

열처리에 따른 은행 외종피 추출물의 생리활성

김성태 · 이지현 · 이상훈 · 장귀영 · Li Meishan · 김민영 · 윤나라 · 이준수 · [†]정현상
충북대학교 식품생명공학과

Physiological Activities of *Ginkgo biloba* Sarcotesta Extract with Heat Treatment

Sung Tae Kim, Ji Hyun Lee, Sang Hoon Lee, Gwi Yeong Jang, Meishan Li, Min Young Kim, Nara Yoon,
Junsoo Lee and [†]Heon Sang Jeong

Dept. of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract

This study was performed to investigate the physiological activities of *Ginkgo biloba* sarcotesta extracts before and after heat treatment. *G. biloba* sarcotesta was heated at 130°C for 2 h and extracted with water, 70% ethanol and 80% methanol. ABTS and DPPH radical scavenging activities increased after heating in the water (14.95 mg AAE/g and 7.36 mg TE/g) and ethanol extracts (12.20 mg AAE/g and 6.23 mg TE/g). α -Glucosidase inhibitory activity decreased after heating in all but the water extract. Angiotensin converting enzyme I inhibitory activities decreased after heating in all extracts. Nitric oxide production inhibitory activity increased from 12.40~44.55% of the raw sample to 40.76~72.39% of the heated sample at a concentration of 200 μ g/mL. Lipid accumulation inhibitory activities were similar before and after heat treatment. The highest antiproliferative effects on MCF-7 human breast cancer cell lines were observed in 80% methanol extract in the heated sample. Cell viability at concentrations of 25, 50, 100, and 200 μ g/mL measured 34.88, 17.58, 8.44 and 10.48%, respectively. From the results, the antioxidant and antiproliferative activities of *G. biloba* sarcotesta extracts increased with heat treatment, and research on the identification of the structure for the active compounds are needed in further studies.

Key words: *Ginkgo biloba* sarcotesta, heat treatment, physiological activity

서 론

은행나무(*Ginkgo biloba* L.)는 암·수나무가 각각 다른 낙엽성 교목으로, 정원수나 가로수로 많이 사용되고 있다. 잎은 길이 4~8 cm, 너비 5~10 cm로 부채꼴을 하고 있으며, 은행열매는 핵과의 모양으로 노랗고 약취가 나는 외종피와 딱딱하고 흰색인 내종피로 되어 있다(Chung & Shin 1990). 은행나무는 2억년 전부터 지구에 자생한 식물 중 하나로, 그 잎과 열매는 약용으로 사용되어 왔다. 은행잎에 대한 성분 연구는 활발히 진행되어 있는데, 특히 flavonoids, diterpenes, sesquiterpenes, polyphenol 및 유기산 등이 약리작용을 나타내는 것으로 보고되었다(Kim 등 2004). 은행잎 추출물을 이용한 순환장애, 뇌

혈관 질환 등의 치료에 효과가 보고된 이후, 약재로 개발되어 현재 여러 나라에서 다양한 형태로 판매 및 사용되고 있다(Singh 등 2008). 하지만 은행잎과는 달리 은행 외종피는 고약한 냄새와 알러지를 유발하여 이용되지 못하고, 대부분 폐기되고 있는 실정이다.

은행과 관련된 연구는 주로 잎과 종실의 생리활성 평가에 관하여 이루어졌는데, Han 등(2006)은 국내 자생 식물 23종의 항산화 및 항균활성 평가 연구에서 은행 종실의 항산화 활성이 높게 나타났으며, 식품 위해 미생물에 대한 항균활성이 높다고 하였다. 또한 은행잎에 함유된 ginkoflavone glycosides 및 ginkgolides A, B 및 C 성분의 혈액 순환 및 혈행 개선 활성에 대한 연구가 진행되었으며(Birkle 등 1988; Bombardelli & Spelta

[†] Corresponding author: Heon Sang Jeong, Dept. of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea. Tel: +82-43-261-2570, Fax: +82-43-271-4412, E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr

1990; Park & Park 1990), 은행 종실로부터 알리지 성분의 분리에 대한 연구가 진행되었다(Yang 등 2011). 또한 은행 잎, 종실 및 외종피 추출물의 항균활성을 평가한 연구에서 물 추출물보다 에탄올과 메탄올 추출물에서 강한 항균활성을 보였으며, 외종피의 chloroform 분획물에서 가장 높은 항균활성을 보여 항균제로서의 가능성을 제시하였다(Park & Cho 2011). 또한 Choi 등(2009)은 은행 외종피로부터 항균활성물질을 분리하여 hydroxyalkenyl salicylic acids임을 밝혔으며, Wu 등(2011)은 은행 외종피로부터 위암(AGS 및 SGC) 세포주 억제 활성을 갖는 저분자 다당체들을 분리하여 보고하였다.

