

베리류 에탄올 추출물의 항산화 활성

이 화* · 정종문**†

*주벤스랩 중앙연구소, **수원대학교 생명과학과

Antioxidant Activities of Various Berries Ethanolic Extract

Hua Li* and Jong Moon Jeong**†

*Research Center of Ben's Lab Co., Ltd., Hwasung 445-743, Korea.

**Department of Life Science, The University of Suwon, Hwasung 445-743, Korea.

ABSTRACT : Edible berries are rich in anthocyanins and phenolic acids, compounds that possess antioxidant, anti-inflammatory, and other biological activities. Antioxidant and anti-inflammatory activities of five berries including acaiberry (*Euterpe oleracea* Mart.), Aronia/black chokeberry (*Aronia melanocarpa*), blueberry (*Vaccinium angustifolium*), black currant (*Ribes nigrum* L.), and cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) were assessed. The Aronia G (prepared by GreenField s.c.) exhibited the highest antioxidant activities as shown in total phenolic (138.81 mg CAE/g), flavonoid (3.68 mg QE/g), and anthocyanin (20.31 mg/g) contents compared to the other berries. It also showed the strongest scavenging activities such as DPPH (69.69 mg vitamin C/g) and ABTS radical scavenging activity (757.79 μmol trolox/g). Aronia G exhibited strong ferric reducing antioxidant power (553.98 μmol vitamin C/g), and oxygen radical absorbance capacity (820.92 μmol trolox/g). In addition, black currant and Aronia showed stronger inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cell than the other berries. According to the above results, the Aronia and other edible berries have notably high level of antioxidant activities and they could be used as a potential source of natural antioxidants.

Key Words : Berry, Antioxidant, Anti-Inflammatory, Acaiberry, Aronia, Black Chokeberry, Blueberry, Black Currant, Cranberry

서 언

산화적 스트레스는 방사선 조사, 화학반응, 산화환원반응에 의해 생성된 자유라디칼에 의해 유발되며 세포나 조직에서 암, 동맥경화, 당뇨병, 간경변, 단백질 산화, DNA 손상 및 지질의 과산화를 일으키는 주범이다 (Halliwell and Gutteridge, 2003). 자유라디칼에 의해 유발된 산화적 스트레스는 lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 염증 반응계에서 reactive oxygen species (ROS)의 조절에 관여 (Park *et al.*, 2010)하는데 식품에 함유되어 있는 비타민C, 토코페롤, 카로티노이드, 페놀화합물, 플라보노이드와 같은 항산화물질들은 자유라디칼에 의한 산화적 손상을 예방할 뿐만 아니라 (Niki *et al.*, 1994), 면역 반응계에서 pro-inflammatory 활성제의 활성을 저해 (Park *et al.*, 2010)하여 인체를 다양한 질병으로부터 보호한다.

베리류는 플라보노이드, 페놀산 등 페놀화합물을 다량 함유하고 있는 식용 식물이다. 그 중 블랙베리, 라즈베리, 블루베리, 크랜베리, 딸기 등은 미국에서 식용으로 많이 소비되고 있고 그에 비해 아시아베리, 블랙커런트, 초크베리, 오디 등은 덜 소비되고 있는 베리류로 알려져 있다 (Basu *et al.*, 2010). 크랜베리 (cranberry)와 블루베리 (blueberry)는 진달래과 (Ericaceae) 산앵두나무속 (*Vaccinium*)에 속하는 관목성 식물인데 재배되고 있는 블루베리의 종류는 저관목성 블루베리 (*Vaccinium angustifolium*), 고관목성 블루베리 (*Vaccinium corymbosum*) 및 래빗아이 블루베리 (*Vaccinium ashei*) 등 3종이다. 본 연구에서 사용한 블루베리 (*Vaccinium angustifolium*)는 저관목성 식물로서 항산화 (Kay and Holub, 2002), 항당뇨 (Martineau *et al.*, 2006), 항암 (Matchett *et al.*, 2006), 혈당강하 작용 (Grace *et al.*, 2009) 등 다양한 생리활성 기능이 보고되어

†Corresponding author: (Phone) +82-31-222-6514 (E-mail) jmjeong@suwon.ac.kr

Received 2014 August 5 / 1st Revised 2014 September 18 / 2nd Revised 2014 October 30 / 3rd Revised 2014 December 9 / 4th Revised 2015 January 2 / Accepted 2015 January 5

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

있다. 산앵두나무속 식물인 크랜베리 (cranberry, *Vaccinium macrocarpon*)는 항산화 및 항종양 (Yan *et al.*, 2002), 심혈관계 질환 예방 (McKay and Blumberg, 2007), 항균 (Wu *et al.*, 2008) 등 다양한 생리활성이 연구되어 있다. 아사이베리 (acaiberry, *Euterpe oleracea* Mart.)는 항산화활성 (Lichtenthaler *et al.*, 2005) 및 H-60 백혈병 세포의 세포자살에 관여 (Pozo-Insfran *et al.*, 2006)하는 등 기능성이 보고되어 있고 장미과 (Rosaceae) 식물인 아로니아 (black chokeberry, *Aronia melanocarpa*)는 블랙초크베리라고도 불리며, 블랙커런트 (black currant, *Ribes nigrum* L.)와 과실의 사이즈 및 컬러가 비슷하다 (Slimestad *et al.*, 2005). 블랙커런트 중 안토시아닌은 인플루엔자 A와 B에 대한 항바이러스 (Knox *et al.*, 2003) 및 항염증 (Garbacki *et al.*, 2004)작용이 보고되어 있고 아로니아 중 페놀화합물은 암세포 증식 억제 (Lala *et al.*, 2006), 항돌연변이 (Gasiorowski *et al.*, 1997), 간보호 작용 (Valcheva-Kuzmanova *et al.*, 2004), 고지혈증 랫드의 콜레스테롤 상승 억제 (Valcheva-Kuzmanova *et al.*, 2007) 등의 기능이 보고되어 있다.

