



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0026949
(43) 공개일자 2008년03월26일

(51) Int. Cl.

A23K 1/14 (2006.01) A23K 1/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0092212

(22) 출원일자 2006년09월22일

심사청구일자 2006년09월22일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

박창식

충남 공주시 신관동 대아아이투빌아파트 105-401

김상겸

서울 영등포구 양평동 삼호아파트 1동 2307호

(74) 대리인

신동인

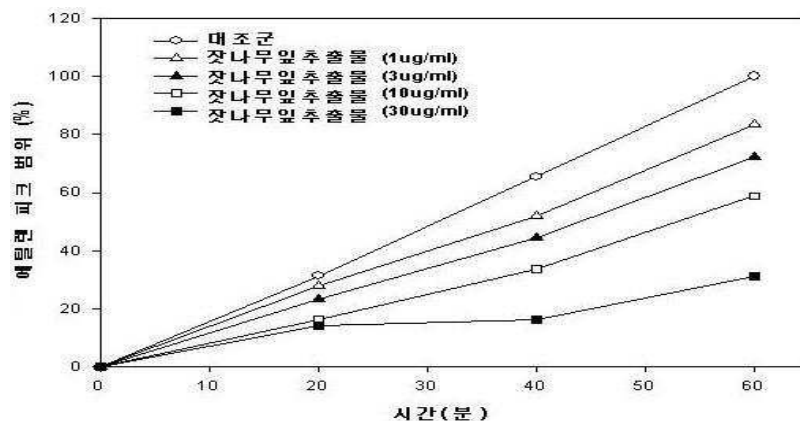
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 잣나무잎을 이용한 동물사육방법 및 이를 이용하여 생산된기능성 산물

(57) 요약

본 발명은 항산화 활성을 갖는 잣나무잎(*Pinus Koraiensis*)을 이용한 동물의 사육방법 및 이를 이용하여 생산된 기능성 산물에 관한 것으로, 본 발명의 잣나무잎은 항산화 효과를 가지고 있어 육질 개선, 이취 감소 및 각종 성인병 예방의 이익을 주므로 이를 이용해 생산된 기능성 산물은 농가소득 증대에 기여할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

갯나무잎을 채취 및 분쇄하여 준비하는 제 1단계; 상기 갯나무잎을 5 내지 10%를 사용하여 사료에 배합하는 제 2단계; 상기 사료를 동물에 자유 채식토록 급여하여 기능성 산물을 생산하는 제 3단계를 포함하는 항산화 활성을 갖는 갯나무잎을 이용한 동물사육방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 갯나무잎을 배합한 사료의 구성배합비가 바람직하게는 사료 : 갯나무잎(15~20 : 1~5)의 중량비 (w/w)임을 특징으로 하는 항산화 활성을 갖는 갯나무잎을 이용한 동물사육방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 동물사육방법으로 생산된 항산화 활성을 갖는 갯나무잎을 이용한 기능성 산물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 원료육 및 이의 부산물 또는 가공육 및 이의 부산물인 기능성 산물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 원료육 및 이의 부산물은 꿩고기, 닭고기, 돼지고기, 말고기, 소고기, 양고기, 오리고기, 인조육, 칠면조고기, 토끼고기, 건조란, 달걀, 동결란, 메추리알, 분말달걀, 오리알, 간을 포함함을 특징으로 하는 기능성 산물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 가공육 및 이의 부산물은 간으로 만든 파테(Pate), 간으로 만든 페이스트, 고기 엑기스, 고기젤리, 돈까스, 레닛(Rennet), 베이컨, 부용(Bouillon), 부용제조제, 브로스(Broth), 블랙푸딩(블러드소시지), 비프스테이크, 샤르꾸테리(Charcuterie), 소시지, 소위(胃), 식용 골수, 식용 젤라틴, 육포, 통조림육, 병조림육, 이유식용 육, 햄, 햄버거용 고기, 으갠소시지, 순대, 곱창, 탕수육을 포함함을 특징으로 하는 기능성 산물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<10>

본 발명은 항산화 활성을 나타내는 갯나무잎을 이용한 동물사육방법 및 이를 이용하여 생산된 기능성 산물에 관한 것이다.

