

Antioxidant and Antiproliferating Effects of *Prunus mume* Vinegar Powder on Breast Cancer Cells

Wool-Lim Park¹, Jeong-Ho Kim², Ji-An Heo³, Yeong-Seon Won³ and Kwon-Il Seo^{3*}

¹Department of Applied Bioscience, Dong-A University, Busan 49315, Korea

²Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

³Department of Food Biotechnology, Dong-A University, Busan 49315, Korea

Received September 21, 2020 / Revised October 26, 2020 / Accepted October 26, 2020

Prunus mume Sieb. et Zucc is widely distributed in East Asia (Korea, Japan, and China), and its fruit is often used as a medication and food material. However, because most previous studies have only investigated the state of *Prunus mume* fruit extract, studies on the various ways of processing this extract are still needed to increase its utilization. In this study, we evaluated the physicochemical properties and physiological activities of spray-dried *Prunus mume* vinegar powder (SPP). The sugar content, pH, total acidity, and moisture content of the SPP were 8.90 °Brix, 3.19, 1.05%, and 3.07%, respectively. The SPP exhibited significantly high antioxidant activity in terms of DPPH radical scavenging activity (65.55%), reducing power (1.48), and hydrogen peroxide scavenging activity (48.07%). In addition, the SPP remarkably decreased the cell viability of human breast MDA-MB-231 and human skin cancer SK-MEL-28 in a dose-dependent manner. The morphological results of the treatment of MDA-MB-231 cells with SPP were distorted, shrunken cell masses. Furthermore, apoptotic bodies and nuclear condensation formed in the SPP-treated MDA-MB-231 cells. The total polyphenol and flavonoid contents of the SPP were 59.58 µg/g (gallic acid equivalent) and 57.56 µg/g (quercetin equivalent). The results of this study indicate that SPP, which has antioxidant activity and anticancer effects, can be useful in the development of natural medicines and functional food ingredients.

Key words : Antioxidant, antiproliferation, human breast cancer, spray-dried *Prunus mume* vinegar powder

서 론

활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 호흡을 통해 체내에 유입된 산소를 소비하는 과정에서 생성되는 부산물로 hydroxyl radical, superoxide anion, singlet oxygen, hydrogen peroxide 등이 있다[9, 44]. 체내에 활성 산소종이 적정량 존재할 때에는 세포내 신호전달, 백혈구 세포의 활성화 등의 세포기능에서 중요한 역할을 담당한다[3]. 반면에 활성 산소종이 체내에 과잉 생성되면 산화적 스트레스를 일으켜 DNA 변형, 지질과산화 및 효소 불활성화 등을 초래하여 세포를 손상시켜 암을 비롯하여 알츠하이머병, 심장질환, 고혈압, 동맥경화, 염증작용, 세포의 노화, 파킨슨병 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 보고되고 있다[44, 50]. 이러한 활성 산소종은 항산화물질에 의해 제거되는데 항산화물질은 체내에서 존재하는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-

Px) 및 catalase (CAT) 등의 항산화효소와 천연자원 속에 존재하는 phenol 화합물, ascorbic acid, glutathione 등의 천연 항산화제가 있다[21, 30, 38]. 이 중에서도 가장 대표적인 합성 항산화제인 BHT (butylated hydroxyl toluene)와 BHA (butylated hydroxyanisole)가 식품첨가물로 주로 사용되었으나 고용량으로 장기간 복용 시 암을 유발시킨다는 보고가 있어 부작용에 대한 안전성 문제로 사용량이나 사용 방식에 대한 법적인 규제가 시행되고 있다[29, 47, 51]. 이에 부작용이 없는 천연 항산화물질에 대한 연구가 더욱 활발히 이루어지고 있으며, 최근에는 동충하초, 홍차, 솔잎, 코코아 발효물 등을 이용한 기능성 음료를 비롯하여 생지황 분말, 숙지황 분말, 천마 분말 및 발효 천마 분말 등의 다양한 소재를 이용한 항산화 활성이 있는 기능성 분말에 대한 연구가 이루어지고 있다[25, 36, 39].

암은 정상 세포가 비정상적인 세포로 변이가 일어나 무한 증식하여 몸 전체로 전이되어 인간의 생명을 위협하는 질병으로 최근 10여 년간 국내에서도 사망률이 가장 높은 요인으로 보고되고 있어 암의 치료 및 예방을 위한 연구가 지속적으로 요구되고 있다[8, 27, 42]. 그 중 유방암은 주로 서양의 여성들에게 발병하였으나 최근 한국을 포함한 산업화된 아시아 국가에서 식생활의 서구화 등으로 인하여 급격히 발병률이 높아지고 있는 추세이며, 특히 국내의 여성들의 경우 모든 암 중에서 두 번째로 많이 발병한다고 알려져 있다[17]. 암의 발병은 환경

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7565, Fax : +82-51-200-7505

E-mail : kseo@dau.ac.kr

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.

적인 요인과 유전적인 요인이 있으며, 암 환자의 약 80-90%는 환경적인 요인에 의한 발병으로 보고되고 있다[27]. 기존의 암을 치료하기 위한 방법으로 면역요법, 방사선, 화학요법 등 다양한 치료법들이 있으나 부작용 및 암의 재발, 독성 등의 문제로 인하여 암 치료에 한계를 가지고 있다[34, 48, 49]. 따라서 최근에는 항암 효과가 있는 천연물에 대한 개발 및 연구가 활발히 진행되고 있다[49].

매실(*Prunus mume*)은 장미과에 속하는 낙엽활엽교목인 매화나무의 열매로, 주로 한국, 중국, 대만 및 일본 등에 분포하며, 한방에서 지리, 해독, 구충 및 건위 등에 효과를 나타내는 한약재로 쓰여 왔다[45, 46]. 매실은 알칼리성 식품으로 미네랄이 풍부하며, malic acid와 citric acid 등의 유기산을 함유하고 있어 피로회복, 항산화, 간기능 개선, 항혈전, 항당뇨, 항균 및 항암 등 다양한 생리 활성 효능이 있는 것으로 알려져 있다[28, 38]. 또한 기능성 매실 음료를 이용한 위암, 간암 및 대장암 등의 각종 암세포주 증식을 억제하는 항암효과가 연구되어 있다[2].