상기에 서술한 바와 같이 베리류의 많은 기능성이 보고되어 있으나 각종 베리의 항산화활성에 대한 비교연구는 미미한 수준이다. 본 연구에서는 기능성이 풍부한 베리류의 항산화 및 항염증활성을 비교 분석하고자 국내에서 소비되고 있는 아사이베리 (*Euterpe oleracea* Mart.), 아로니아/블랙초크베리 (*Aronia melanocarpa*), 블루베리 (*Vaccinium angustifolium*), 블랙커런트 (*Ribes nigrum* L.), 크랜베리 (*Vaccinium macrocarpon*) 등 5종 베리를 선정하였다. 항산화활성의 비교를 위하여 베리류의 총 페놀화합물, 플라보노이드 및 안토시아닌의 함량을 측정하여 비교하였고, DPPH, ABTS 라디칼 소거능, ferric reducing antioxidant power, oxygen radical absorbance capacity를 측정하였다. 추가로 항염증활성의 비교를 위하여 LPS로 염증이 유도된 마우스 대식세포 (RAW 264.7)에 베리의 에탄올 추출물을 처리하여 nitric oxide 생성에 대한 저해활성을 측정하였다. 이들 베리류의 항산화 및 항염증활성의 비교분석을 통하여 생리활성이 강한 베리의 우수성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 아사이베리 (acaiberry, *Euterpe oleracea* Mart.), 아로니아E/블랙초크베리 (Aronia E, *Aronia melanocarpa*, WPPH ELENA), 아로니아G/블랙초크베리 (Aronia G, *Aronia melanocarpa*, GreenField s.c.), 블루베리 (blueberry, *Vaccinium angustifolium*), 블랙커런트 (black currant, *Ribes nigrum* L.), 크랜베리 (cranberry, *Vaccinium macrocarpon*) 6종 시료의 동결건조분말은 팬아시아마켓팅(주) (서울, 대한민국)에서 제공 받았고 함께 제공 받은 제품성적서의 내용을 참고하여 각 제품의 정보를 Table 1에 나타내었다. 각 동결건조 분말시료는 -20°C에 저장하면서 실험에 사용하였다.

2. 에탄올 추출물의 제조

시료는 에탄올을 사용하여 다음과 같이 추출하였다. 동결건조 시료 (1 g)에 20 mL의 50% 에탄올을 가하여 35°C에서 30분 동안 초음파기기 (Power Sonic 520, Hwashin Tech, Daegu, Korea)로 추출하였다. 이 추출액을 10,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 (TOMY MX-300, TOMY Co., Ltd., Tokyo, Japan)하여 상층액을 분리한 후 Whatman No.4 여과지로 여과하였다. 원심분리 후 잔사에 20 mL의 50% 에탄올을 가하여 상기 과정을 반복하여 추출하였다 (총 2회). 1, 2차 추출에서 얻어진 여액에 50% 에탄올을 가하여 부피를 50 mL로 조정하였고 이때 얻어진 추출물 (20 mg/mL)을 회석하여 실험에 사용하였다.

3. DPPH radical scavenging activity 측정

시료의 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 Chung 등 (2005)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 추출물 100 µL에 메탄올에 녹인 DPPH 시약 (200 µM)을 900 µL 가하고 vortexing 하였다. 시료와 DPPH의 혼합물을 빛이 차단된 상온에서 30분 동안 반응시켰으며 517 nm에서 흡광도 (JENWAY 7315 Spectrophotometer, Bibby Scientific

Table 1. Information of six berries according to certificate of analysis.

Common name	Botanical name	Manufacturing company	Country of origin	Moisture content	Food additive
Acaiberry	<i>Euterpe oleracea</i> Mart.	VITA FORTE, INC.	USA	≤ 5%	0.1% citric acid
Aronia E	<i>Aronia melanocarpa</i>	WPPH ELENA	Poland	≤ 6%	None
Aronia G	<i>Aronia melanocarpa</i>	GreenField s.c.	Poland	≤ 6%	None
Blueberry	<i>Vaccinium angustifolium</i>	Van Drunen Farms	USA	≤ 4%	None
Black Currant	<i>Ribes nigrum</i> L.	Van Drunen Farms	USA	≤ 4%	None
Cranberry	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Van Drunen Farms	USA	≤ 4%	None

Ltd., Stone, England)를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음의 식에 따라 계산되었다. DPPH 소거능(%) = $(1 - (A - C) / B) \times 100$ (A: 시료 + DPPH 흡광도; C: 시료 + 메탄올 흡광도; B: 50% 에탄올 + DPPH 흡광도). 양성대조구로 비타민C (5, 10, 25, 50, 100, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 사용하였다.