<11>

산소와 관련된 인체 내 산화성물질을 활성산소종 (ROS: reactive oxygen species)과 활성질소종 (RNS: reactive nitrogen species)이라고 하는데 이러한 ROS 및 RNS의 종류로는 슈퍼옥사이드 (superoxide), 히드록실 (hydroxyl), 페록실 (peroxyl), 알콕실 (alkoxyl), 히드로페록실 (hydroperoxyl)과 같은 자유라디칼 (유리기, free radical)과 히드로젠페록사이드 (hydrogenperoxide), 히포클로로스산 (hypochlorous acid), 오존 (ozone), 일중항 산소 (singlet oxygen), 퍼옥시나이트라이트 (peroxinitrite) 등과 같은 비(非)자유라디칼 (비유리기, non free radical)이 있다. 이 중에서 반응성이 강하여 직접적인 독성을 유발하는 것은 히드록실, 페록실, 퍼옥시나이트라이트 등이다 (Bayir H. et al., *Crit Care Med.*, 33(12 Suppl), ppS498-501, 2005;

Niles et al., *Nitric Oxide*, 14, pp109-121, 2006).

<12> 산화성물질들은 다양한 생물체의 산화 환원 반응에서 생성되며, 식용유지의 변질 또는 여러 생체물질(지질, 단백질, 핵산, 탄수화물)에 산화적인 손상을 유발할 수 있으며 여러 단계를 거치게 되면서 결과적으로 세포에 손상을 유발할 수 있다(Yen GC et al., *J. agric.. Food Chem.*, 43, pp27-32, 1995). 생체막 구성성분인 인지질의 불포화지방산은 활성산소종과 같은 자유라디칼에 의해 과산화 반응이 개시되며 또한 연쇄적으로 진행된다. 그러므로 자유라디칼에 의한 과산화반응은 세포막의 투과성을 향진시킬 뿐 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 노화현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리현상을 유도하여 발암과정에도 관여한다. 라디칼 작용은 산화적 스트레스와 관련된 질환인 아토피성 질환, 암, 고혈압, 심근경색, 동맥경화, 류머티스, 백내장, 파킨슨씨병 등 여러 가지 만성질환의 진행에 많은 영향을 주며(De Souza LC. et al., *Bioorg. Med. Cehm. Lett.*, 14, pp5859-5861, 2004), 면역계 기능을 약화시키는 요인으로 작용될 수 있다(Pike J. et al., *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 65, pp117-120, 1995).

<13> 생명체가 반복적으로 산화적 스트레스에 노출될 경우 세포는 이에 대응하기 위해 항산화 활성을 갖는 효소나 물질의 생성을 증가시켜 생체를 보호하게 된다. 이런 생체의 보호기작을 항산화 체계(antioxidant defense system)라하며 크게 항산화 효소와 저분자의 항산화 물질로 구분된다. 항산화 효소와 저분자의 항산화 물질은 상호 보완적으로 작용하여 생체에서 생성되는 산화성물질을 무독화시킨다. 특히 글루타치온(glutathione)은 대표적인 저분자의 항산화 물질로 직접적으로 산화성물질을 환원시킬뿐만 아니라 글루타치온 S-전달효소(glutathione S-transferase)와 글루타치온 퍼옥시다제(glutathione peroxidase)의 기질로 작용하여 친전자성 물질을 무독화시킨다(Estrela et al., *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 43(2):pp143-181, 2006).