분무 건조는 뜨거운 매체 속에 액상 시료를 분무 및 건조시켜 분말의 형태로 만드는 방식으로, 건조시간이 짧아 열에 의한 성분의 변화가 거의 없어, 열에 민감한 물질도 건조가 가능하고, 좋은 유동성과 용해성을 가진 분말을 제조할 수 있다[5, 43]. 액상의 시료를 고체의 droplet 형태로 가공하여 톤 단위로 scale-up이 가능하다는 장점이 있으며, 분무 건조 공정은 기능성 소재산업에서 일반적으로 동결건조와 함께 많이 사용되고 있다[5, 40, 43]. 또한 국내에서 매실을 이용하여 기능성 및 가공 기술에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나 매실은 주로 생과로 섭취하기 보다는 대부분 매실주, 매실엑기스, 매실환 및 매실차 등의 절임가공식품으로 가공하여 소비되고 있다[2, 12, 46]. 이에 매실을 이용한 다양한 가공식품의 개발이 필요할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 제조한 매실 식초를 분무건조법으로 가공하여 분말화시킨 매실 식초 분말의 항산화 및 암세포 증식 억제 효과를 평가하여 기능성 식품으로서의 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

매실 식초 분말제조

본 연구진은 이전 연구에서 Kim 등[22]의 방법을 참고하여 제조한 매실 식초를 분무건조에 사용하였다. 매실 식초 분말의 제조를 위하여 사용한 분무건조기는 Mini-spray Dryer B-191 (Buchi Labortechnik AG, Switzerland)를 사용하였다. 운전 조건은 atomizer nozzle의 spray air flow 600 l/hr, aspirator의 air flow rate 31.5 m³/hr, feed flow 54 ml/hr, inlet temperature 120°C로 조절하였다. 매실 식초와 텍스트린을 68.6:31.4 (v/w) 비율로 혼합한 후 균질화시켜 액상을 만든 후 분무건조기에 투입하여 매실 식초 분말을 제조하였다. 제조된 매실 식

초 분말은 4°C에 보관하면서, 증류수로 희석하여 실험에 사용하였다.

매실 식초 분말의 이화학적 특성

매실 식초 분말을 증류수로 0.1 g/ml의 농도로 용해하여 측정하였다. pH는 pH meter (Metrohm 691, Swiss)로 측정하였으며, 총산도는 시료를 6배로 희석한 후 5 ml를 0.1 N NaOH 용액을 이용해 pH 8.3이 될 때까지 적정하고 100 ml당 acetic acid의 양으로 계산하였다. 당도는 당도계(Atago Pocket PAL-3, Atago Co., Japan)에 시료 300 μ l를 취해서 측정하여 °Brix로 표기하였다. 수분 함량은 105°C 상압가열건조법에 따라 분석하였다.

매실 식초 분말의 항산화 활성

매실 식초 분말의 농도별 DPPH radical 소거활성은 Blois 방법[4]에 대한 α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazine (DPPH)의 환원성을 이용하여 UV/Vis-spectrometer (Hitachi, Tokyo, Japan)로 517 nm에서 측정하였다. 증류수를 이용하여 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml 및 50 mg/ml 농도로 희석한 매실 식초 분말 용액 및 대조구로 사용한 0.1% α -tocopherol와 0.1% dibutylated hydroxytoluene (BHT) 1 ml에 각각 0.4 mM DPPH 용액 3 ml를 vortex mixer로 5초 동안 혼합하여 첨가한 후 이를 암소에서 30분간 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. Control은 시료 대신 에탄올 1 ml를 첨가하여 control에 대한 흡광도의 감소비율로 나타내었다.

매실식초 분말의 환원력은 Yildirim 등[52]의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 매실식초 분말을 각 농도별로 1 ml에 인산완충용액(0.2 M, pH 6.6) 2.5 ml과 potassium ferricyanide (1%, w/v) 2.5 ml를 첨가하여 섞은 후, 30분간 50°C로 유지하면서 반응시켰다. 반응액에 trichloroacetic acid (10%, w/v)를 2.5 ml를 첨가한 후 10분간 3,000 rpm으로 원심분리 하였다. 상층액의 1 ml를 취해 시험관에 담고 1 ml의 증류수와 0.2 ml의 FeCl₃ (0.1%, w/v)을 첨가하여 UV/Vis-spectrophotometer (Hitachi)로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

과산화수소(H₂O₂) 소거활성능은 Müller의 방법[35]에 따라 96 microwell plate에 시료 100 μ l를 넣어 혼합시켰다. 여기에 hydrogen peroxide (Junsei Chemical Co., Ltd, Japan) 20 μ l를 첨가시키고 incubator를 37°C로 유지하여 5분간 반응시켰다. 반응이 다 끝난 후, peroxidase (1 unit/ml; Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA)와 1.25 mM ABTS (Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA)를 각각 30 μ l씩 첨가하여 최종적으로 37°C의 incubator에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법에 따라 측정하였

다[11]. 매실 식초 분말을 증류수에 50 mg/ml로 용해시킨 시료 0.1 ml에 8.4 ml의 증류수와 0.5 ml의 2 N Folin-Ciocalten 시약(Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA)를 첨가하고 20% Na₂CO₃ (Junsei Chemical Co., Ltd, Japan) 1 ml를 가하여 2시간 방치하였다. 반응물의 흡광도는 UV/Vis-spectrophotometer (U-1800, Hitachi)를 사용하여 725 nm에서 측정하였고, gallic acid (Sigma-Aldrich, Co.)를 이용한 표준곡선으로 양을 환산하였다.

총 플라보노이드 함량은 Abdel-Hameed의 방법[1]을 변형하여 10배로 희석한 시료 1 ml에 0.15 ml의 5% sodium nitrite을 가한 후 6분간 25°C에서 반응시킨 후 0.3 ml의 10% aluminum chloride을 가하여 5분간 방치하였다. 반응이 끝난 후 1 N NaOH 1 ml를 가하고 교반하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였으며, rutin hydrate (Sigma-Aldrich Co.)를 이용한 표준곡선으로 양을 환산하였다.

암세포 배양

본 실험에 사용한 HT-29 인체 대장암 세포, MDA-MB-231 인체 유방암 세포, PC-3 인체 전립선암 세포, SK-MEL-28 인체 피부암 세포 및 HMEC 인체 유방정상세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양 받아 100 unit/ml의 Antibiotic Antimycotic (GIBCO®/Invitrogen™, Gran Island, NY, USA)와 10% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO®/Invitrogen™)를 첨가한 각각의 RPMI1640, DMEM (GIBCO®/Invitrogen™) 및 MEM 배지(Lonza, Basel, Switzerland)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에서 계대배양하여 사용하였다.