식품의 열처리가능은 살균, 멸균, 효소반응 정지를 일으키기 위해서 가열하는 가공방법으로, 열처리 방법에는 roasting, boiling, blanching 및 autoclaving 등이 있으며, 일반적으로 식품의 품질을 향상시키고, 저장수명을 연장하기 위하여 사용되어왔다. 하지만 최근 여러 과일 및 채소의 열처리 연구(Hwang 등 2006; Kim 등 2008; Lee 등 2009; Jang 등 2012)에서 열처리 시 페놀성 화합물 및 항산화 활성을 나타내는 Maillard 반응 중간생성물들이 증가한다고 보고하였다. 이처럼 열처리공정을 적용한 식품의 기능성 증가에 관한 연구가 활발히 진행되고 있지만, 은행 외종피의 열처리에 따른 다양한 생리활성 변화에 관한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 은행 생산 시 부산물로 폐기되는 외종피의 활용방안을 모색하기 위하여, 열처리를 통한 항산화, 항당뇨, 항고혈압, 항염 및 항비만 활성 등의 생리활성 변화를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 열처리 방법

본 연구에서 사용된 은행은 충북 청원군에서 생산된 것으로, 은행에서 은행 외종피만을 분리하고 분쇄한 후 -20°C 냉동고에 저장하면서 시료로 사용하였다. 열처리는 시료 10 g 과 증류수 20 mL를 넣고 실시하였다. 열처리장치(JISCO, Seoul, Korea)는 10 kg/cm^2 이상의 압력에도 견딜 수 있도록 고안된 것으로 가열에 의해 증기압을 발생시키는 외부용기, 안전변과 공기배출구, 압력계이자로 구성된 개폐부 및 시료를 넣는 내부 용기로 구성되어 있다. 열처리 온도와 시간은 예비실험 및 선행연구(Hwang 등 2006; Kim 등 2008; Lee 등 2009; Jang 등 2012)를 참고하여 성분 및 생리활성 변화가 크게 나타나는 130°C 로 설정하였으며, 열처리 시간은 2시간으로 하였다.

2. 추출물 제조

열처리 전후 은행 외종피에 증류수, 70% 에탄올 및 80% 메탄올 각각 180 mL를 가하여 초음파 추출장치(SD-350H, Seong

Dong, Seoul, Korea)로 1시간씩 3회 반복 추출한 다음, 추출액을 감압여과(Whatman No.2)하였다. 추출여과액을 회전식 진공농축기(N-1000, Eylea, Tokyo, Japan)로 40°C 에서 용매를 완전히 제거한 후 동결건조(Modulyod-115, Thermo Electron Co., Waltham, MA, USA)하여 -20°C 에 보관하면서 시료로 사용하였다.

3. 자유라디칼 소거 활성

열처리 전후 은행 외종피 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성은 Dewanto 등(2002)의 방법에 의하여 측정하였다. 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS, Sigma) 7.4 mM 과 potassium persulfate 2.6 mM을 하루 동안 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 후, 이 용액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.4~1.5가 되도록 물 흡광계수($\epsilon=3.6\times 10^4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL에 추출액 50 μL 를 가하여 60분 후 흡광도의 변화를 측정하였으며, 표준물질로서 L-ascorbic acid를 동량 첨가하여 mg AA eq/g으로 나타내었다. 열처리 전후 은행 외종피 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 Choi 등(2003)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액 0.8 mL에 시료 0.2 mL를 첨가하고, 실온에서 30분 반응 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다(UV/VIS PC-1650, Shimadzu, Kyoto, Japan). 이때 DPPH 라디칼 소거 활성은 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 mg trolox eq/g으로 나타내었다.

4. α -Glucosidase 저해 활성

열처리 전후 은행 외종피 추출물의 α -glucosidase 저해 활성은 Kim 등(2004)의 방법에 따라 측정하였다. α -Glucosidase (0.35 U/mL)와 p -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside(1.5 mM, pNPG)는 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해하여 사용하였으며, 각각의 추출물 50 μL 를 0.35 unit/mL α -glucosidase 효소액 100 μL 와 혼합하여 37°C 에서 10분간 전배양한 후 1.5 mM pNPG 50 μL 를 가하여 37°C 에서 20분간 반응시켰다. 1M Na_2CO_3 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후 ELISA(UV-1650PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고, 저해율(%)을 계산하였으며, 양성대조군으로 acarbose (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다.