<14> 최근 천연물 추출물 등에서 총체적인 항산화활성을 측정하기 위한 다양한 시도가 진행되고 있다(Prior RL. et al., *J. agric.. Food Chem.*, 53, pp4290-4302, 2005). 시료의 총항산화 활성측정은 활성산소종에 의한 독성에 대한 저항성을 판단하는데 유효하며 이 목적을 위해 몇 가지 방법이 개발된 바 있다(Prior RL. et al., *J. agric.. Food Chem.*, 53, pp4290-4302, 2005). 1980년대 중반에 자유기 생성물질과 항산화물질을 함유한 실험계에서 최대산소소비에 요하는 시간을 측정하여 그 결과를 수용성 비타민 E 유도체인 트록스(Trolox)로 측정된 시간과 비교하는 TRAP(total radical trapping antioxidant parameter)법이 개발되었다(DeLange and Glazer, *Anal Biochem.*, 28, pp300-306, 1989). 그 후 라디칼이 형광물질에 주는 화학적 손상에 의한 형광의 감소로 항산화 활성을 측정하는 방법이 제시되었다(Tanaka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 123, pp2530-2536, 2001). 라디칼에 의한 형광물질의 형광감소속도는 일정하지만 항산화물질이 존재 시에는 일시적인 지연이 관찰된 후 형광의 감소가 신속하게 일어난다. 따라서 시료와 대조군의 AUC의 차이를 측정하는 ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity) 측정법과 항산화 물질이 존재할 때 형광물질의 보호시간, 즉 유도기(lag-phase)를 측정하는 방법 등이 개발되었다(Ghiselli et al., *Free Radical Biol. Med.*, 18, pp29-36, 1995). 그러나 이들 방법은 모두 생체내에서 발생하는 라디칼이 아닌 인공적인 라디칼을 이용함으로써 생체에서의 항산화 활성을 평가하는 데 한계를 가지고 있다(Prior RL. et al., *J. agric.. Food Chem.*, 53, pp4290-4302, 2005).

<15> 레굴리(Regoli)와 윈스턴(Winston)은 생체내 산화성물질과 반응하여 에틸렌으로 산화되는 KMBA(α -keto- γ -methiolbutyric acid)를 사용하여 생체 조직과 천연물의 항산화 활성을 측정하는 방법을 개발하였다(Winston et al., *Free Radical Biol. Med.*, Feb., 24(3), pp480-493, 1998; Regoli and Winston, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Apr. 15, 156(2), pp96-105, 1999). 에틸렌은 밀폐된 반응용기 내에서 공기 시료를 취해 가스크로마토그래피로 정량할 수 있다. 이 방법의 장점은 활용성에 있는데 KMBA는 다양한 산화성 물질 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical), 퍼옥실 라디칼(peroxyl radical), 과산화질산염(peroxynitrite), 차아염소산(hypochlorous acid) 등과 반응하여 에틸렌을 생성하므로 항산화활성이 높은 조직이나 혈액 시료에서는 에틸렌의 발생이 저하된다. 이 방법에서는 KMBA와 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical), 퍼옥실 라디칼(peroxyl radical), 과산화질산염(peroxynitrite) 등과의 반응에 의해 발생하는 에틸렌의 농도를 반응시간의 변화에 따라 측정하여 AUC(area under the curve)를 구하고 대조군과 투여군에서의 AUC의 비율로부터 TOSC를 산출한다. 따라서 단일 반응시점에서만 측정되는 방법이 가지고 있는 오차를 보정할 수 있는 재현성이 높고 정확한 방법이다. 시료로부터 측정된 TOSC 값은 대조군에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로 이 측정값은 기기의 감도나 사용시약, 기타 반응조건에 영향을 받지 않는다. 더욱이 생체에서 실제로 생성되는 산화성물질에 대한 항산화 활성을 평가함으로써 생물체의 적용 가능성이 높은 방법이다(Ghiselli A. et al., *Free Radical Biol. Med.*, 18, pp29-36, 1995).