암세포 증식 억제능 측정

암세포 증식 억제 활성은 sulforhodamine B (SRB, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)법을 이용하여 측정하였다. SRB법은 생존 세포 내의 단백질 총량을 흡광도로 측정하여 세포 사멸 정도를 확인하는 방법으로 trichloroacetic acid (TCA, SigmaAldrich Co.)에 의해 생존 세포의 단백질 내 염기성 아미노산 잔기가 SRB와 결합하여 Tris-buffer의 처리에 의해 흡광도를 나타낸다. 암세포 증식 억제능은 세포를 2×10⁴ cells/ml가 되도록 희석하여 48 well plate에 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 시료를 배지에 농도별로 희석하여 첨가하고 72시간 동안 반응시켰다. 반응 후 12% TCA를 넣고 4°C에서 세포를 고정시키고 각 well을 세척한 후 0.4% SRB 용액을 이용하여 염색하였다. 염색 종료 후 1% acetic acid (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)로 세척하고 10 mM Tris-buffer (Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하였다. 마지막으로 상등액을 96 well plate에 옮겨 540 nm에서 microplate reader (Titertek Multiscan Plus, Labsystems, Espoo, Finland)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

세포 집락형성 분석법(Clonogenic assay)

세포 집락형성 분석법은 Franken 등의 방법을 이용하였다 [10]. 암세포를 2×10⁴ cells/ml가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 매실 식초 분말을 농도별로 배지에 희석하여 well plate에 처리하고 72시간 동안 반응시켰다. 이후 6 well plate의 배지를 제거하고 1x PBS buffer로 헹군 후 0.5% crystal violet와 6.0% glutaraldehyde 혼합물을 실온에서 첨가하였다. 30분 동안 세포 고정 및 염색 후 6 well plate를 증류수로 세척하고 실온에 건조시킨 후 colony 형성 능력을 관찰하였다. Colony formation는 ImageJ software를 사용하여 나타냈다.

암세포 형태의 관찰

암세포 형태의 관찰은 암세포를 2×10⁴ cells/ml가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 매실 식초 분말을 농도별로 배지에 희석하여 well plate에 처리하고 72시간 동안 반응시켰다. 이후 세포의 형태학적 변화는 200배율의 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 이용하여 관찰하고 사진을 촬영하였다. Cell number는 ImageJ software를 사용하여 나타냈다.

세포 핵 응축의 형태학적 관찰

세포 핵 응축의 형태학적 관찰은 Hoechst 형광염색법을 이용하여 측정하였다. 단일층으로 배양한 각 세포를 0.25% Trypsin- EDTA용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 배양액으로 최종 농도가 2×10⁴ cells/ml가 되도록 희석하여 6 well plate에 3 ml씩 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 preincubation하였다. 24시간이 지난 후 각 well의 배양액을 제거한 후 다양한 농도로 준비한 시료가 포함된 새 배양액을 well에 첨가하고 72시간 더 반응시켰다. 반응이 종료된 well에서 희석한 세포를 PBS로 2회 세척하고 2 µg/ml의 Hoechst (bis-benzimide)를 첨가하여 실온에서 20분 염색한 후 다시 PBS로 2회 세척하고 confocal microscope (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan)으로 세포를 관찰하고 200배율로 사진을 획득하였다.

통계처리

통계분석은 각 시료군 간의 유의적인 변화를 one-way ANOVA로 분석하였으며, 3 반복에 대한 평균 및 표준편차로 표시하였고, SRB assay의 각 군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's *t*-test를 실시하여 판정하였다(**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001). 항산화 활성의 각 군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Duncan's multiple rage test를 통해 나타내었다.

Table 1. Physicochemical properties of SPP

Contents	SPP ¹⁾
Brix degree	8.90±0.31
pH	3.19±0.08
Total acidity (%)	1.05±0.03
Moisture (%)	3.07±0.02

¹⁾SPP: Spray-dried *Prunus mume* vinegar powder. Data values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations.

결과 및 고찰

매실 식초 분말의 이화학적 특성

매실 식초 분말의 pH, 당도, 총산도 및 수분 함량을 측정된 결과는 Table 1에 나타났다. pH는 3.19, 당도는 8.9 °Brix이었고 총산도 및 수분 함량은 각각 1.05% 및 3.07%로 나타났다. Kim 등[23]은 매실 농축액의 이화학적 특성을 측정하였으며

당도, pH, 총산도 및 수분 함량이 각각 54.36 °Brix, 2.73, 35.81 % 및 51.32%로 나타나 본 연구의 결과와 상이한 결과를 나타냈으며, 이는 다른 분무건조 분말의 이화학적 특성 분석 결과와 비교했을 때, 매실 식초 분말의 제조과정 중 수분의 증발과 사용된 시료의 낮은 농도에 의한 것으로 판단된다.

매실 식초 분말의 항산화 활성 측정

항산화능이란 인체 내에서 산화적 스트레스를 유발시켜 DNA, 세포막 및 단백질 등을 손상시키는 활성산소종을 환원시켜 안정된 상태로 전환시키는 것이다[19]. 매실 식초 분말을 각 농도별로 측정된 다양한 항산화능 결과는 Fig. 1과 같다. DPPH radical 소거능은 라디칼 형태인 DPPH가 항산화물질로부터 전자나 수소이온을 제공받아 안정한 상태로 전환되면서 흡광도가 변하는 원리를 이용한 방법으로 항산화능 측정법으로 널리 사용되고 있다[30]. DPPH radical 소거능 결과 positive control인 0.1% α-tocopherol과 0.1% BHT에서 각각 68.01

