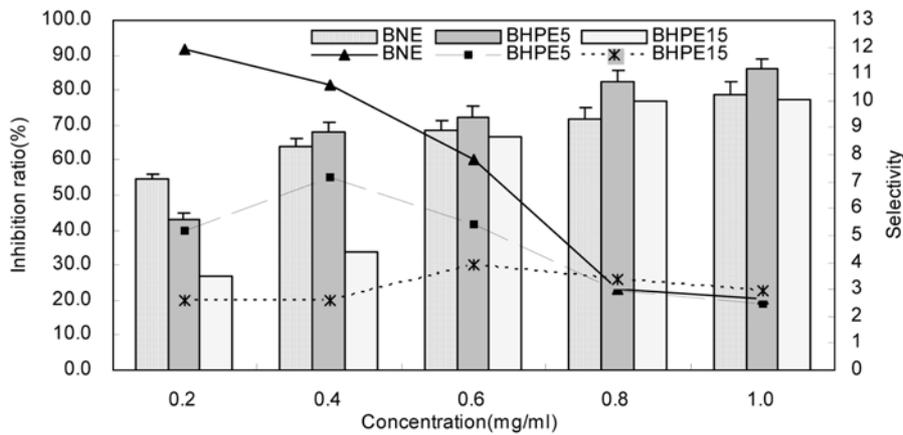


Fig. 5. Inhibition ratio of the growth of AGS (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the crude extracts of *B. koreana* bark. (BNE, *B. koreana* bark extracts by normal extraction at 100°C with water; BHPE5, *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 5 minute at 60°C with water; BHPE15, *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water.) Each value were compared with control at $p < 0.05$ by student t-test. Mean values \pm standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

는 물질 또한 용출되어 추출물의 독성이 상승된 것으로 사료된다. 또한 저온고압 처리 시간이 길어짐에 따라 독성물질의 구조의 파괴 및 변형이 이루어져 독성저감 효과를 가져 온 것으로 사료된다. 매자나무의 항암효과를 알아보고자 인간 폐암세포인 A549, 인간 유방암세포인 MCF-7, 인간 위암세포인 AGS, 인간 간암세포인 Hep3B를 사용하여 측정하였다. Table 2는 인간 폐암세포 A549, 간암세포인 Hep3B에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 매자나무 모든 시료에서 A549, Hep3B세포에 대한 생육억제율이 농도 의존적으로 증가된 것으로 나타났으며 최고 농도 1.0 mg/mL에서 5분 저온고압 추출물의 A549, Hep3B세포에 대한 생육 억제율이 각각 70.8, 58.8%로 가장 높았다. 이는 고압로 인해 매자나무 시료의 조직, 세포벽 및 세포벽의 파괴로 활성물질의 용출이 증가된 결과로 사료된다. A549, Hep3B세포에 대한 선택적 사멸도는 1.0 mg/mL 농도에서 15분 저온고압 추출물이 2.3로 가장 높았다. 이는 저온고압 처리 시간이 연장되어 독성물질이 파괴로 독성저감 효과가 나타낸 결과로 사료된다.

Fig. 4는 인간 유방암세포인 MCF-7에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 모든 추출물에서 농도 의존적으로 암세포 생육 억제율이 증가하는 것으로 나타났으며 최고 농

도 1.0 mg/mL에서 5분 저온고압 처리한 추출물의 암세포 억제율이 84.3%로 가장 높았다. 반면 저온고압 처리를 하지 않는 일반 열수 추출물은 75.8%로 가장 낮은 억제 활성을 나타냈다. 농도 1.0 mg/mL에서 매자나무 추출물 모두 2.5를 넘는 양호한 선택적 사멸도를 나타내었다.

Fig. 5는 인간 간암세포인 Hep3B에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 모든 추출물에서 농도 의존적으로 암세포 생육 억제율이 증가하는 것으로 나타났으며 최고 농도 1.0 mg/mL에서 5분 저온고압 처리한 추출물의 암세포 억제율이 일반 열수 추출물보다 7.6% 향상 되었다. 1.0 mg/mL에서 매자나무 추출물 모두 2.5를 넘는 양호한 선택적 사멸도를 나타내었다.