<16> 자유라디칼로부터 인체를 보호하는 협동적인 방어시스템은 산화를 저해시키는 영양소와 효소를 가지고 있다(Halliwel B. et al., *Annu. Rev. Nutr.*, 16, pp33-50, 1996). 산화적인 스트레스로부터 인체를 보호하

는 효과적인 방법 중 하나는 항산화 수준을 증가시키는 것이다 (De Souza LC. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, pp5859-5861, 2004). 따라서 산화적 손상으로부터 예방하기 위한 대체 물질의 항산화적인 평가는 매우 활발하게 연구되고 있다.

<17> 항산화제는 산소를 제거하거나 흡수하는 것이 아니라 자유라디칼과 반응함으로써 특정 비타민류와 필수 아미노산등의 손실을 최소화 하거나, 유지 제품의 산패를 지연 또는 방지하는 목적으로 사용된다. 식품 또는 의약품 등에 많이 사용되는 합성 항산화제로는 부틸화 하이드록시아니솔 (BHA, Butylated hydroxyanisole), 부틸화 하이드록시톨루엔 (BHT, Butylated hydroxytoluene), 프로필 갈레이트 (PG, Propyl galate), 터셔리부틸 하이드로퀴논 (TBHQ, Teritiarybutyl hydroquinone) 등이 있으나, 이들을 실험동물에 고농도로 투여할 경우에는 간 비대증이 유발되거나 발암성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 특히 부틸화 하이드록시톨루엔은 여러 연구 결과를 통하여 실험동물의 간에서 마이크로솜 효소 활성 (microsomal enzyme activity)을 증가시킨다는 것이 알려지면서, 이들 페놀계 합성 항산화제의 안전성에 대하여 논란이 제기되어 현재에는 그 사용량이 법적으로 규제되어 있다(Brannen et al., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **52**, pp59-63, 1975 ; Ito N. et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**, p343, 1983 ; Chan KM. et al., *J. Food Sci.*, **58**, pp1-4, 1993).

<18> 이에 따라 항산화 효과가 높으면서 안전하고 경제적인 식물기원의 천연 항산화제를 개발하고자 하는 많은 연구가 기대 속에 이루어지고 있다(Larson RA. et al., *Phytochemistry*, **27**, pp969-978, 1988). 최근 천연물을 대상으로 한 연구가 활발히 수행되면서 천연물에 함유되어 있는 2차 대사산물이 생리활성물질로서 주요 관심사가 되고 있으며 특히, 항산화성 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(中谷延二, *日本食品工業學會誌*, **37**, p569, 1990). 생리활성물질은 매우 적은 양으로도 현저한 활성을 나타내는 고부가가치 물질로서 많은 종류가 유용하게 쓰이고 있으며, 새로운 물질들에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다(條原和毅, *食品と開發*, **27**, p29, 1992; Kang SS. et al., *Natural product science. Seoul Univ. Publishers*, Seoul, p71, 1988).

<19> 현재까지 알려진 천연 항산화 물질로는 토코페롤 (tocopherol)류, 플라보노이드 (flavonoid)류, 고시폴 (gossypol), 세사몰 (sesamol), 오리자놀 (oryzanol) 및 비타민 C 등을 들 수 있다(Huson B. et al., *Food Chem.*, **19**, pp537-541, 1987 ; Frankel, E.N. et al., *Food Chem.*, **57**, p51, 1996 ; Giese J. et al., *Food Technol.*, **5**, pp73-81, 1996 ; Pszczola DE. et al., *Food Tech.*, **55**, pp51-59, 2001). 이 중 토코페롤 (tocopherol)과 L-아스코르브산 (L-ascorbic acid)이 천연 항산화제로 선호되고 있는데, 그중 토코페롤은 안전성이 높으나 단독으로는 산화반응 저지 능력이 낮으며(Halliwell B. et al., *FASEB J.*, **2**, pp2867-2870, 1988) 가격이 비싸다는 단점이 있다.