5. Angiotensin converting enzyme I(ACE) 저해 활성

열처리 전후 은행 외종피 추출물의 ACE 저해 활성은 Cushman & Cheung(1971)의 방법을 변형하여 측정하였다. ACE 저해 활성 측정에 사용된 5 mM Hippuryl-His-Leu(HHL, Sigma-Aldrich Co.) 기질은 0.3 M NaCl이 함유된 0.1 M potassium phosphate

buffer(pH 8.3)에 용해하였으며, 0.2 mU ACE 정제효소는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 용해하여 사용하였다. 추출물 100 μ L에 0.2 mU ACE 정제효소액 80 μ L와 5 mM HHL 기질 100 μ L를 가한 다음, 37°C에서 60분 방치한 다음 1 M HCl 250 μ L를 가하여 반응을 정지시킨 후 0.45 μ m syringe filter로 여과하였으며, HPLC(ACME 9000 system, Younglin, Anyang, Korea)로 분석하여 ACE 저해율(%)을 계산하였다. 이때 칼럼은 C-18(Mightysil RP-18 GP column, 4.6250 mm, Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan), 이동상은 A를 10 mM phosphoric acid(pH 2.5), B를 methanol로 사용하여 A:B의 초기비율을 100:0으로 시작하여 12분에 40:60, 19분에 0:100, 25분에 100:0의 비율로 단계적인 gradient system을 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 흘러주었고, 시료주입량은 20 μ L, 검출기는 UV-detector (228 nm)를 사용하였다.

6. RAW 264.7 세포를 이용한 산화질소 생성억제 활성

열처리 전후 은행 외종피 추출물의 항염증 활성을 평가하기 위하여 산화질소(nitric oxide, NO)를 측정하였다. RAW 264.7 세포를 10% FBS 함유 DMEM-FBS에서 1×10^6 cells/mL로 조정하여 96-well plate에 200 μ L씩 분주한 다음, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 세포를 부착시켰다. 12시간 뒤 배양액을 제거하고 DMEM-FBS 160 μ L와 시료 20 μ L를 함께 첨가하고, 30분 후에 LPS를 처리하여 48시간 배양하였다. LPS로 유도된 NO 측정은 세포 배양 상등액을 50-100 μ L 취하여 Griess 시약 반응법(Park 등 2005)을 이용하여 측정하고, LPS 처리군에 대한 억제율(%)로 나타내었다.

7. 지방세포 분화 억제 활성

본 실험에 사용된 3T3-L1 preadipocyte는 ATCC(CL-193, Manassas, VA, USA)에서 분양 받았으며, 세포 증식은 10% bovine calf serum(Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA)과 100 units/mL penicillin 및 50 μ g/mL streptomycin이 함유된 DMEM을 이용하였으며, 분화 유도 및 성숙배지로는 10% fetal bovine serum(FBS, HyClone, Logan, UT, USA)과 100 units/mL penicillin 및 50 μ g/mL streptomycin이 함유된 DMEM을 이용하였다. Preadipocyte를 6-well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 seeding한 뒤, 세포가 confluent stage에 도달하면 5 μ g/mL의 insulin(Sigma-Aldrich)과 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(Sigma-Aldrich) 및 1 μ M dexamethasone(Sigma-Aldrich)을 첨가한 10% FBS-DMEM을 사용하여 이틀간 분화 유도하였으며, 분화 유도 후 2일 동안 insulin만 첨가한 배지를 이용함으로써 지방세포를 성숙시켰다. 이후 2일 간격으로 10% FBS만이 함유된 DMEM으로 배지를 교환하면서 세포의 지방분화 상태를 확인하였다. Preadipocyte의 분화 및 성숙 6

일 후에 배지를 제거한 뒤 phosphate-buffered saline(PBS)을 이용하여 세척하였다. 그 뒤 10% formalin 용액을 이용하여 세포를 고정하고 세포내 생성된 lipid droplet과 특이적으로 반응하는 0.3% Oil Red O 용액을 이용하여 염색하였다. 염색된 세포는 현미경 관찰 후 isopropanol을 이용하여 용해한 뒤 495 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군의 흡광도 값에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

8. 암세포 배양 및 암세포주 성장 억제 활성

본 실험에서 사용된 유방암세포(MCF-7; breast adenocarcinoma, KCLB 30022)는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)와 100 U/mL penicillin G, 50 μ g/mL streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 및 DMEM (Gibco Co., NY, USA)을 사용하여 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포밀도가 높아지면 5분간 trypsin-EDTA를 처리하여 계대배양을 실시하였다. 열처리 전후 은행 외종피 추출물의 암세포 성장억제 효과는 Ishiyama 등(1996)의 방법에 따라 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay로 측정하였다. 즉, 1×10^5 cell/well 농도로 96 well plate에 100 μ L씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 시료는 일정농도가 되도록 DMSO로 희석하여 사용하였으며, 배양에 사용된 배지를 제거하고, 배지에 일정 농도로 희석된 시료를 첨가하여 다시 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 2 mg/mL 농도의 MTT시약을 well당 10 μ L씩 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 후 MTT시약이 포함된 배지를 제거하고, DMSO 100 μ L를 가한 후 상온에서 발색시키고, ELISA microplate reader(ELx 808, Bio-Tek Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 암세포증식 억제율은 생존율로 표시하였다.