Fig. 6은 매자나무 추출물의 동일 농도에서의 A549, MCF-7, AGS, Hep3B에 대한 억제율을 비교하여 나타낸 것이다. 전체적으로 저온고압 추출을 통한 추출물이 일반 열수 추출물에 비해 높은 항암활성을 나타내었으며, 인간 유래 암세포주인 A549, MCF-7, AGS, Hep3B에 대해 5분 저온고압 추출을 통한 매자나무 추출물이 각각 70.8, 84.3, 86.2, 62.5%의 세포 생육 저해율을 나타내며 가장 높은 항암 활성을 나타내었다. 특히 매자나무 추출물이 인간 위암세포 AGS, 인간 유방암세포 MCF-7에 대한 높은 억제 활성을 나타내는 것으로 미루어 보아 향후 특정 암에 대한 기능성 식

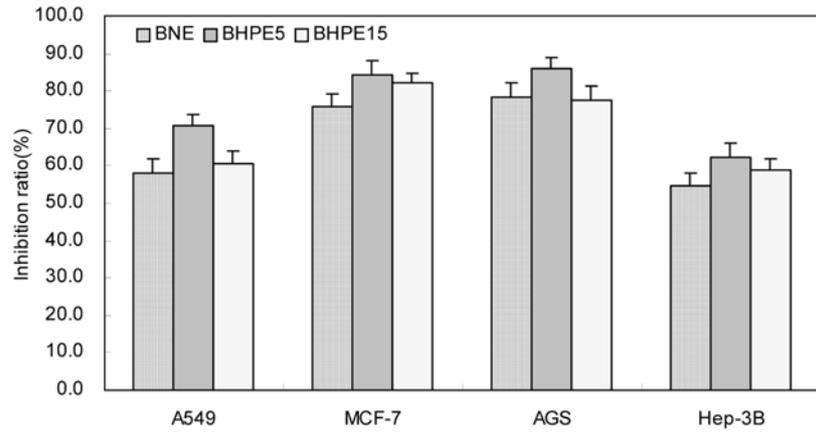


Fig. 6. Inhibition ratio of *B. koreana* bark on human cancer cell lines. (BNE, *B. koreana* bark extracts by normal extraction at 100°C with water; BHPE5, *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 5 minute at 60°C with water; BHPE15, *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water.) Each value was compared with control at $p < 0.05$ by student t-test. Mean values \pm standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