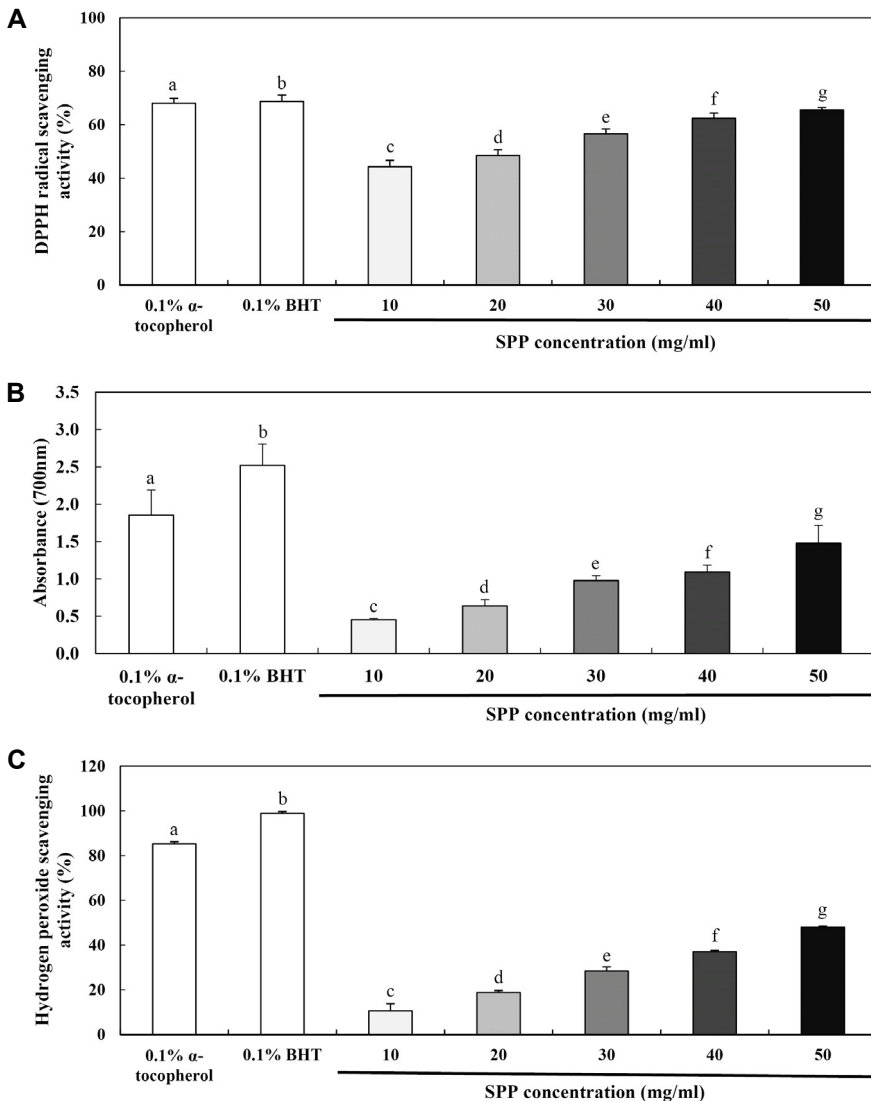


Fig. 1. Effect of SPP on (A) DPPH radical scavenging activity, (B) reducing power activity and (C) hydrogen peroxide scavenging activity. Data values are expressed as mean ± SE of triplicate determinations. Data values with different superscripts indicate significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests. SPP: spray-dried *Prunus mume* vinegar powder.

%, 68.72%로 가장 높았고, 매실 식초 분말의 경우 농도의존적으로 DPPH radical 소거능이 증가하는 경향을 나타냈으며, 특히 매실 식초 분말 50 mg/ml 농도에서 65.55%의 소거능을 보이면서 positive control과 근접한 활성을 나타내었다(Fig. 1A).

환원력은 항산화 물질로부터 수소이온을 제공받아 ferric ion/ferricyanide 복합체를 환원시켜 흡광도의 변화를 통해 항산화 활성을 측정한다[26]. 농도별 매실 식초 분말의 환원력 결과는 Fig. 1B에 나타났다. 각 매실 식초 분말은 농도별로 0.45, 0.64, 0.98, 1.09 및 1.48의 환원력을 나타냈다. 이는 DPPH radical 소거능과 유사하게 농도의존적으로 환원력이 증가하는 것으로 나타났다.

Hydrogen peroxide는 free radical은 아니지만 활성산소종으로 그 자체의 독성은 낮지만 금속 이온과 반응하여 체내에서 강한 독성을 띄는 hydroxyl radical을 생성하는 것으로 알려져 있다[18]. 매실 식초 분말의 농도별 hydrogen peroxide 소거능 결과는 Fig. 1C와 같다. Positive control인 0.1% α -tocopherol과 0.1% BHT에서 각각 85.29%, 98.86%의 소거 활성을 나타냈고, 매실 식초 분말은 농도별로 10.64%, 18.79%, 28.45%, 37.05% 및 48.07%로 확인되었다. 이에 따라 매실 식초 분말의 hydrogen peroxide 소거 활성은 농도의존적으로 증가하는 것으로 판단된다.

Kim 등[23]의 pectinase를 처리한 매실 농축액을 이용한 항산화능 연구 결과는 본 매실 식초 분말을 이용한 결과와 유사하게 우수한 항산화능을 나타냈으며, Hwang과 Thi [14]는 식초의 발효 과정 중 초산, 사과산, 구연산 등의 다양한 유기산 같은 유효성분이 생성되어 체내에서 활성산소를 제거하여 항산화 활성에 관여한다고 보고하였다. 따라서 매실 식초 분말의 뛰어난 항산화 활성은 매실 식초에 함유된 풍부한 유기산

에 의한 것으로 사료된다.