9. 통계처리

통계분석은 SPSS(Statistical package for social sciences, version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균과 표준편차를 산출하고, one-way ANOVA 분석을 실시한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성($P < 0.05$)을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 자유라디칼 소거 활성

열처리 전후 은행 외종피 추출물의 항산화 활성으로 ABTS와 DPPH 자유라디칼 소거활성을 평가한 결과는 Fig. 1과 같다. ABTS 자유라디칼 소거활성을 살펴보면 열처리 전에는 80% 메탄올 추출물이 13.86 mg AAE/g으로 높게 나타났으며, 그 다음으로는 70% 에탄올, 물 추출물 순이었다. 열처리 후

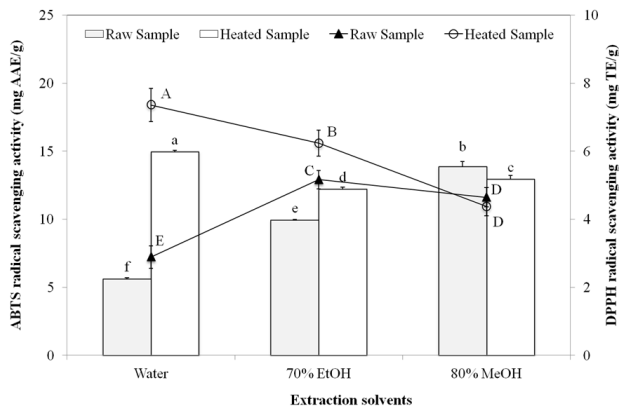


Fig. 1. Changes in ABTS and DPPH radical scavenging activities of *Ginkgo biloba* sarcotesta extracts before (raw sample) and after heat treatment (heated sample). Bars and lines indicate a radical scavenging activities of ABTS and DPPH, respectively. Different capital and small letters on the error bar indicate a significant difference ($P<0.05$) among DPPH and ABTS radical scavenging activity by Duncan's multiple range test, respectively.

에는 물과 70% 에탄올 추출물이 각각 14.95 및 12.20 mg AAE/g으로 열처리 전에 비하여 증가하였지만($P<0.05$), 80% 메탄올 추출물은 12.94 mg AAE/g으로 감소하였다($P<0.05$). DPPH 자유라디칼 소거활성의 경우, 열처리 전에는 70% 에탄올 추출물이 5.17 mg TE/g으로 가장 높았으며, 열처리 후에는 물과 70% 에탄올 추출물이 각각 7.36 및 6.23 mg TE/g으로 증가하였지만($P<0.05$), 80% 메탄올 추출물은 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). Kim ST(2015)는 은행 외종피를 열처리한 결과, 물과 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량이 증가하였으나, 80% 메탄올 추출물은 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고하였다. 이는 열처리 시 항산화 효과를 나타내는 대표적인 물질인 페놀성 화합물이 결합형에서 유리형으로 전환되어 용출이 용이해지거나, 고분자 페놀 화합물이 저분자 페놀 화합물로 분해되어 총 페놀성 함량이 증가되어 항산화 활성이 증가된 것으로 판단된다(Hwang 등 2006; Kim 등 2008; Lee 등 2009; Jang 등 2012). 또한 열처리 시 항산화 활성을 가진 Maillard 반응의 부산물의 형성에 의해 항산화 효과가 증가되었을 것으로 생각된다(Hwang 등 2011a).

2. α -Glucosidase 저해 활성

열처리 전후 은행 외종피 추출물의 α -glucosidase 저해 활성을 0.1 mg/mL의 농도에서 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 열처리 전에는 80% 메탄올 추출물이 98.66%로 가장 높은 α -glucosidase 저해 활성을 보였으며, 물과 70% 에탄올 추출물은 각각 11.64%와 32.85%로 낮게 나타났다. 열처리 후에는