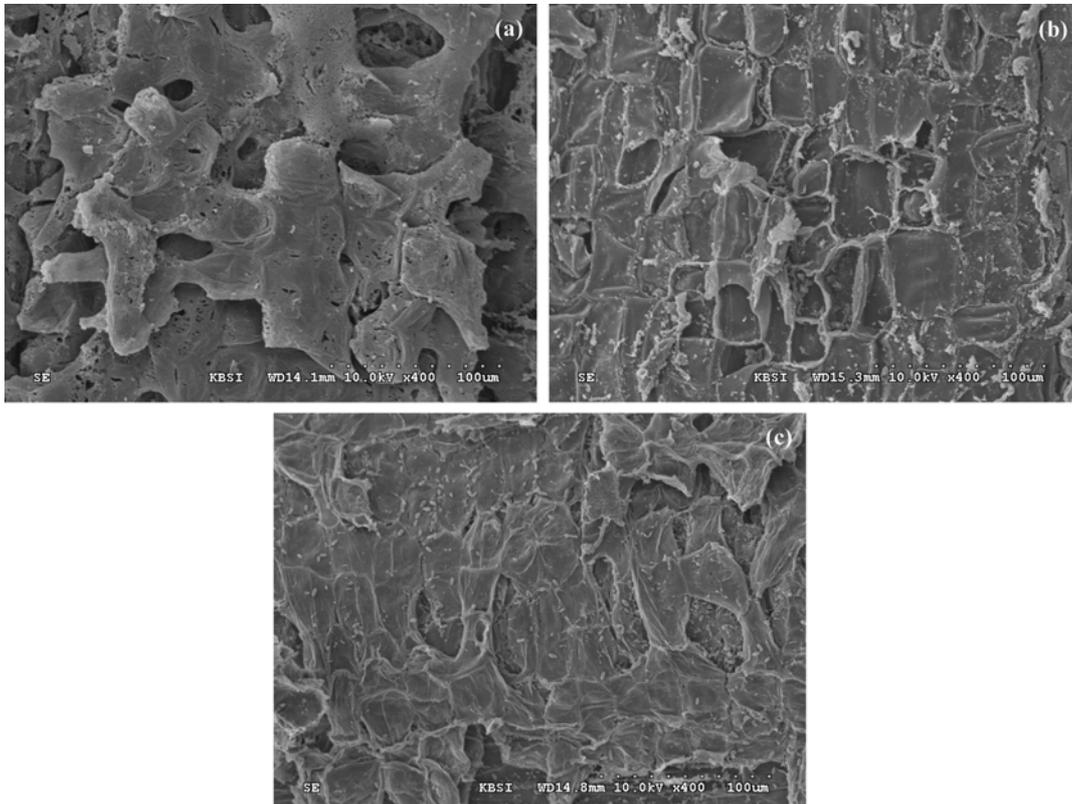


Fig. 7. Morphology of *B. koreana* bark observed by SEM. (a), *B. koreana* bark by normal extraction at 100°C with water; (b), *B. koreana* bark by high-pressure extraction for 5 minute at 60°C with water; (c), *B. koreana* bark by Ultrasonification process after high-pressure extraction for 5 minute at 60°C with water.

품 및 의약품 소재로서의 이용을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

추출공정을 따른 매자나무 시료의 주사전자현미경(SEM)을 통해 관찰한 추출공정에 따른 매자나무 시료의 조직은 Fig. 7에 나타났다. 결과를 통해 (a) 일반 100°C 수피 시료의 조직이 아직 크게 남아 있는 반면 저온고압을 5분 처리한 수피 시료는 작은 절편으로 조각나 있음을 확인할 수 있다. 기존의 연구(18)에서 초고압 저온 추출을 통한 매자나무 수피의 표면이 손상 및 변형되어 매자나무 세포독성 저감 및 면역 활성 증진에 기여한 사례가 있는 바 본 매자나무 SEM 촬영 결과를 통해 저온고압 추출이

매자나무의 내부 조직까지 영향을 주어 세포벽이 깨어지면서 조직 및 구조가 변화한 것으로 이를 통해 수율 및 활성 성분의 용출 증가와 세포독성 저감 및 항암활성 증가가 이루어진 것으로 사료된다. 특히 저온고압 처리 후 초음파 공정을 병행한 (c)의 매자나무 시료는 완전히 분쇄되어 절편의 크기가 균일하고 망상 구조만 남아 있는 것을 확인할 수 있는데 이는 저온고압으로 잘라진 세포벽 및 식물 조직이 초음파의 진동으로 고르게 분쇄되고 기본 구조만을 유지한 상태로 생각되며 이를 통해 저온고압의 효율이 증진되는 것으로 사료된다.