매실 식초 분말의 암세포 증식 측정

체내에 활성산소종이 과도하게 생성되면 정상세포 내 단백질이나 DNA 등을 손상시키고 노화나 돌연변이 등을 일으켜 세포 사멸이 억제되어 암세포로 변이된다[21, 33]. 따라서 본 연구에서는 농도별 매실 식초 분말 처리가 인체 유방정상세포 및 다양한 암세포주에서 미치는 증식 억제 효과를 알아보고자 인체 유방정상세포인 HMEC, 유방암 세포인 MDA-MB-231, 결장암 세포인 HT-29, 전립선암 세포인 PC-3 및 피부암 세포인 SK-MEL-28를 이용하여 SRB assay를 실시한 결과는 Fig. 2에 나타났다. HMEC 세포에서 매실 식초 분말을 농도별로 처리하였을 때 세포생존율이 비교적 감소하는 경향을 보였다. 특히 10 mg/ml의 농도에서 91.77%의 세포 생존율을 보여 세포의 증식에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. MDA-MB-231 세포의 경우 매실 식초 분말을 72시간 처리했을 때 농도의존적으로 세포생존율이 감소하는 경향을 나타냈다. 특히 5 mg/ml의 농도부터 세포 증식 억제 효과가 유의적으로 증가하는 것으로 나타났으며, 10 mg/ml의 농도에서 46.58%의 세포생존율을 보였다. 반면에 HT-29 세포, PC-3 세포 및 SK-MEL-28 세포의 경우 매실 식초 분말을 농도별로 처리하였을 때 세포생존율이 비교적 감소하는 경향을 보였으나 세포 증식 억제 효과는 크지 않은 것으로 나타났다. Jeong 등[15]은 매실 유래 기능성 화합물이 인체 후두암 세포 Hep-2, 인체 신장암 세포 SW-156, 인체 난소암 세포 SK-OV-3 및 인체 자궁암 세포 HEC-1-B에서 증식 억제 효과를 나타낸다고 보고하였고, Chung 등[6]은 버섯 발효 식초가 SNU-719 (위암 세포)와 Hep3B (간암 세포)에서 항암 효능을 보고하였기에 본 연구에서 나타난 결과는 매실 식초 분말이 인체 유방암 세포인 MDA-MB-231에

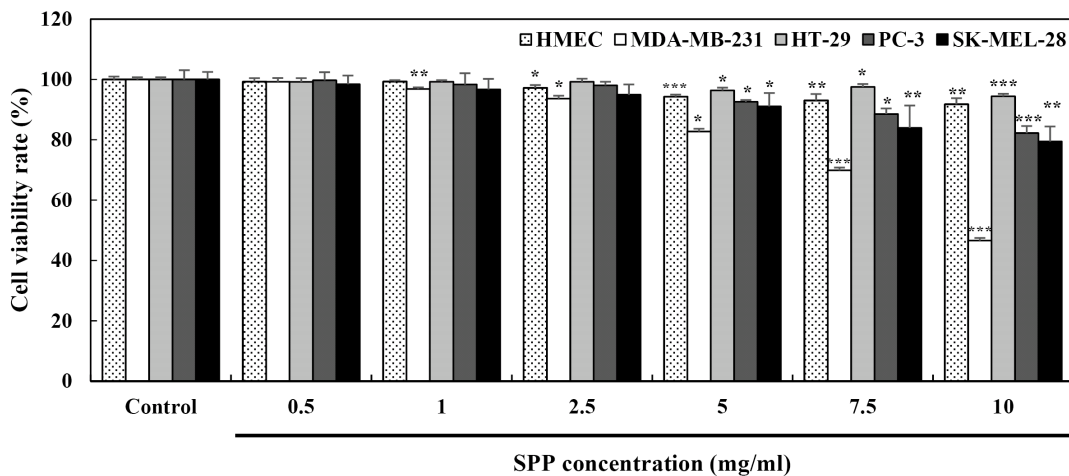


Fig. 2. Cell growth inhibitory effect on human mammary epithelial HMEC, human breast MDA-MB-231, colon cancer HT-29, prostate cancer PC-3 and skin cancer SK-MEL-28 cells treated with SPP for 72 hr by SRB assay. Data values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001 by student's *t*-test. SPP: spray-dried *Prunus mume* vinegar powder.

민감하게 작용하여 뛰어난 암세포 증식 억제 효과를 나타낸 것으로 판단된다.

매실 식초 분말 처리에 따른 암세포 형태 및 집락 형성능 관찰

앞선 결과에서 가장 뛰어난 세포 증식 억제 효과를 보인 유방암 세포인 MDA-MB-231에 매실 식초 분말의 농도별 처리에 따른 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다(Fig. 3A). 매실 식초 분말을 처리한 군은 대조군에 비해 농도의존적으로 세포의 증식이 억제 되는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 7.5 및 10