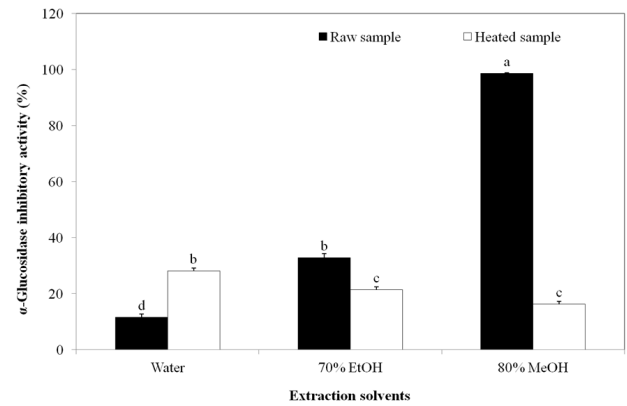


Fig. 2. Changes in α -glucosidase inhibitory activities of *Ginkgo biloba* sarcotesta extracts before (raw sample) and after heat treatment (heated sample). Different small letters on the error bar indicate a significant difference ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

물 추출물이 28.20%로 증가한 반면, 70% 에탄올과 80% 메탄올 추출물은 각각 21.47%와 16.29%로 크게 감소하였다. Pinto 등(2009)의 연구에서 은행의 *in vitro* 항당뇨 활성을 평가한 결과, 물과 에탄올 추출물에서 농도 의존적인 α -glucosidase 저해 활성을 보였고, 에탄올 추출물에서 상대적으로 높은 α -glucosidase 저해 활성을 보였다고 하였으며, 또한 Hwang 등(2011a)은 당-아미노산 모델 시스템을 이용한 Maillard 반응물 중 fructose-와 glucose-tyrosine 반응물이 높은 α -glucosidase 억제활성을 갖는 것을 확인하였으며, 이로부터 2,4-bis(*p*-hydroxyphenyl)-2-butenal을 분리하였다(Hwang 등 2011b). 은행 외종피에 함유된 α -glucosidase 억제활성 물질은 80% 메탄올에 추출되기 쉬우며, 열에 불안정하여 분해되거나, 다른 물질로 전환되는 것으로 생각된다.

3. ACE 저해 활성

열처리 전후 은행 외종피 추출물의 ACE 저해 활성을 1 mg/mL의 농도에서 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 열처리 전에는 모든 추출용매에서 18.96~21.62%로 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 열처리 후에는 물, 70% 에탄올 및 80% 메탄올 추출물이 각각 7.32, 13.09 및 7.78%로 감소하였다. 은행잎 존재하는 ginkoflavone glycosides 및 ginkgolides A, B 및 C 성분은 칼슘이온 농도 저하, 심수축 저하, 혈소판 응집 억제 작용 등으로 혈액 순환 및 혈행 개선 효과가 보고되었지만(Birkle 등 1988; Bombardelli & Spelta 1990; Park & Park 1990), 은행 외종피에는 그 함량은 적으며, 열안정성이 낮다고 보고되었는데(Goh & Barlow 2002), 본 연구결과 ACE 저해 활성 물질들이 열처리에 의해 분해 또는 불활성화되어 활성이 감소된 것으로 판단된다.

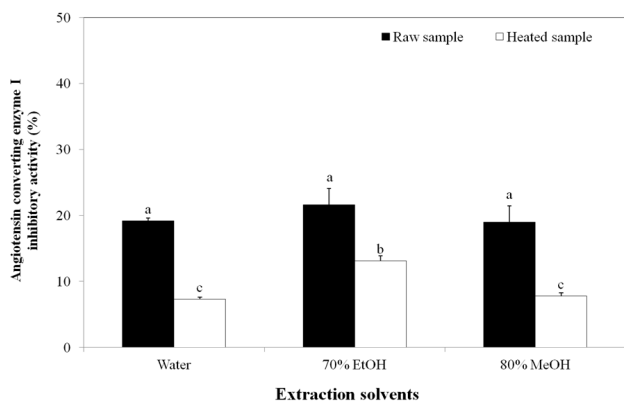


Fig. 3. Changes in angiotensin converting enzyme I inhibitory activities of *Ginko biloba sarcotesta* extracts before (raw sample) and after heat treatment (heated sample). Different small letters on the error bar indicate a significant difference ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

4. 산화질소 생성억제 활성

열처리 전후 은행 외종피 추출물의 항염증 활성을 평가하기 위하여 RAW 264.7 세포에 대한 농도별 세포생존율과 산화질소(nitric oxide, NO) 생성억제 활성을 측정하였다. 열처리 전후 은행 외종피 추출물을 100과 200 µg/mL의 농도로 RAW 264.7 세포에 처리한 결과, 모든 처리구에서 독성을 나타내지 않아, 이 농도에서 NO 생성억제 활성을 평가하였다 (data not shown). 열처리 전 은행 외종피의 80% 메탄올 추출물은 100 µg/mL의 농도에서 47.27 µM로 LPS 처리구의 44.64 µM과 큰 차이를 보이지 않았지만, 200 µg/mL의 농도에서는