<20> 잣나무는 소나무과에 속하는 침엽수의 일종으로, 그 성분으로 앞에는 정유, 플라보노이드, 아스코르브산, 유니페르산을 주성분으로 한 에스톨리드형 납이 함유되어 있으며, 가지에는 정유 성분이, 목부에는 피니톨, 피노실빈, 피노실빈-메틸에스테르, 플라보노이드인 크리신, 피노셉브린, 피노반크신, 크립토스트로빈 등이, 씨는 기름, 단백질, 회분, 카로틴, 비타민 B₂로 구성되어 있으며 단백질은 아르기닌, 히스티딘, 리진, 티로신, 류신, 글루탐산 등의 아미노산 성분이 함유되어 있으며, 껍질에는 탄닌질이 함유되어 있다.

<21> 열매인 해송자의 약리 효과로는 폐경, 위경, 대장경에 작용하며, 기와 심, 폐를 보하고 풍을 없애며 대소변이 잘 통하게 한다. 영양 작용과 동맥경화 예방 작용이 있고, 노인변비, 전신쇠약, 현훈증, 마른기침, 토혈 등에 쓰이며, 아토피성 피부병, 종기, 티눈, 신경통, 비만증에도 효과가 있다(동의학사전 편찬위원회 저, 신동의학 사전, 북피아, 2003).

<22> 잎은 방부약, 오줌내기약, 기침멧이약, 땀내기약으로 쓰이며, 가지는 류머티즘, 통풍, 허리통증에 쓰인다(문관심 저, 약초의 성분과 이용, 북한과학백과사전출판사, 1984).

<23> 그러나 상기 문헌 어디에도 잣나무잎의 항산화 활성에 대한 교시 또는 언급된 바는 없다.

<24> 이에 본 발명자들은 TOSC 분석(assay)법을 이용한 실험을 통하여 잣나무잎의 항산화 활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