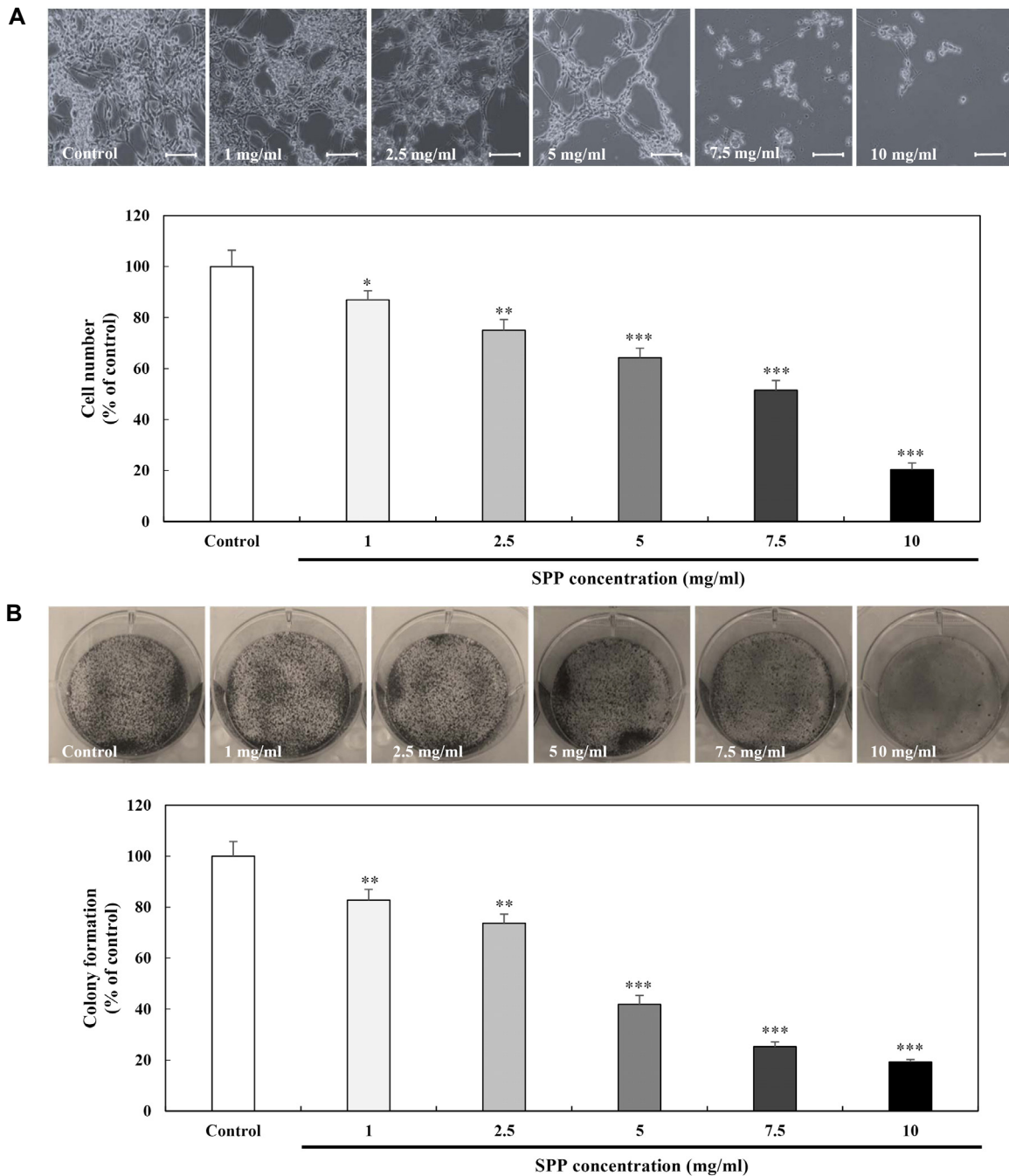


Fig. 3. Effect of SPP on morphological change and single-cell proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells. (A) Morphology was visualized by optical microscopy (x200, scale bar 100 μm) and quantified by cell number counting. (B) Colony formation capacities were determined by crystal violet staining and quantified. Results were expressed as the percentage of control. Data values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ by student's *t*-test. SPP: spray-dried *Prunus mume* vinegar powder.

mg/ml의 농도에서 각각 세포의 수가 51.51% 및 20.37%로 감소되면서 세포의 증식이 억제된 것을 확인할 수 있었다.

Clonogenic assay는 단일 세포가 증식할 때 50개 이상의 세포가 colony 형태로 성장하는 특징을 이용함으로써 시료의 처리에 따른 colony 형성억제능을 확인하는 실험 중 하나이다 [10]. 매실 식초 분말의 처리에 따른 MDA-MB-231 세포의 colony 형성에 미치는 영향을 확인한 결과는 Fig. 3B와 같다. 매실 식초 분말을 처리하였을 때 농도 의존적으로 colony 형성이 억제되는 경향을 보였으며, 특히 10 mg/ml의 농도에서 colony formation이 19.23%로 감소되면서 colony 형성능이 크게 억제된 것을 확인할 수 있었다. 본 결과는 앞선 SRB assay를 통한 매실 식초 분말의 처리에 따른 유방암 세포 MDA-MB-231 세포의 증식 억제 효과와 유사한 결과로 나타났다.

매실 식초 분말 처리에 따른 암세포의 apoptotic body 관찰

Apoptosis에 의한 세포의 사멸 과정에서 세포질의 수축, apoptotic body의 형성 및 핵 응축이 apoptotic 세포에서 형태학적으로 관찰된다[13]. 매실 식초 분말의 처리에 따른 유방암 세포 MDA-MB-231 세포의 증식 억제 효과가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위해 Hoechst 33258을 이용한 염색을 통해 핵의 형태 변화를 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 대조군의 핵의 형태는 비교적 원형으로 나타났으나, 매실 식초 분말을 처리하였을 때 핵의 형태에 변화가 일어난 것을 확인할 수 있었다. 특히 7.5 및 10 mg/ml에서 확인한 세포의 모양 변형과 핵의 손상에 의한 응축이 일어난 것을 확인하였고, apoptotic body 형성이 확인되었다. Chung 등[7]은 매실의 메탄올 추출물 처리에 따른 인체 백혈병 세포의 apoptosis를 통한 사멸이 나타났다고 보고하였기에 본 연구결과에서 인체 유방암 세포인 MDA-MB-231에 매실 식초 분말을 처리하였을 때 유도된 세포의 사멸은 apoptosis에 의한 사멸로 생각된다. 추후 세포 사멸에 대한 기전과 상세한 검증의 필요성이 요구된다고 판단된다.

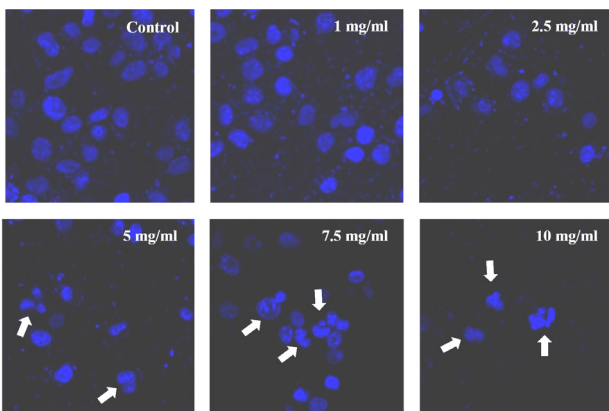


Fig. 4. Effect of SPP on nuclear fragmentation in breast cancer MDA-MB-231 cells. Cells were stained with 10 µg/ml of Hoechst 33,258 and examined by fluorescence. SPP: spray-dried *Prunus mume* vinegar powder.

Table 2. Total polyphenol and flavonoid contents of SPP

Sample	Contents (µg/g)	
	Total polyphenol contents GAE ²⁾	Total flavonoid contents QE ³⁾
SPP ¹⁾	59.58±17.50	57.56±27.94

¹⁾SPP: spray-dried *Prunus mume* vinegar powder.

²⁾GAE: gallic acid equivalent.

³⁾QE: quercetin equivalent.

Data values are expressed as mean as ± SD of triplicate determinations.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

식물계에 분포되어 있는 페놀성 화합물들은 항산화, 항균 및 항암 등의 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다[16]. 플라보노이드는 식물계 색소 성분으로 체내에서 항염증, 항산화, 면역 증가, 항균 및 항바이러스 등의 다양한 기능성이 보고되어 있다[41]. 매실 식초 분말의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정 결과는 Table 2에 나타났다. 매실 식초 분말의 총 폴리페놀 함량은 59.58 µg/g로 나타났고, 총 플라보노이드 함량은 57.56 µg/g로 나타났다. 이는 Lee 등[32]의 국내 시판되는 매실 식초의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 보고한 연구와 다소 상이한 결과를 보였지만 이는 원료의 배합비율 및 제조 방법과 본 실험에 사용된 시료의 낮은 농도에 의한 것으로 사료된다.