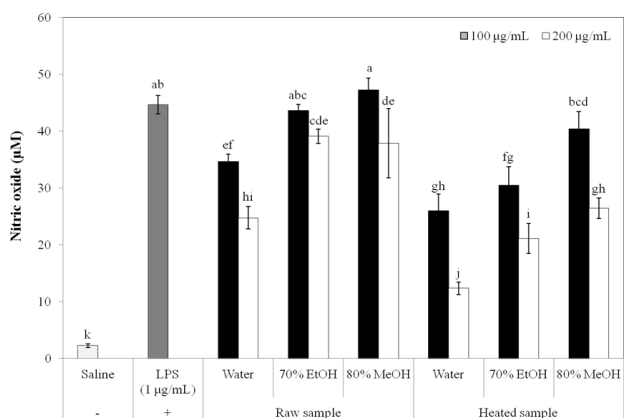


Fig. 4. Changes in nitric oxide production inhibitory activities of *Ginko biloba sarcotesta* extracts before (raw sample) and after heat treatment (heated sample) in LPS-induced RAW 264.7 cell line. Different small letters on the error bar indicate a significant difference ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

37.86 µM로 감소하였다(Fig. 4, $P<0.05$). 특히 물 추출물의 경우, 두 농도구간에서 각각 34.67 µM과 25.97 µM로 높은 NO 생성억제 활성을 보였다. 열처리 후 은행 외종피 추출물의 NO 생성억제 활성은 열처리 전보다 증가하여 물 추출물은 200 µg/mL의 농도에서 12.33 µM로 높은 NO 생성억제 활성 (LPS 처리구의 72.39% 감소)을 보였다.

5. 지방세포 분화 억제 활성

열처리 전후 은행 외종피 추출물의 항비만 활성을 평가하기 위하여 3T3-L1 전지방 세포에 대한 농도별 세포생존율과 지방구 생성억제 활성을 측정하였다. 열처리 전후 은행 외종피 추출물을 100과 200 µg/mL의 농도로 3T3-L1 세포에 처리한 결과, 모든 처리구에서 독성을 나타내지 않아 이 농도에서 지방구 생성억제 활성을 평가하였다(data not shown). 열처리 전 은행 외종피의 80% 메탄올 추출물은 100과 200 µg/mL의 농도에서 각각 20.46 및 26.96%의 지방구 생성억제 활성을 보였으나, 농도에 의한 활성 차이는 없었다(Fig. 5, $P>0.05$). 열처리 전 물 추출물과 70% 에탄올 추출물 또한 대조구와 비교하여 각각 92.82 및 93.16%로 지방구 생성을 억제하였지만, 농도 의존적인 활성의 변화를 관찰할 수 없었다. 열처리 후 은행 외종피 추출물의 경우 모든 처리구에서 대조구에 비해 지방구 생성을 억제시키지 못하였다.

6. 유방암 세포주 성장억제 활성

열처리 전후 은행 외종피 추출물의 암세포주 성장억제 활성을 측정하기 위하여 MTT assay를 이용하여 유방암 세포주인 MCF-7의 세포 사멸능을 살펴본 결과는 Fig. 6과 같다. 물과 70% 에탄올 추출물의 경우 4가지 농도(125, 250, 500 및

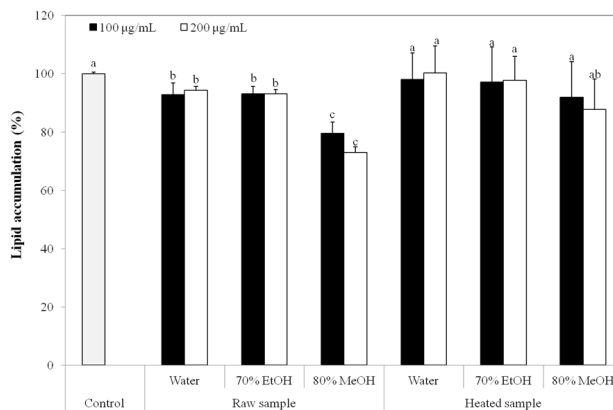


Fig. 5. Changes in lipid accumulation inhibitory activities of *Ginko biloba sarcotesta* extracts before (raw sample) and after heat treatment (heated sample) in 3T3-L1 adipocyte cell. Different small letters on the error bar indicate a significant difference ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