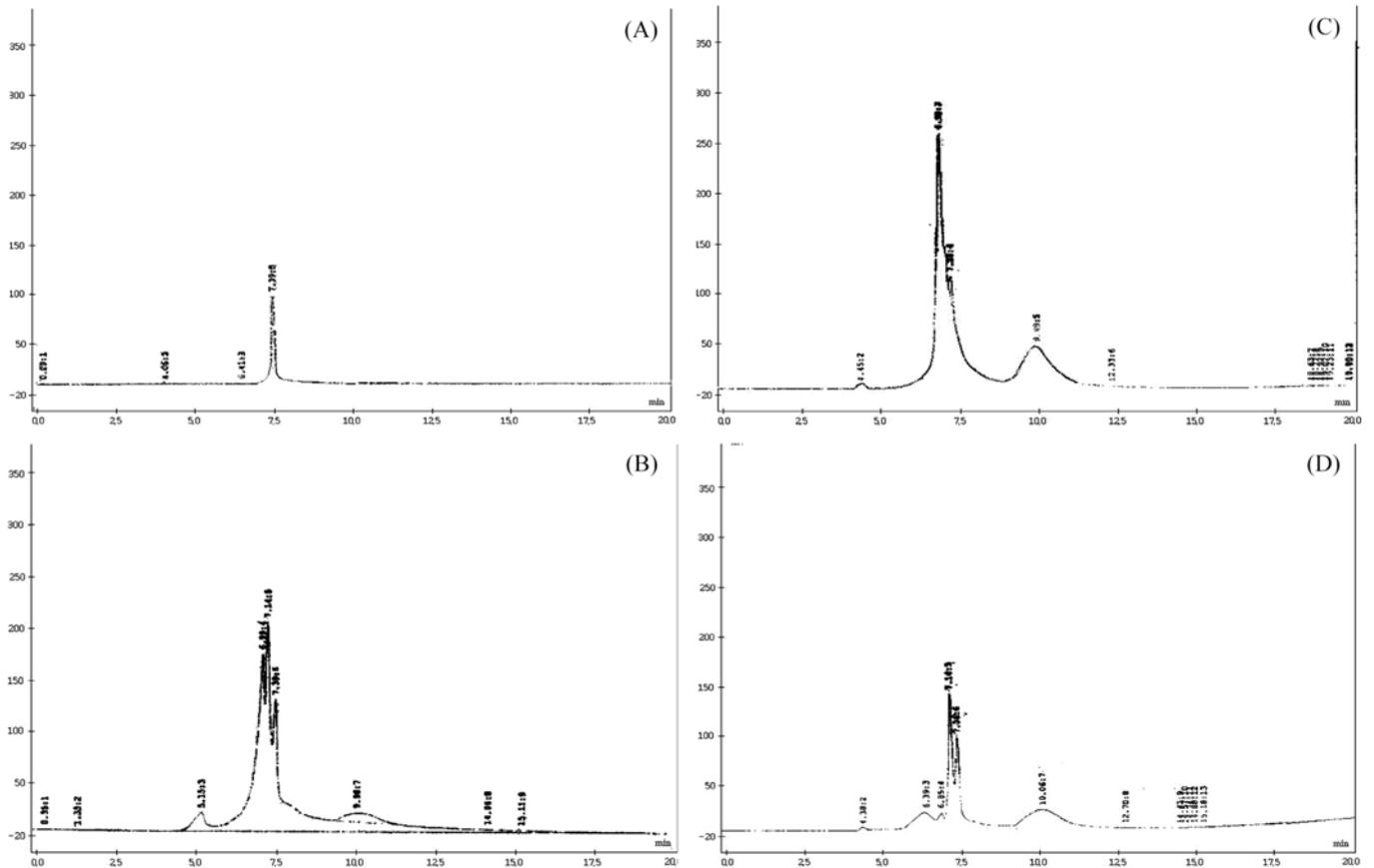


Fig. 8. Comparison of peak of *B. koreana* bark according to different extraction processes using HPLC. (A), standard, berberine of *B. koreana*; (B), *B. koreana* bark extracts by normal extraction at 100°C with water; (C), *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 5 minute at 60°C with water; (D), *B. koreana* bark extracts by high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water.