4. 총 페놀화합물 및 플라보노이드 함량 측정

베리류 총 페놀화합물 함량을 Gutfinger (1981)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 100 μL 에 50% Folin-Ciocalteu's 시약 100 μL 를 가하고 200 μL 의 10% 탄산나트륨 (Na_2CO_3) 용액을 첨가하여 혼합하였다. 이 혼합액에 800 μL 의 증류수를 가하여 상온에서 25분 동안 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 베리류에 풍부하게 함유되어 있는 페놀산으로 알려져(Taruscio *et al.*, 2004) 있는 클로로겐산 (25, 50, 75, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 표준품으로 사용하였으며 총 페놀화합물의 함량은 mg chlorogenic acid equivalent (CAE)/ g dry weight 으로 나타내었다.

베리류의 플라보노이드 함량은 Moreno 등 (2000)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 100 μL 에 100 μL 의 10% 질산알루미늄 ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$) 및 100 μL 의 1 μM 초산칼륨 (CH_3COOK)을 가하였다. 이 혼합액에 700 μL 의 50% 에탄올을 가하여 상온에서 40분 동안 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준검량곡선은 퀘르세틴 (10, 50, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 사용하여 작성하였으며 플라보노이드 함량을 mg quercetin equivalent (QE)/g dry weight으로 나타내었다.

5. 안토시아닌 함량 측정

베리류 안토시아닌의 함량은 Lee (2005)의 방법으로 측정되었다. 시료와 25 mM 염화칼륨 (KCl)완충액 (pH 1.0)을 1:19의 비율로 혼합하여 520 nm와 700 nm에서 흡광도를 각각 측정하였다. 시료를 동일한 비율로 0.4 M 초산나트륨 (CH_3COONa)완충액 (pH 4.5)과 혼합하여 520 nm와 700 nm에서 흡광도를 각각 측정하고 다음 계산식을 이용하여 안토시아닌의 색소함량을 계산하였다. 안토시아닌 색소량 (cyanidin-3-glucoside, mg/L) = $(A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 10^3) / \epsilon \times 1$; $A = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) / \text{pH} 1.0 - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) / \text{pH} 4.5$; $\text{MW} = 449.2 \text{ g}/\text{mol}$ (cyanidin-3-glucoside의 분자량); $\text{DF} = \text{희석배수}$ (즉 20); $1 = \text{경로길이}$ 1 cm; $\epsilon = 26900$, cyanidin-3-glucoside의 분자 흡광계수, $\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, $10^3 = \text{g}$ 에서 mg 으로 단위환산 시 계 수

6. ABTS 라디칼 소거능측정

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등 (1999)의 방법을 변형하여 측정하였다. ABTS (2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt) 양이온의 생성 및 안정화

를 위해 7 mM ABTS 및 2.45 mM 페록소이황산칼륨 ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)의 혼합물을 빛을 차단한 상온에서 16시간 동안 방치하였다. 메탄올로 이 용액의 흡광도가 1.0 ± 0.05 되게 희석한 후 실험에 사용하였다. 시료 20 μL 에 ABTS 시약 1.48 mL를 혼합하여 30°C에서 6분 동안 반응시키고 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid)로 표준검량곡선 (0.25, 0.5, 1, 2 mM)을 작성한 후 시료의 ABTS 라디칼 소거능은 $\mu\text{mol trolox}/\text{g dry weight}$ 으로 나타내었다.

7. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) 측정

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)는 Bakar 등 (2009)의 방법을 약간 변형하여 실행하였다. FRAP 반응액은 다음과 같이 제조되었다. 초산나트륨 완충액 (300 mM, pH 3.6), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (10 mM), 염화제이철 (FeCl_3 , 20 mM) 용액을 10:1:1의 부피비율로 혼합하여 37°C에서 예열한 후 사용하였다. 시료 50 μL 에 1.5 mL의 FRAP 반응액을 혼합한 후 37°C에서 10분 동안 반응시키고 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로서 비타민C (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mM)를 사용하였고, 철에 대한 환원력을 $\mu\text{mol vitamin C}/\text{g dry weight}$ 으로 나타내었다.

8. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) 측정은 Huang 등 (2010)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 75 mM 인산완충액 (pH 7.4)으로 희석한 시료 용액 50 μL 와 fluorescein (140 nM) 100 μL 를 96 well plate에 가하고 37°C에서 15분 동안 방치하였다. AAPH (2,2-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride, 80 mM) 50 μL 를 가하고 1분 간격으로 60분 동안 Fluorescence Microplate Reader (Spectramax Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 형광도를 측정하였다 (excitation 485 nm, emission 538 nm, cut off 530 nm). Area of Under the Curve (AUC)는 다음 식에 의해 계산되었고, trolox (6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM)로 표준검량곡선을 작성하였다. Area of Under the Curve (AUC) = $1 + F_1/F_0 + F_2/F_0 + \dots + F_{60}/F_0$ (F_0 ; 0 min에 측정된 형광도, F_{60} ; 60 min에 측정된 형광도)

9. 세포주 배양

항염증활성 측정을 위해 사용한 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행에서 분양 받았다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS)은 GIBCO-BRL (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), LPS, sodium nitrite, phenicillin-streptomycin (PS)

및 naphylethylenediamine sulfanilamide 등 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품으로 사용하였다. 세포는 5% CO₂ incubator에서 10% FBS를 포함한 DMEM배지 (1% PS 함유)를 사용하여 배양하면서 실험에 사용하였다.