<25>

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<26> 본 발명의 목적은 항산화 활성을 갖는 잣나무잎(*Pinus Koraiensis*)을 이용한 동물사육방법 및 이를 이용하여 생산된 기능성 산물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <27> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 향산화 활성을 갖는 잣나무잎(*Pinus Koraiensis*)을 이용한 동물사육방법 및 이를 이용하여 생산된 기능성 산물을 제공한다.
- <28> 구체적으로, 본 발명은 잣나무잎을 채취 및 분쇄하여 준비하는 제 1단계; 상기 잣나무잎을 5 내지 10%를 사용하여 사료에 배합하는 제 2단계; 상기 사료를 동물에 자유 채식토록 급여하여 기능성 산물을 생산하는 제 3단계를 포함하는 향산화 활성을 갖는 잣나무잎을 이용한 동물사육방법을 제공한다.
- <29> 상기 제 2단계에서, 잣나무잎을 배합한 사료의 구성배합비가 바람직하게는 사료 : 잣나무잎(15~25 : 0.1~10)의 중량비 (w/w), 더욱 바람직하게는 (15~20 : 1~5)의 중량비 (w/w)로 배합됨이 바람직하고, 또한 본 발명의 사료 총 중량에 대해 잣나무잎은 0.5 내지 20%, 보다 바람직하게는 1 내지 15%, 가장 바람직하게는 5 내지 10%를 유효성분으로 함유함을 특징으로 한다.
- <30>
- <31> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <32> 본 발명의 향산화 활성을 갖는 잣나무잎을 이용한 동물사육방법은 하기와 같이 제공될 수 있다.
- <33> 구체적으로, 국내 야산에서 자생하는 잣나무의 잎을 채취한 후, 분쇄기로 분쇄하는 제 1단계; 상기 제 1단계에서 준비된 잣나무잎은 시중에서 판매하는 동물사료에 배합하여 사용하는데, 잣나무잎의 사용량은 사료 사용량 대비 그 구성배합비가 사료 : 잣나무잎(15~25 : 0.1~10)의 중량비 (w/w), 더욱 바람직하게는 (15~20 : 1~5)의 중량비 (w/w)로 배합됨이 바람직하고, 또한 본 발명의 사료 총 중량에 대해 잣나무잎은 0.5 내지 20%, 보다 바람직하게는 1 내지 15%, 가장 바람직하게는 5 내지 10%를 사용하여 사료에 배합하는 제 2단계; 상기 제 2단계에서 배합된 잣나무잎 배합 사료를 자유 채식토록 하는 제 3단계의 과정을 통하여 본 발명의 향산화 활성을 갖는 잣나무잎을 이용한 동물사육방법을 제공한다.
- <34> 상기 동물은 말, 돼지, 소, 양, 염소, 낙타 및 리마 등의 포유류; 적색 도미, 비늘돔, 바스타드 헬리벳(bastard halibut), 넙치, 방어, 방어 치어, 앰버 잭(amberjack), 참치, 황색 연어, 은어, 연어, 송어, 타이거 복어, 장어, 미꾸라지, 메기, 잉어 및 금붕어 등의 어류; 전복, 터번 셀, 가리비 및 굴 등의 패류; 참새우, 블랙타이거 새우, 황해 참새우 및 블루 크랩 등의 갑각류; 및 꿩, 닭, 오리, 칠면조 및 타조 등의 가금류의 양식 동물 및 개, 고양이 등의 애완동물을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 본 발명은 육상 동물 및 수중 동물에 광범위하게 적용될 수 있다.
- <35> 또한, 본 발명은 상기 동물사육방법으로 생산된 향산화 활성을 갖는 잣나무잎을 이용한 기능성 산물을 제공한다.
- <36> 본 발명의 향산화 활성을 갖는 잣나무잎을 이용하여 생산된 기능성 산물은 원료육 및 이의 부산물 또는 가공육 및 이의 부산물임을 특징으로 한다.
- <37> 상기 원료육 및 이의 부산물은 꿩고기, 닭고기, 돼지고기, 말고기, 소고기, 양고기, 오리고기, 인조육, 칠면조고기, 토끼고기, 건조란, 달걀, 동결란, 메추리알, 분말달걀, 오리알, 간을 포함함을 특징으로 한다.
- <38> 상기 가공육 및 이의 부산물은 간으로 만든 파테(Pate), 간으로 만든 페이스트, 고기엑기스, 고기젤리, 돈까스, 레닛(Rennet), 베이컨, 부용(Bouillon), 부용제조제, 브로스(Broth), 블랙푸딩(블러드소시지), 비프스테이크, 샤르꾸페리(Charcuterie), 소시지, 소위(胃), 식용 골수, 식용 젤라틴, 육포, 통조림육, 병조림육, 이 유식용 육, 햄, 햄버거용 고기, 으갠소시지, 순대, 곱창, 탕수육을 포함함을 특징으로 한다.
- <39> 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- <40> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <41> **실시예 1. 잣나무잎을 이용한 동물의 사육방법**
- <42> 잣나무잎을 이용한 동물의 사육방법은 국내 야산에서 자생하는 잣나무의 잎을 채취한 후, 분쇄기로 분쇄하여 그 분쇄물을 시중에서 판매하는 동물사료에 5% 함량으로 배합하여 암·수로 섞어서 5두를 배치한 7주령의 듀록(Duroc), 랜드레이스(Landrace) 및 라지화이트(Large white)종 돼지에 4 주 동안 공급하였다. 돈방의 크기는 3 × 2.5m였으며, 사료는 자유 채식토록하고, 물은 자동급수기를 이용하여 자유로이 먹을 수 있도록 하였

고, 상기 방법으로 사육된 기능성 돼지로부터 얻은 혈장을 대상으로 하여 이를 본 발명의 항산화 실험에 사용하였다.