HPLC분석

Fig 8는 매자나무 각 시료를 HPLC를 사용하여 매자나무 유용 활성성분의 용출 경향을 비교한 결과를 나타낸 것이다. HPLC 결과를 분석해 보면 매자나무 모든 추출물이 5.0과 12.0분 사이에서 주요 peak를 나타낸 것으로 확인 할 수 있다. (A)에서 매자나무의 주요 활성성분인 berberine 성분이 7.5분에 생성되었다는 것을 확인할 수 있고 (B), (C), (D)와 비교해 볼 때 berberine 성분의 함유 변화가 크게 나타나지 않았으며 7분 근처에서 나타낸 peak(C)가 가장 높았고, 다음으로는 (B), (D)의 peak가 제일 낮은 것으로 나타내었다. 또한 10분에 나타낸 peak를 비교해 볼 때 (C)>(D)>(B) 순서로 나타내었다. 7분, 또는 10분 근처에 생성된 성분이 매자나무 활성증진 효과를 나타내거나 또는 매자나무의 독성을 나타내는 활성 성분일 것으로 사료된다. 이러한 결과를 통해 저온고압 추출이 내부 조직에 영향을 주어 활성 성분의 용출을 용이하게 하였음을 알 수 있으며, 또한 상기의 15분 저온고압 추출물이 가장 낮은 세포독성을 나타낸 결과와 5분과 15분 저온고압 처리물의 peak 분석결과를 미루어 보아 장시간의 저온고압 추출이 매자나무 독성 물질의 파괴나 변성을 야기하여 독성 저감에도 영향을 주는 것으로 사료된다. 따라서 본 연구를 통해 저온고압 추출이 활성 증진 및 독성 저감에 효과가 있음을 확인하였으며 더 나아가 저온고압 추출 공정의 최적화를 통해 활성물질 추출 및 활성 증진의 극대화를 통한 매자나무의 기능성 소재화가 가능할 것이라 사료된다.

요 약

본 연구에서는 저온고압 추출공정을 이용하여 전통적인 기존 추출공정과 비교함으로써 저온고압 추출공정에 의한 매자나무 수피의 항산화활성과 항암활성의 증진을 확인하고자 연구를 수행하였다. DPPH radical 소거 활성은 5분 저온고압 처리한 추출물이 93%로 가장 높은 활성을 나타내며 대조군인 ascorbic acid의 95%와 유사한 활성을 나타내었다. 저온고압 추출공정을 통한 매자나무 추출물이 일반 열수 추출물과 비교해 xanthine oxidase 저해활성이 높게 나타났으며 특히 5분 저온고압 처리한 추출물이 56.68%의 높은 저해 활성을 나타냈다. 따라서 저온고압 추출공정을 통해 매자나무 추출물의 항산화 활성의 증진이 이루어졌음을 알 수 있다.

항암활성 측정 결과, 매자나무 수피 추출물의 높은 항암활성을 확인하였으며 5분 저온고압 처리한 추출물의 암세포 억제 활성이 가장 높게 나타남에 따라 저온고압 추출공정을 통해 항암활성의 증진이 가능함을 확인하였다. 세포독성 측정 결과 5분 저온고압 추출물이 정상 세포에 대한 독성이 가장 높는데 반해 15분 저온고압 처리한 추출물의 세포독성이 제일 낮은 것으로 미루어 저온고압 추출물의 세포독성이 저온고압 추출시간의 영향을 받는 것으로 사료된다.

따라서 매자나무 수피의 생체적용이 가능한 기능성 소재로서의 이용 가능성을 확인할 수 있으며 저온 고압 추출공정의 최적

화를 통한 활성물질의 추출 극대화를 통해 높은 경제적 가치를 부여해 줄 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산림청에서 시행한 산림특정연구사업(과제번호: S120708L1701104)의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