10. Cell viability

RAW 264.7 cell에 대한 cell viability는 다음과 같이 측정되었다 (Byeon *et al.*, 2008). 세포를 1 × 10⁶ cell/mL의 농도로 희석하여 96 well plate에 100 L씩 분주하였고 세포가 부착된 후 시료 (최종농도 50, 100, 200 g/mL)를 처리하였다. 시료 처리 24시간 후, MTT (5 mg/mL) 20 L를 가하였다. DMSO로 생존 세포에 존재하는 색소를 용해시켜 570 nm에서 흡광도 (Epoch, BIOTEK instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 측정하였고 다음 식에 의해 세포생존율을 계산하였다. Cell viability (%) = (시료처리구의 흡광도/대조군 흡광도) × 100.

11. Nitric Oxide (NO) 생성 저해활성

LPS로 염증이 유도된 대식세포 (RAW 264.7)에서 nitric oxide 생성에 대한 베리류의 저해활성을 다음과 같이 측정하였다 (Kwak *et al.*, 2008). RAW 264.7 cell을 1 × 10⁶ cell/mL의 농도로 희석 (free FBS DMEM 배지 사용)하여 12 well plate에 1 mL씩 분주하였다. 24시간 후 시료 (최종농도 200 g/mL)를 처리하였고, 시료 처리 1시간 후 LPS (1 g/mL)로 24시간 동안 염증을 유발시켰다. 이후 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphylethylenediamine, 2.5% phosphoric acid)을 이용하여 세포배양액에 존재하는 NO₂⁻의 양을 측정하였다. 즉 배양액 100 L에 Griess 시약 100 L를 혼합하여 96 well plate에서 5분 동안 반응시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산나트륨 (NaNO₂, 25-100 M)을 사용하여 표준곡선을 작성하여 NO₂⁻의 생성량을 계산하였다.

12. 통계처리

모든 실험결과는 3 반복으로 측정하여 평균 및 표준편차로 나타냈으며 SPSS (PASW statistics 18)를 사용하여 ANOVA (Scheffe test)로 유의성을 검증하였다 (*p* < 0.05).

결과 및 고찰

1. DPPH 라디칼 소거능 결과

DPPH 라디칼 소거능 측정법은 DPPH 라디칼에 대한 환원력을 기준으로 측정물질의 항산화력을 측정할 수 있는 방법이다 (Choi *et al.*, 2013). 베리류의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 Table 2에 나타내었다. 베리 추출물 (0.2 mg/mL)의 DPPH 소거능을 측정한 결과 아로니아E가 91.19%, 아로니아G가 90.74%로 타 베리에 비해 월등히 높았고 아사이베리가 50.13%, 블루베리가 40.45%이었다. 크랜베리는 24.78%로 가장 낮은 소거능을 나타냈고 블랙커런트는 40.77%의 소거능을 나타내었다. Jeong 등 (2012)은 뉴질랜드산 블랙커런트 과육 착즙액의 동결건조분말의 항산화활성을 0.15 mg/mL에서 약 22%, 0.31 mg/mL에서 약 40%로 보고하였다. 이는 본 연구 중 블랙커런트 과육 동결건조분말의 항산화활성과 비슷한 수치이다. 비타민C를 양성대조군으로 시료의 DPPH 라디칼 소거능을 나타낸 결과 아로니아E는 70.03 mg vitamin C/g, 아로니아G는 69.69 mg vitamin C/g, 아사이베리는 38.61 mg vitamin C/g, 블루베리는 31.45 mg vitamin C/g, 블랙커런트는 31.20 mg vitamin C/g, 크랜베리는 19.22 mg vitamin C/g에 해당하는 항산화능을 지니고 있었다.

2. 총 페놀화합물 및 플라보노이드 함량

Chlorogenic acid로 표준곡선을 작성하여 총페놀화합물 함량을 측정한 결과 (Table 2), 아로니아G가 138.81 mg/g으로 가장 높았으며 아로니아E는 136.23 mg/g이었다. 아사이베리는 71.59 mg/g으로 아로니아 페놀화합물 함량의 약 50%로 나

Table 2. DPPH, ABTS radical scavenging, and FRAP of acaiberry, aronia E, aronia G, blueberry, black currant and cranberry.

Species	DPPH ¹⁾ (%)	DPPH (mg vitamin C/g)	ABTS ²⁾ (mol trolox/g)	FRAP ³⁾ (mol vitamin C/g)
Acaiberry	50.13 ± 0.51b	38.61	404.42 ± 0.73c	211.42 ± 2.19*b**
Aronia E	91.19 ± 0.32a	70.03	745.63 ± 6.17b	538.07 ± 6.68a
Aronia G	90.74 ± 0.15a	69.69	757.79 ± 0.71a	553.98 ± 4.63a
Blueberry	40.77 ± 0.77c	31.45	307.70 ± 0.00d	189.22 ± 8.06c
Black currant	40.45 ± 0.64c	31.20	282.94 ± 0.73e	159.21 ± 4.08d
Cranberry	24.78 ± 0.61d	19.22	187.55 ± 0.00f	108.42 ± 4.71e

¹⁾DPPH radical scavenging at 0.2 mg/mL.

²⁾μmol trolox/g dry weight.

³⁾μmol vitamin C/g dry weight.

*Values are average ± standard deviations of six berries analyzed in triplicate.