<43> 실험예 1. 항산화 활성의 측정

<44> 1-1. 시료의 준비

<45> 1-1-1. 잣나무잎 추출물의 제조

<46> 잣나무(*Pinus Koraiensis*)의 잎(충남 공주시) 80.45g을 취하여 2~4cm로 절단하여 이를 80% 메탄올(methanol) 500ml에서 상온으로 1시간씩 3번 초음파 추출(sonication)시켜 추출하였다.

<47> 이 추출액을 증류기(evaporator)를 이용하여 45℃에서 2 시간동안 농축시킨 후, 3일간 동결건조시켰다. 동결건조 후, 건조 중량은 최종적으로 5.31g이었으며, 이를 본 발명의 항산화 실험의 시료로 사용하였다.

<48> 1-1-2. 부추 추출물의 제조

<49> 국내산 부추(*Allium Tuberosum*, 대전광역시 유성구 월마트) 80.45g을 취하여 2~4cm로 절단하여 이를 80% 메탄올(methanol) 500ml에서 상온에서 1시간씩 3번 초음파 추출(sonication)시켜 추출하였다.

<50> 이 추출액을 증류기(evaporator)를 이용하여 45℃에서 2 시간 동안 농축시킨 후, 3일간 동결건조시켰다. 동결건조 후, 건조 중량은 최종적으로 5.24g이었으며, 이를 본 발명의 항산화 실험의 비교시료로 사용하였다.

<51> 1-1-3. 실험동물의 준비

<52> 상기 실시예 1의 돼지에서 혈장을 얻기 위해 돼지의 경정맥에서 혈액을 취한 후, 바로 상온에서 1분간 5,000×g에서 원심분리하여 혈장을 얻고 분석시까지 -70℃에서 보관하였다. 항산화 활성을 측정하기 위해 혈장을 200 또는 250배로 주사용 증류수로 희석하여 사용하였다.

<53> 1-2. 실험 방법

<54> 잣나무잎 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위하여 TOSC(Total Oxyradical Scavenging Capacity) 분석(assay)법을 이용하여 하기와 같이 라디칼 소거능 실험을 실시하였다.

<55> TOSC 분석(assay)은 윈스턴 등(Winston et al., *Free Radic. Biol. Med.*, Feb, 24(3), pp480-493, 1998)에 의해 제안되고 같은 저자들에 의해 수정된 방법(Regoli and Winston, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Apr 15, 156(2), pp96-105, 1999)을 이용하여 실시하였다. 퍼옥실 라디칼(Peroxyl radical)은 ABAP(2,2'-azobisamidinopropane)를 35℃에서 자유라디칼반응(thermal homolysis)시켜 발생시켰고(Winston et al., *Free. Radic. Biol. Med.*, Feb, 24(3), pp480-493, 1998), 하이드록실 라디칼(Hydroxyl radical)은 철(Fe)과 아스코르브산염(ascorbate)을 이용한 펜톤 반응(Fenton reaction; Winston and Cederbaum, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 9(2), pp95-102, 1985)으로, 과산화질산염(peroxynitrite)은 SIN-1의 자연 분해(spontaneous decomposition)를 통해 발생시켰다. 발생한 각각의 활성 산소종(reactive oxygen species)은 KMBA(α -keto- γ -methiolbutyric acid)와 반응하여 에틸렌 가스(ethylene gas)를 발생하며 이 반응은 일정 범위 내에서는 온도에 따른 차이를 나타내지 않는 것으로 보고된 바 있다(Winston et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 24(3), pp480-493, 1998; Regoli and Winston, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 156(2), pp96-105, 1999).

<56> 반응은 최종 용량(volume) 1 ml의 반응액을 고무로 된 셉텀(rubber septum)으로 밀폐된 10 ml 용기에 넣어 진행시켰다. 에틸렌 가스(Ethylene gas) 생성 검출은 반응용기의 헤드 스페이스(head space) 내부 공기를 일정 용량(volume) 취하여 포로팩 N 컬럼(Poropack N column)과 FID(flame ionization detector)를 장착한 GC(gas chromatography)로 분석하여 실시하였다.