1,000 µg/mL)에서 농도 의존적으로 유방암 세포주 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 열처리 전 70% 에탄올 추출물과 열처리 후 물 추출물의 경우, 250 µg/mL 이상의 농도에서 각각 21.51%와 32.28%의 암세포주 생존율을 보였다(Fig. 6[A]). 80% 메탄올 추출의 경우 보다 낮은 농도(25, 50, 100 및 200 µg/mL)에서도 유방암 세포주 성장억제 활성을 보였으며, 특히 열처리 후 은행 외종피 80% 메탄올 추출물은 25 µg/mL의 농도에서 34.87%의 생존율을 보였다(Fig. 6[B]). Wu 등(2011)은 은행 외종피로부터 위암(AGS, SGC) 세포주 억제활성을 갖는 저분자 다당체들을 분리하여 보고하였다. 또한 열처리 시 생성되는 Maillard 반응생성물들이 항암 활성을 갖는다는 연구가 보고되었다(Hwang 등 2011a). 따라서 열처리에 의해 고분자 활성 다당체들이 저분자화 되거나, Maillard 반응생성물들에 의해 열처리 은행 외종피 추출물이 유방암 세포주에 대한 성장억제 활성을 보인 것으로 판단되며, 추후 활성을 나타내는 Maillard 반응생성물이 무엇인지에 대한 규명연구가 필요할 것으로 판단된다.

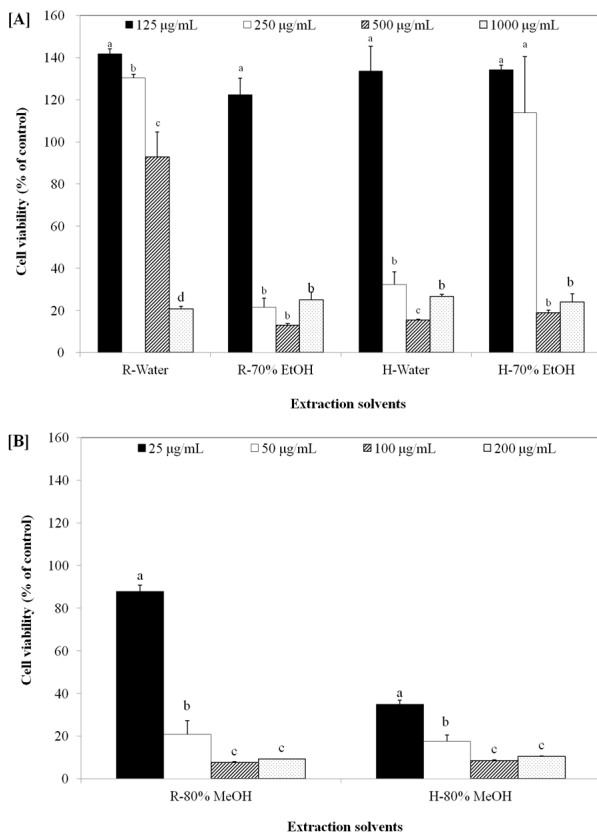


Fig. 6. Changes in antiproliferative activities of *Ginkgo biloba sarcotesta* extracts before (R) and after heat treatment (H) on the MCF-7 human breast cancer cell line. Different small letters on the error bar indicate a significant difference ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

요 약

은행 가공산업에서 부산물로 제거되는 은행 외종피의 활용성을 증대시키고자 다양한 생리활성에 미치는 열처리의 영향을 살펴보았다. 은행 외종피를 분리하여 130°C에서 2시간 열처리한 후 물, 70% 에탄올 및 80% 메탄올 추출물을 제조하여 생리활성변화를 살펴본 결과, ABTS와 DPPH 자유라디칼 소거활성은 80% 메탄올 추출물을 제외하고, 열처리 후 증가하는 경향을 보였으며, 물 추출물에서 각각 14.95 mg AAE/g과 7.36 mg TE/g으로 높게 나타났다. α-Glucosidase 저해 활성은 물 추출물을 제외하고 열처리 시 감소하는 경향을 보였으며, 열처리 전 80% 메탄올 추출물에서 98.66%로 가장 높게 나타났다. Angiotensin converting enzyme I 저해 활성은 추출물 간의 유의적인 차이가 없었으며($P > 0.05$), 열처리 후 모두 감소하였다. 산화질소 생성억제 활성은 열처리 시 증가하였으며, 물 추출물(200 µg/mL)이 12.33 µM로 LPS 처리구에 비해 산화질소 생성량을 72.39% 감소시켰다. 지방구 축적억제 활성은 세포독성을 보이지 않는 농도에서 열처리 시 감소하였다. 유방암 세포주에 대한 항암 활성은 열처리 후 증가하는 경향을 보였다. 이상의 결과로부터 은행 외종피 추출물의 다양한 생리활성을 확인하였으며, 특히 열처리 후 항산화 활성과 유방암 세포주에 대한 증식억제 활성이 크게 증가하였으며, 추후 생리활성물질의 규명 연구가 필요하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Birkle D, Kurian P, Braquet P, Bazan N. 1998. Platelet-activation factor antagonist BN 52021 decrease accumulation of free polyunsaturated fatty acid in mouse brain during ischemia and electroconvulsive shock. *J Neurochem* 51:1900-1905
- Bombardelli E, Seplta M. 1990. *Ginkgo biloba*: chemistry and therapy. 2nd seminar on "Utilization of botanical derivatives in pharmaceuticals, cosmetics and para-pharmaceuticals"
- Choi JG, Jeong SI, Ku CS, Sathishkumar M, Lee JJ, Mun SP, Kim SM. 2009. Antibacterial activity of hydroxyalkenyl salicylic acids from sarcotesta of *Ginkgo biloba* against vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Fitoterapia* 80:18-20
- Choi Y, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee J. 2003. The anti-

- oxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32:723-727
- Chung BS, Shin MG. 1990. Atlas of Herbal Medicine. Young Lim Sa, Seoul, Korea. pp. 122-124
- Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20:1637-1648
- Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50:3010-3014
- Goh LM, Barlow PJ. 2002. Antioxidant capacity of *Ginkgo biloba*. *Food Res Int* 35:815-820
- Han SH, Woo NRY, Lee SD, Kang MH. 2006. Antioxidative and antibacterial activities of endemic plants extracts in Korea. *Korean J Medicinal Crop Sci* 14:49-55
- Hwang IG, Kim HY, Woo KS, Lee J, Jeong HS. 2011a. Biological activities of Maillard reaction products (MRPs) in a sugar-amino acid model system. *Food Chem* 126:221-227
- Hwang IG, Kim HY, Woo KS, Hong JT, Hwang BY, Jung JK, Lee J, Jeong HS. 2011b. Isolation and characterisation of an α -glucosidase inhibitory substance from fructose-tyrosine Maillard reaction products. *Food Chem* 127:122-126
- Hwang IG, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Yang MH, Jeong HS. 2006. Change of physicochemical characteristics of Korean pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) juice with heat treatment conditions. *Korean J Food Sci Technol* 38:342-347
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1996. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19:1518-1520
- Jang GW, Kim HY, Lee SH, Kang YR, Hwang IG, Woo KS, Kang TS, Lee J, Jeong HS. 2012. Effects of heat treatment and extraction method on antioxidant activity of several medicine plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:914-920
- Kim HY, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Jeong HS. 2008. Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. *Korean J Food Sci Technol* 40:166-170
- Kim JM, Shu Ds, Kim YS, Kim KO. 2004. Physical and sensory properties of rice gruels and cakes containing different level of ginkgo nut powder. *Korean J Food Sci Technol* 36:410-415
- Kim ST. 2015. Physiological activities of heated *Ginkgo biloba* sarcotesta and identification of antiproliferative substances. M.S. Thesis, Chungbuk National Univ. Chungbuk. Korea.
- Kim YM, Wang MH, Rhee HI. 2004. A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydr Res* 339:715-717
- Lee SH, Hwang IG, Lee YR, Jeong EM, Jeong HS, Lee HB. 2009. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of heated radish (*Raphanus sativus* L.) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:490-495
- Park DK, Park HJ. 1990. Studies on the effects of rat platelet aggregation by Ginkgo and Perilla oil dietary. *J Korean Soc Food Nutr* 19:127-132
- Park E, Kum S, Wang C, Park SY, Kim BS, Schuller-Levis G. 2005. Anti-inflammatory activity of herbal medicines: inhibition of nitric oxide production and tumor necrosis factor- α secretion in an activated macrophage-like cell line. *Am J Chin Med* 33:415-424
- Park SB, Cho GS. 2011. Antimicrobial activity of extracts and fractions of *Ginkgo biloba* leaves, seed and outer seedcoat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:7-13
- Pinto MS, Know YI, Apostolidis E, Lajolo FM, Genovese MI, Shetty K. 2009. Potential of *Ginkgo biloba* L. leave in the management of hyperglycemia and hypertension using *in vitro* model. *Bioresour Technol* 100:6599-6609
- Singh B, Kaur P, Gopichand, Singh RD, Ahuja PS. 2008. Biology and chemistry of *Ginkgo biloba*. *Fitoterapia* 79:401-418
- Wu X, Mao G, Zhao T, Zhao J, Li F, Liang L, Yang L. 2011. Isolation, purification and *in vitro* anti-tumor activity of polysaccharide from *Ginkgo biloba* sarcotesta. *Carbohydr Polym* 86:1073-1076
- Yang JT, Wu CE, Li YY, Jia SQ, Fan GJ, Fang R. 2011. Identification and purification of an allergic glycoprotein from *Ginkgo biloba* kernel. *Agricultural Sciences in China* 10:631-641

Received 28 April, 2015

Revised 15 May, 2015

Accepted 9 June, 2015