Different letters (a, b, c, d, e, f) within a column denote statistically significant differences (p* < 0.05).

Table 3. Total phenolic, flavonoid, and anthocyanin contents and oxygen radical antioxidant activity in fruit of acaiberry, aronia E, aronia G, blueberry, black currant and cranberry.

Species	Total phenolic ¹⁾ (mg/g)	Flavonoid ²⁾ (mg/g)	Anthocyanin ³⁾ (mg/g)	ORAC ⁴⁾ (mol trolox/g)
Acaiberry	71.59 ± 0.34c	0.73 ± 0.02f	2.87 ± 0.04e	595.20 ± 33.47*c**
Aronia E	136.23 ± 0.57b	3.42 ± 0.04b	18.76 ± 0.21b	705.95 ± 30.29b
Aronia G	138.81 ± 0.54a	3.68 ± 0.02a	20.31 ± 0.44a	820.92 ± 0.31a
Blueberry	52.58 ± 0.13d	1.98 ± 0.04c	10.03 ± 0.25c	395.31 ± 11.68d
Black currant	46.89 ± 0.13e	1.04 ± 0.00e	7.13 ± 0.06d	219.88 ± 12.51e
Cranberry	36.89 ± 0.00f	1.29 ± 0.04d	2.53 ± 0.09e	258.43 ± 8.79e

¹⁾Chlorogenic acid equivalent mg/g dry weight.

²⁾Quercetin equivalent mg/g dry weight.

³⁾Cyanidin-3-glucoside equivalent mg/g dry weight.

⁴⁾μmol trolox/g dry weight.

*Values are average ± standard deviations of six berries analyzed in triplicate.

**Different letters (a, b, c, d, e, f) within a column denote statistically significant differences (*p < 0.05).

타났다. 블루베리의 총 페놀화합물의 함량은 52.58 mg/g이었고 블랙커런트는 46.89 mg/g으로 Jeong 등 (2012)이 보고한 블랙커런트 과육의 총 페놀화합물의 함량 34.48 mg gallic/g보다 다소 높게 측정되었다. Zheng 과 Wang (2003)은 베리류의 항산화활성 관련 연구에서 아로니아의 총 페놀화합물 함량을 25.56 mg/g FW (fresh weight, 생과)으로, 크랜베리의 총 페놀화합물 함량을 3.15 mg/g FW로 보고하였다. 수분 함량 (약 80%)을 감안하였을 때 아로니아의 총 페놀화합물의 함량은 본 연구의 결과와 비슷하였다.

Quercetin을 표준물질로 사용하여 플라보노이드 함량을 측정하여 Table 2에 나타내었다. 아로니아G가 3.68 mg/g으로 가장 높았고 아로니아E는 비슷한 수준인 3.42 mg/g이었다. 아시아베리의 플라보노이드 함량은 0.73 mg/g으로 6종의 시료 중에서 가장 낮은 함량을 나타내었다. 블루베리는 1.98 mg/g, 블랙커런트는 1.04 mg/g, 크랜베리는 1.29 mg/g의 플라보노이드 함량을 나타내었다.

3. 안토시아닌 함량

베리류 안토시아닌의 함량을 측정하여 Table 2에 나타내었다. 아로니아G의 안토시아닌 함량은 20.31 mg/g으로 가장 높게 측정되었고 아로니아E는 18.76 mg/g으로 측정되었다. 블루베리는 10.03 mg/g, 블랙커런트는 7.13 mg/g의 함량을 나타내었고, 아시아베리와 크랜베리는 각각 2.87 mg/g과 2.53 mg/g의 안토시아닌 함량을 나타내었다. Moyer 등 (2002)은 미국 오리건 주에서 수확한 블랙커런트 생과를 액체질소로 수분을 제거한 후 70% 아세톤으로 추출하는 방법을 사용하여 안토시아닌 함량을 측정하였으며 그 함량을 128-411 mg/100 g FW로 보고하였다. Wang 과 Stretch (2001)는 미국 뉴저지에서 수확한 크랜베리를 슬라이스하여 착즙액을 얻었고 그 안토시아닌 함량을 19.8-65.6 mg/100 g FW로 보고하였는데 이는 본 연구에서

사용한 미국 일리노이 주에서 수확한 블랙커런트 혹은 크랜베리 과육의 동결건조 분말의 안토시아닌 함량과 각각 비슷한 수치이다. 미국 동북부산 야생 아로니아 과육 동결건조 분말의 80% 아세톤 추출물에서 안토시아닌 함량이 428 mg/100 g FW인 것으로 보고된 바 있고 (Zheng and Wang, 2003), 남부 이탈리아에서 수확한 아로니아 메탄올 추출물의 안토시아닌 함량은 460.5 mg/100 g FW (Benvenuti *et al.*, 2004)으로 보고되었는데 이는 본 연구에서 사용한 폴란드산 아로니아 과육 동결건조 분말의 안토시아닌 함량과 비슷하여 상이한 지역에서 재배된 베리류의 안토시아닌 함량이 크게 차이가 나지 않음을 알 수 있었다.

4. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

베리류의 ORAC 수치를 측정하여 Table 2에 나타내었다. 아로니아G의 ORAC 수치는 820.92 mol trolox/g으로 가장 높았고 아로니아E는 705.95 mol trolox/g이었다. 아시아베리는 595.2 mol trolox/g, 블루베리는 395.31 mol trolox/g, 블랙커런트는 219.88 mol trolox/g, 크랜베리는 258.43 mol trolox/g이었다. 수분함량이 72.1-80.2%를 나타내는 블랙커런트의 ORAC 수치는 50.1-101.4 mol trolox/g FW, 수분함량 71.8%의 아로니아는 160.6 mol trolox/g FW (Wu *et al.*, 2004)로 본 연구의 결과와 비슷하게 보고된 바 있다. 베리류의 ORAC 수치, 총 페놀화합물, 안토시아닌의 상관관계에 관한 연구에서 블루베리, 복분자, 딸기의 안토시아닌 함량과 총 페놀화합물 함량의 상관관계 계수는 $r^2=0.91$, 총 페놀화합물과 ORAC 수치의 상관관계는 $r^2=0.83$ 으로 보고되었고 (Kalt *et al.*, 1999), 블랙베리, 복분자, 딸기의 ORAC 수치와 안토시아닌의 상관관계 계수는 각각 0.937, 0.988, 0.941로, 이들의 ORAC 수치와 총 페놀화합물의 상관관계 계수는 0.995, 0.904, 0.884로 보고되었다 (Wang and Lin, 2000). *Vaccinium* 속 베리류

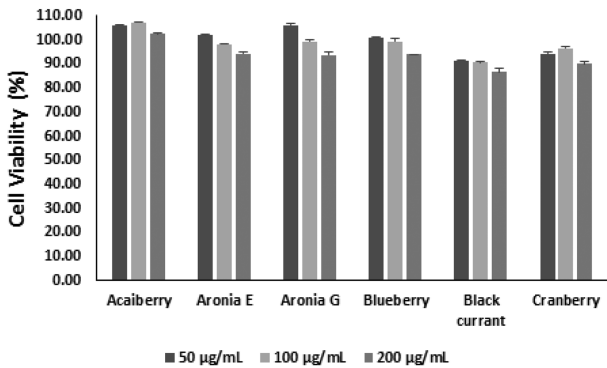


Fig. 1. Cell viability of RAW 264.7 cells against acaiberry, aronia E, aronia G, blueberry, black currant and cranberry. RAW 264.7 cell were treated with berries (50, 100 or 200 µg/mL) for 24 h. Values are average ± standard deviations of six berries analyzed in triplicate.

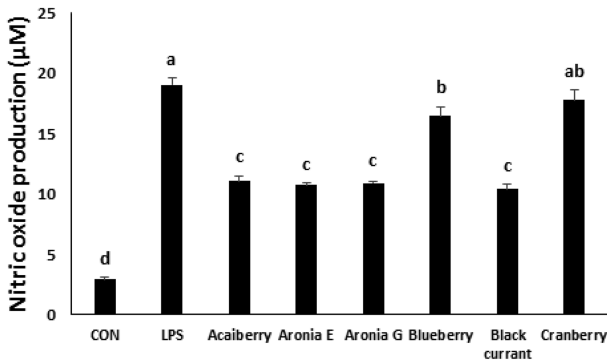


Fig. 2. Nitric oxide production of acaiberry, aronia E, aronia G, blueberry, black currant and cranberry. RAW 264.7 cells were treated with LPS alone (1 µg/mL), or with LPS (1 µg/mL) and berries (200 µg/mL) for 24 h. Values are average ± standard deviations of six berries analyzed in triplicate. Different letters (a, b, c, d) denote statistically significant differences (* $p < 0.05$).

에서는 페놀화합물과 ORAC 수치의 상관계수 ($r^2 = 0.845$)가 안토시아닌과 ORAC 수치의 상관계수 ($r^2 = 0.77$)보다 크다고 보고된바 있다 (Prior *et al.*, 1998). 한편 본 연구에서는 총 페놀화합물 함량과 ORAC 수치의 상관계수 계수는 0.938이었고, 플라보노이드 함량과 ORAC 수치의 상관관계 계수는 0.685로 안토시아닌과 ORAC 수치의 상관계수 (0.678)와 비슷하였다. ORAC 수치와 FRAP, ABTS 소거능, DPPH 소거능과의 상관관계 계수는 각각 0.893, 0.934, 0.911이었다. 이상의 결과로부터 베리류의 항산화활성에 기여하는 물질들 중에는 안토시아닌 외에 페놀화합물 등 다양한 물질이 많을 것으로 판단된다.

5. ABTS 라디칼 소거능 및 FRAP 측정

Trolox를 양성대조군으로 하여 베리류의 ABTS 라디칼 소거

능을 계산하였다 (Table 2). 아로니아G가 757.79 mol trolox/g으로 가장 높은 소거능을 나타내었고 아로니아E는 비슷한 수준인 745.63 mol trolox/g의 소거능을 나타내었다. 아사이베리는 404.42 mol trolox/g으로 아로니아의 ABTS 라디칼 소거능의 50% 수준이었고, 크랜베리는 187.55 mol trolox/g으로 6종 시료에서 가장 낮은 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었다.