이상의 결과로 매실 식초 분말의 항산화 효과 및 유방암 세포인 MDA-MB-231세포의 뛰어난 증식 억제 효과는 매실을 이용한 초산 발효 과정 중 생성된 유기산 및 다량의 폴리페놀과 플라보노이드 성분에 의한 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서 매실 식초를 분무건조하여 제조한 매실 식초 분말은 뛰어난 항산화 및 인체 유방암 세포의 증식 억제 효과가 있는 기능성 식품소재로서의 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 농생명기술개발사업의 지원을 받아 연구되었기에 이에 감사드립니다(316009-5).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Abdel-Hameed, E. S. S. 2009. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chem.* **114**, 1271-1277.

2. Bae, J. H., Kim, K. J., Kim, S. M., Lee, W. J. and Lee, S. J. 2000. Development of the functional beverage containing the *Prunus mume* extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**, 713-719.
3. Benzi, G. and Moreti, A. 1995. Age-and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 77-101.
4. Blois, M. S. 1958. Antioxidant activity determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
5. Boatright, W. L. and Hettiarachchy, N. S. 1995. Spray-dried soy protein isolate solubility, gelling characteristics and extractable protein as affected by antioxidants. *J. Food Sci.* **60**, 806-809.
6. Chung, B. H., Seo, H. S., Kim, H. S., Woo, S. H. and Cho, Y. G. 2010. Antioxidant and anticancer effects of fermentation vinegars with *Phellinus linteus*, *Inonotus obliquus*, and *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **18**, 113-117.
7. Chung, Y. J., Park, C., Jeong, Y. K. and Choi, Y. H. 2011. Apoptosis induction by methanol extract of *Prunus mume* fruits in human leukemia U937 cells. *J. Life Sci.* **21**, 1109-1119.
8. Ferraz da Costa, D. C., Casanova, F. A., Quarti, J., Malheiros, M. S., Sanches, D., Dos Santos, P. S., Fialho, E. and Silva, J. L. 2012. Transient transfection of a wild-type p53 gene triggers resveratrol-induced apoptosis in cancer cells. *PLoS One* **7**, e48746.
9. Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W. and Vandenabeele, P. 1999. More than one way to die: Apoptosis and necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* **18**, 7719-7730.
10. Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. and Bree, C. V. 2006. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat. Protoc.* **1**, 2315-2319.
11. Gao, X., Bjork, L., Trajkovski, V. and Uggl, M. 2000. Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 2021-2027.
12. George, V. C., Kumar, D. R. N., Suresh, P. K., Kumar, S. and Kumar, R. A. 2013. Comparative studies to evaluate relative *in vitro* potency of luteolin in inducing cell cycle arrest and apoptosis in HaCaT and A375 cells. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **14**, 631-637.
13. Hassan, M., Watari, H., Abualmaaty, A., Ohba, Y. and Sakuragi, N. 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 150845-150867.
14. Hwang, E. S. and Thi, N. D. 2020. Quality characteristics and antioxidant activity of vinegar by the addition of aronia Juice (*Aronia melanocarpa*). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **49**, 167-176.
15. Jeong, J. T., Moon, J. H., Park, K. H. and Shin, C. S. 2006. Isolation and characterization of a new compound from *Prunus mume* fruit that inhibits cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2123-2128.
16. Ji, Y. J. and Im, M. H. 2017. Optimization of blue berry extraction for beverage production using enzyme treatment. *Kor. J. Food Preserv.* **24**, 60-67.
17. Jin, M. H., Park, S. Y., Kang, Y. G., Shim, W. S., Hur, H. S., Hong, S. H., Park, C., Choi, Y. H. and Park, S. E. 2014. Anti-cancer effects of *Oldenlandia diffusa*, *Cremastra appendiculata* and *Fritillaria thunbergii* on MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J. Int. Kor. Med.* **35**, 133-144.
18. Kang, M. J., Kim, K. S. and Shin, S. R. 2002. Antioxidative and free radical scavenging activity of water extract from Dandelion (*Taraxacum officinale*). *Kor. J. Food Preserv.* **9**, 253-259.
19. Kang, S. R., Shin, M. O., Kim, S. G., Lee, S. H. and Kim, M. H. 2009. Antioxidative activity of Pine (*Pinus densiflora*) needle extracts in rats fed high-cholesterol diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 423-429.
20. Kato, S., Ishita, S., Sugawara, K. and Mawatari, K. 1993. Cystine/ glutamate antiporter expression in retinal Muller glial cells: implications for DL-alpha-amino adipate toxicity. *Neuroscience* **75**, 473-482.
21. Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P. and Koul, H. K. 2009. Role of oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett.* **282**, 125-136.
22. Kim, J. H., Cho, H. D., Won, Y. S., Hong, S. M., Moon, K. D. and Seo, K. I. 2020. Anti-fatigue effect of *Prunus mume* vinegar in high-intensity exercised rats. *Nutrients* **12**, 1205-1218.
23. Kim, J. H., Cho, H. D., Won, Y. S., Park, W. L., Lee, K. W., Kim, H. J. and Seo, K. I. 2018. Physiological activity and physicochemical properties of condensed *Prunus mume* juice prepared with pectinase. *J. Life Sci.* **28**, 1369-1378.
24. Kim, J. H., Cho, H. D., Won, Y. S., Park, W. L., Min, H. J., Han, S. H., Moon, K. D. and Seo, K. I. 2019. Antioxidant and α -glucosidase inhibition activity of solvent fractions from *Prunus mume* ethanol extract. *J. Life Sci.* **29**, 1111-1119.
25. Kim, J. M., Moon, Y. S., Yoon, K. Y. and Suh, S. G. 2010. Quality properties and preference of fermented *Gastrodia elata* Blume. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **28**, 507-514.
26. Kim, M. J. and Park, E. J. 2011. Feature analysis of different *in vitro* antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 1053-1062.
27. Kleinsmith, L. J. 2008. Principles of cancer biology, pp. 16-63, 1st ed., Life Science Publishing Co, Seoul, Korea.
28. Lee, E. H., Nam, E. S. and Park, S. I. 2002. The effect of Maesil (*Prunus mume*) extract on the acid production and growth of yoghurt starter. *Kor. J. Food Nutr.* **15**, 42-49.
29. Lee, H. J., Kim, M. J., Park, J. H. and Park, E. J. 2012. Antioxidative and antigenotoxic activity of white and yellow *chrysanthemum morifolium* Ramat extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 289-294.
30. Lee, J. M., Chang, P. S. and Lee, J. H. 2007. Comparison of oxidative stability for the thermally-oxidized vegetable oils using a DPPH method. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **39**, 133-137.
31. Lee, K. B., Seo, Y. I. and Mo, S. W. 2011. How to activate the *Prunus mume* (Maesil) industry in Gwangyang region. *J. Ind. Econ. Bus.* **24**, 2609-2623.
32. Lee, S. M., Choi, Y. M., Kim, Y. W., Kim, D. J. and Lee, J. S. 2009. Antioxidant activity of vinegars commercially available in Korean markets. *Food Eng. Prog.* **13**, 221-225.
33. Lim, S. M. 2010. Resistance to reactive oxygen species and