문헌

1. Min KJ, Cheon JU, Cha CG. Anti-oxidative and anti-cancer activities of extracting of Yacon. J. Food Hyg. Safety 23: 163-168 (2008)
2. Seo HS, Chung BH, Cho YG. Antioxidant and anticancer effects of agrimony (*Agrimonia Pilosa L.*) and chinese lizardtail (*Saururus chinensis Baill.*). Korean J. Med. Crop Sci. 16: 139-143 (2008)
3. Lee JH, Kim YG, Choi MI. Effects of cytotoxic and antioxidant of methanol extracts from medicinal plants. J. Korean Oriental Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol. 18: 37-43 (2005)
4. Nam SH, Yang MS. Isolation of cytotoxic substances from *Chrysanthemum boreale* M. Agric. Biol. Chem. 38: 273-277 (1995)
5. Kim YK, Kwak BM. Analysis of cytotoxic constituent of *Berberis Koreana* palibin. Mokchae Konghak 26: 100-106 (1998)
6. Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK, Lee HY. Effect of ultrasonification process on enhancement of immuno-stimulatory activity of *Ephedra sinica* stapf and *Rubus coreanus* miq. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 19: 113-117 (2004)
7. Deliza R, Rosenthal A, Abadio FBD, Silva CHO, Castillo C. Application of high pressure technology in the fruit juice processing: Benefits perceived by consumers. J. Food Eng. 67: 241-246 (2005)
8. Koo SY, Cha KH, Lee DU. Effects of high hydrostatic pressure of foods and biological system. Food Sci. Ind. 40: 23-30 (2007)
9. Zhang S, Zhu J, Wang C. Novel high pressure extraction technology. Int. J. Pharm. 278: 471-474 (2004)
10. Kang MY, Lee YR, Koh HJ, Nam SH. Antioxidative and antimutagenic activity of ethanolic extracts from *Glant embryonic rices*. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47: 61-66 (2004)
11. Hyun SH, Lee JS, Lee KB, Lee JS. Antioxidative activity of *Gynostemma pentaphyllum* Makino extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 447-451 (2007)
12. Kim HT, Kim JW, Lim MK, Jin TW, Yeo SG, Jang KH, Oh HT, Lee KW. Cytotoxic effect of *Artemisia capillaris* extracts on the cancer cells on *in vitro*. J. Vet. Clin. 24: 367-371 (2007)
13. Qadir SA, Kim CH, Kwon MC, Lee HJ, Kang HY, Choi DH, Lee HY. Comparison of anticancer and immuno-modulatory activities in the different parts of the *Acer mono* max. and *Acer okamotoanum*. Korean J. Med. Crop Sci. 15: 405-410 (2007)
14. Park KE, Jang MS, Lim CW, Kim YK, Seo Y, Park HY. Antioxidant activity on ethanol extract from boiled-water of *Hizikia fusiformis*. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 48: 435-439 (2005)
15. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. J. Food Sci. Technol. 36: 333-338 (2004)
16. Sung JY, Joe WA, Kim YH, Cheon SJ, Jang MJ, Choi HJ, Lee JS, Choi EY, Lee HS, Kim DI, Kim JO, An BJ, Lee JT. Study on the anti-oxidant activity of extracts from the *Chrysanthemum indicum* L. J. Appl. Oriental Med. 7: 1-5 (2007)
17. Yoo SJ, Lee KB, Kwak JH. Studies on the seasonal variation of berberine contents in *Berberis koreana*. Korean J. Pharmacogn. 17: 123-128 (1986)
18. Jin L, Han JG, Ha JH, Jeong HS, Kwon MC, Ahn JH, Kim JC, Choi GP, Chung EK, Lee HY. Effect of immune activity on *Berberis koreana* palibin by ultra high pressure low temperature process. Korean J. Med. Crop Sci. 16: 439-445 (2008)
19. Kwon MC, Kim CH, Na CS, Kwak HG, Kim JC, Lee HY. Comparison of immuno-modulatory regulatory activities of *Rubus coreanus* Miquel by ultra high pressure extracts process. Korean J. Med. Crop Sci. 15: 398-404 (2007)
20. Kim CS, Jang DS, Che SY. Histological characteristics of Korean red ginseng in steaming processes. Korean J. Med. Crop Sci. 14: 36-40 (2006)
21. Lee KJ, Choi SD. Application of biological industry using high hydrostatic pressure (HHP) system. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 23: 362-368 (2008)