철이온 등 금속이온은 산화제로서 식품 중 지질의 과산화를 일으킨다 (Yamaguchi *et al.*, 1998). FRAP의 측정은 식품 중 항산화물질이 Fe³⁺을 Fe²⁺로 환원시키는 능력으로 평가하는 것이다. 베리류의 FRAP 수치 (Table 2)는 비타민C를 양성대조군으로 하여 mol vitamin C/g으로 나타내었다. 크랜베리는 108.82 mol vitamin C/g이었고, 아로니아G는 크랜베리의 약 5배인 553.98 mol vitamin C/g으로 측정되었으며 아로니아E는 538.07 mol vitamin C/g으로 측정되었다. 반면, 아사이베리는 211.42 mol vitamin C/g, 블루베리는 189.22 mol vitamin C/g, 블랙커런트는 159.21 mol vitamin C/g의 철 환원능력을 나타내었다.

6. Nitric Oxide (NO) 생성 저해활성

베리류의 RAW 264.7 세포 생존률에 대한 영향 (cell viability)을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 시료의 최종 처리 농도를 50, 100, 200 g/mL로 하였을 때 모든 처리농도에서 세포 생존률이 85% 이상으로 나타나 처리농도 200 g/mL를 적용하여 베리류의 RAW 264.7 cell에 대한 nitric oxide 생성 억제활성을 측정하였다.

Nitric oxide는 nitric oxide synthase에 의해 L-arginine으로부터 생성되며 아민류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성하는 물질이다. 이 물질은 LPS로 염증이 유도된 염증반응계에서 생성되며 superoxide (O₂⁻)와 반응하여 강한 독성 산화제인 peroxynitrite (ONOO⁻)를 생성한다 (Yang *et al.*, 2012). 베리 추출물 (최종농도 200 g/mL)이 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에 대한 nitric oxide 생성 억제활성을 측정하였다 (Fig. 2). LPS 비처리군의 nitric oxide 생성량은 2.91 M이었고 LPS 처리군은 19.05 M이었다. 아사이베리 처리군의 nitric oxide의 생성량은 11.09 M, 아로니아E는 10.75 M, 아로니아G는 10.91 M, 블루베리는 16.44 M, 블랙커런트는 10.38 M로서 nitric oxide 생성을 유의적으로 감소시켰고 ($p < 0.05$) 크랜베리 처리군은 nitric oxide 생성량이 17.76 M으로 측정되어 nitric oxide 생성의 유의적인 감소를 나타내지 않았다. 블루베리와 아로니아는 UVB 조사에 의한 inflammatory cytokine (IL-6, IL-8)의 발현을 억제할 뿐만 아니라 reactive oxygen species의 생성을 억제한다 (Lee *et al.*, 2014). 또한 아로니아는 inducible nitric oxide synthase와 cyclooxygenase-2의 발현을 억제함으로써 NO, PGE2, TNF-α의 생성을 억제 (Ohgami *et al.*, 2005)한다. 그러므로 아사이

베리, 아로니아, 블루베리, 블랙커런트는 inducible nitric oxide synthase의 발현을 저해함으로써 nitric oxide의 생성을 억제한 것으로 판단된다.

아사이베리, 아로니아, 블루베리, 블랙커런트, 크랜베리 등 베리류에 대해 항산화 및 항염증활성을 비교 측정된 결과 아로니아의 항산화활성이 모든 항목 (총 페놀화합물, 플라보노이드, 안토시아닌 함량, DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, Ferric reducing antioxidant power, Oxygen radical absorbance capacity)에서 가장 높은 것으로 나타났다. 항염증 활성 측정에서는 블랙커런트가 LPS로 염증이 유도된 마우스 대식세포 (RAW 264.7)에서 nitric oxide의 생성을 가장 많이 저해하는 것으로 나타났으나 아사이베리 및 아로니아와 유의적인 차이는 없었다 ($p < 0.05$). 이상의 결과로 미루어 볼 때 항산화활성이 비교적 높은 아로니아, 아사이베리, 블루베리, 블랙커런트 등 베리류는 항산화 및 항염증 관련 질병 예방에 중요한 천연 항산화제로 작용할 수 있을 것이며 기능성식품으로 개발하기 위해서는 추가적으로 동물실험 및 인체시험 등 연구가 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Bakar MFA, Mohamed M, Rahmat Am and Fry J.** (2009). Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan(*Mangifera pajang*) and tarap(*Artocarpus odoratissimus*). *Food Chemistry*. 113:479-483.
- Basu A, Rhone M and Lyons TJ.** (2010). Berries: Emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition Reviews*. 68:168-177.
- Benvenuti S, Pellati F, Melegari M and Bertelli D.** (2004). Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of Food Science*. 69:FCT164-FCT169.
- Byeon SE, Chung JY, Lee YG and Kim BH.** (2008). In vitro and In vivo anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. *Journal of Ethnopharmacology*. 119:145-152.
- Chung YC, Chen SJ, Hsu CK, Chang CT and Chou ST.** (2005). Studies on the antioxidative activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. *Food Chemistry*. 91:419-424.
- Choi KH, Nam HH and Choo BK.** (2013). Effect of five Korean native *Taraxacum* on antioxidant activity and nitric oxide production inhibitory activity. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 21:191-196.
- Garbacki N, Tits M, Angenot L and Damas J.** (2004). Inhibitory effects of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves on carrageenin acute inflammatory reactions induced in rats. *BioMed Central Pharmacology*. 4:1-9.
- Gasiorowski K, Szyba K, Brokos B, Kolaczynska B, Jankowiak -Wlodarczyk M and Oszmianski.** (1997). Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. *Cancer Letters*. 119:37-46.
- Grace MH, Ribnicky DM, Kuhn P, Poulev A, Logendra S, Yousef GG, Raskin I and Lila MA.** (2009). Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*. 16:406-415.
- Gutfinger T.** (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 58:966-968.
- Halliwell B and Gutteridge JMC.** (2003). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press. Oxford, England. p.246-350.
- Huang WY, Majumder K and Wu J.** (2010). Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chemistry*. 123:635-641.
- Jeong CH, Jang CW, Lee KY, Kim IH and Shim KW.** (2012). Chemical components and anti-oxidant activities of black currant. *Korean Journal of Food Preservation*. 19:263-270.
- Kalt W, Forney CF, Martin A and Prior RL.** (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47:4638-4644.
- Kay CD and Holub BJ.** (2002). The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *British Journal of Nutrition*. 88:389-397.
- Knox YM, Suzutani T, Yosida I and Azuma M.** (2003). Anti-influenza virus activity of crude extract of *Ribes nigrum* L. *Phytotherapy Research*. 17:120-122.
- Kwak HY, Lee SJ, Lee DY, Jung L, Bae NH, Hong SY, Kim GW and Baek NI.** (2008). Cytotoxic and anti-inflammatory activities of lipids from the Nuruk(*Rhizopus oryzae* KSD-815). *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 51:142-147.
- Lala G, Malik M, Zhao CW, He J, Kwon Y, Giusti MM and Magnuson BA.** (2006). Anthocyanin-rich extracts inhibits multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutrition and Cance*. 54:84-93.
- Lee J.** (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 88:1269-1278.
- Lee SJ, Choi HR, Lee JC, Park HJ, Lee HK, Jeong JT and Lee TB.** (2014). The anti-aging effects of various berries in the human skin keratinocyte(HeCaT) cells. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 46:198-204.
- Lichtenthaler R, Rodrigues RB, Maia JGS, Papagiannopoulos M, Fabricius H and Marx F.** (2005). Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) fruits. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 56:53-64.
- Martineau LC, Couture A, Spoor D, Benhaddou-Andaloussi A, Harris C, Meddah B, Leduc C, Burt A, Vuong T, Le PM, Prentki M, Bennett SA, Arnason JT and Haddad PS.** (2006). Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Phytomedicine*. 13:612-623.
- Matchett MD, MacKinnon SL, Sweeney MI, Gottschall-Pass KT and Hurta RAR.** (2006). Inhibition of matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer

- cells by flavonoids from lowbush blueberry(*Vaccinium angustifolium*): Possible roles for protein kinase C and mitogen-activated protein-kinase-mediated events. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 17:117-125.
- McKay DL and Blumberg JB.** (2007). Cranberries(*Vaccinium macrocarpon*) an cardiovascular disease risk factors. *Nutrition Reviews*. 65:490-502.
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR and Vattuone MA.** (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argetina. *Journal of Ethnopharmacology*. 71:109-114.
- Moyer RA, Hummer KE, Finn CE, Frei B and Wrolstad RE.** (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:519-525.
- Niki E, Shimaski H and Mino M.** (1994). Antioxidantism-Free radical and biological defence. Gakkai Syuppan Center. Tokyo, Japan. p.3-16.
- Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, Koyama Y, Jin XH, Yoshida K, Kase S, Kitaichi N, Suzuki Y, Tanaka T and Ohno S.** (2005). Anti-inflammatory effects of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 46:275-281.
- Park HJ, Han ES, Park DK, Lee C and Lee KW.** (2010). An extract of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice inhibits inflammation markers in RAW 264.7 macrophages by suppressing inflammatory cytokines, chemokines, and mediators and upregulating antioxidant activity. *Journal of Medicinal Food*. 13:1468-1477.
- Pozo-Insfran DD, Percival SS and Talcott ST.** (2006). *Acai(Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:1222-1229.
- Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O' Brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G and Mainand CM.** (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic acid and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:2686-2693.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C.** (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26:1231-1237.
- Slimestad R, Torskangerpoll K, Nateland HS, Johannessen T and Giske NH.** (2005). Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18:61-68.
- Taruscio TG, Barney DL and Exon J.** (2004). Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *Vaccinium* berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:3169-3176.
- Valcheva-Kuzmanova S, Borisova P, Galunska B, Krasnaliev I and Belcheva A.** (2004). Hepatoprotective effect of the natural fruits juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 56:195-201.
- Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Mihova V, Krasnaliev I, Borisova P and Belcheva A.** (2007). Antihyperlipidemic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed a high-cholesterol diet. *Plant Foods for Human Nutrition*. 62:19-24.
- Wang SY and Lin H.** (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:140-148.
- Wang SY and Stretch AW.** (2001). Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:969-974.
- Wu VCH, Qiu X, Bushway A and Harper L.** (2008). Antibacterial effects of American cranberry(*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*. 41:1834-1841.
- Wu X, Gu L, Prior RL and McKay S.** (2004). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:7846-7856.
- Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T and Teral J.** (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 62:1201-1204.
- Yan X, Murphy BT, Hammond GB, Vinson JA and Neto CC.** (2002). Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit(*Vaccinium macrocarpon*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:5844-5849.
- Yang SA, Pyo BS, Kim SM and Lee KI.** (2012). Antibacterial activity and nitric oxide production inhibitory activity of the extract and its fractions from the leaves of *Prunus sargentii*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:308-314.
- Zheng W and Wang SY.** (2003). Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:502-509.