- antioxidant activities of some strains of lactic acid bacteria from the Mustard Leaf *Kimchi*. *Kor. J. Microbiol.* **46**, 375-382.
34. Mukhtar, H. and Ahmad, N. 1999. Contemporary issues in toxicology, cancer chemoprevention : future holds in multiple agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **158**, 207-210.
 35. Müller, H. E. 1985. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS peroxidase medium. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A.* **259**, 151-154.
 36. Oh, H. L., Kim, C. R., Kim, N. Y., Jeon, H. L., Doh, E. S. and Kim, M. R. 2013. Characteristics and antioxidant activities of *Rehmannia radix* powder. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 62-67.
 37. Osborn-Barnes, H. T. and Akoh, C. C. 2003. Effect of α -tocopherol, β -carotene, and isoflavones on lipid oxidation of structured lipid-based emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6856-6860.
 38. Paik, I. Y., Chang, W. R., Kwak, Y. S., Cho, S. Y. and Jin, H. E. 2010. The effect of *Prunus mume* supplementation on energy substrate levels and fatigue induction factors. *J. Life Sci.* **20**, 49-54.
 39. Park, G. S., An, S. H., Choi, K. H., Jeoung, J. S., Park, C. S. and Choi, M. A. 2000. Preparation of the functional beverages by fermentation and its sensory characteristics. *Kor. J. Soc. Food Sci.* **16**, 663-669.
 40. Park, H. Y., Hwang, K. S., Kim, J. H. and Lee, J. Y. 2015. Preparation of porous anti-insect repellent powder using spray drying of medicinal herbal extracts anti-insect repellent silica sol. *Appl. Chem. Eng.* **26**, 549-556.
 41. Park, S. Y., Chae, K. S., Son, R. H., Jung, J. H., Im, Y. R. and Kwon, J. W. 2012. Quality characteristics and antioxidant activity of Bokbunja (Black Raspberry) vinegars. *Food Eng. Prog.* **16**, 340-346.
 42. Peter, B. and Bernard, L. 2008. *World Cancer Report 2008*. pp. 80-81, International Agency for Research on Cancer, Geneva, Switzerland.
 43. Reineccius, G. A. 1991. Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technol.* **45**, 144-150.
 44. Rhim, T. J. and Choi, M. Y. 2010. The antioxidative effects of *Ampelopsis brevipedunculata* extracts. *Kor. J. Plant Res.* **23**, 445-450.
 45. Sheo, H. J., Ko, E. Y. and Lee, M. Y. 1987. Effects of *Prunus mume* extract on experimentally alloxan induced diabetes in rabbits. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **16**, 41-47.
 46. Sheo, H. J., Lee, M. Y. and Chung, D. L. 1990. Effect of *Prunus mume* extract on gastric secretion in rats and carbon tetrachloride induced liver damage of rabbits. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **19**, 21-26.
 47. Shin, T. S. 1999. Effects of mixed natural antioxidants on POV and TBARS of cooked ground pork. *J. Agri. Tech. Dev. Inst.* **3**, 1-6.
 48. Shon, Y. H., Lee, K. T., Park, S. H., Cho, K. H., Lim, J. K. and Nam, K. S. 2001. Induction of NAD(P)H: quinone reductase and glutathione S-transferase by *Xanthii fructus* and *Prunellae spica* extracts. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**, 269-273.
 49. Stavric, B. 1994. Role of chemopreventers in human diet. *Clin. Biochem.* **27**, 319-332.
 50. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44-84.
 51. Yen, G. C. and Hsieh, C. L. 1998. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3431-3436.
 52. Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A. A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4083-4089.

초록 : 매실 식초 분말의 항산화 및 유방암 세포주 증식 억제 효과

박울림¹ · 김정호² · 허지안³ · 원영선³ · 서권일^{3*}

(¹동아대학교 응용생명과학과, ²경북대학교 식품공학부, ³동아대학교 식품생명공학과)

매실은 주로 한국, 일본, 중국 같은 동아시아에 분포하고, 매실 나무의 열매는 한약재나 식재료로 쓰여왔다. 그러나 매실 열매를 이용한 이전의 연구는 대부분 추출물 형태로 진행하였기에, 많은 식품학적인 활용을 위해 매실 열매의 다양한 가공형태에서의 연구가 필요한 실정이다. 본 연구에선 분무 건조한 매실 식초 분말(SPP)의 이화학적 특성과 생리활성을 평가하였다. SPP의 이화학적 특성에서 당도, pH, 총산도 및 수분 함량은 각각 8.90 °Brix, 3.19, 1.05% 및 3.07%로 확인되었다. SPP의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거활성, 환원력 및 H₂O₂ 소거활성에서 각각 65.55%, 1.48 및 48.07%로 양성 대조군과 비슷하거나 다소 낮게 유의적으로 높은 항산화 활성을 나타냈다. 또한 SPP를 농도별로 처리함에 따라 MDA-MB-231 인체 유방암 세포에서 유의적인 세포 증식 억제 활성을 보였다. 형태학적 연구에서 MDA-MB-231 세포에서 농도의존적으로 세포의 형태학적 변화가 확인되었고, apoptotic body와 핵의 응축을 나타냈다. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 59.58 µg/g과 57.56 µg/g으로 확인되었다. 이러한 연구 결과를 통해 분무 건조한 매실 식초 분말은 항산화 및 암세포 증식억제능이 있는 기능성 식품 및 천연 의약품 소재로 활용이 가능할 것으로 생각된다.