<57> 그 실험결과, AUC(area under the kinetic curve)는 상기 실험측정치로부터 구한 그래프를 적분(integration)하여 얻었고, TOSC값은 하기 수학적 식 1을 통하여 산출하였다.

수학적 식 1

<58>
$$TOSC = 100 - \left(\int SA / \int CA \times 100 \right)$$

<59> $\int SA$ = 시료 반응의 곡선으로부터 적분한 범위

<60> (integrated area from the curve of the sample reaction)

<61> $\int CA$ = 대조군 반응의 곡선으로부터 적분한 범위

<62> (integrated area from the curve of the control reaction)

<63> 옥시라디칼 소거능(oxyradical scavenging capacity)을 전혀 갖지 못하는 시료의 경우에는 $\int SA / \int CA = 1$ 이 되며, TOSC = 0 의 값을 갖는다. 반대로 $\int SA \rightarrow 0$ 일때는, TOSC 값은 100 에 접근한다. TOSC 값은 대조군에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로 기기의 감도나 사용시약, 기타 반응조건에 영향을 받지 않는다.

<64> 에틸렌 가스(Ethylene gas)의 검출을 위해 포로팩 N 컬럼(Poropack N column)과 FID(flame ionizing detector)를 장착한 GC를 오븐(oven) 60℃, 인젝터(injector) 180℃ 및 디텍터(detector) 180℃로 고정하고, 이동상으로는 헬륨을 30ml/분의 속도로 컬럼으로 주입하였다. 바이알(Vial)의 에틸렌 가스(ethylene gas) 정량을 위해 헤드-스페이스 법(head-space technique)을 이용하여 바이알 안의 공기를 가스 밀폐된(gas-tight) 주사기로 150 μ l 취하여 가스 밀폐된(gas-tight) 주사기로 취하여 인젝터(injector)에 주입하여 실험하였다.

표 1

시 료	퍼옥실 라디칼 (Peroxyl Radical)	하이드록실 라디칼 (Hydroxyl Radical)	과산화질산염 (Peroxytrinitrite)
	(TOSC/mg)		
잣나무잎 추출물	3227 $\pm$ 727	410 $\pm$ 18	1076 $\pm$ 154
부추 추출물	1895 $\pm$ 193	429 $\pm$ 17	824 $\pm$ 182
글루타치온 (Glutathione)	940 $\pm$ 93	257 $\pm$ 27	347 $\pm$ 3

표 2

시 료	퍼옥실 라디칼	하이드록실 라디칼	과산화질산염
	TOSC/ml 혈장(plasma)		
대조군 (n=4)	5808 $\pm$ 1081 (100)	10784 $\pm$ 1794 (100)	5241 $\pm$ 623 (100)
잣나무잎 (n=5)	8838 $\pm$ 1888 (152)*	11418 $\pm$ 504 (106)	6833 $\pm$ 1019 (130)*
*대조군과의 유의성은 P<0.05으로 검정.			

<67> 잣나무잎 추출물, 음성 대조군인 부추 추출물 및 양성 대조군인 글루타치온의 항산화 활성은 상기 표 1에 나타내었다.

<68> 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 잣나무잎 추출물의 퍼옥실 라디칼 소거능 효과는 부추 추출물에 비하여 1.7-1.9배의 소거능 효과를 보였다. 대표적인 체내 항산화 물질인 글루타치온의 퍼옥실 라디칼에 대한 TOSC 값은 약 940TOSC/mg으로, 부추 추출물은 약 2배, 잣나무잎 추출물의 경우는 3-4배의 소거능 효과를 보였다(도 1, 도 2 및 도 3 참조).

<69> 하이드록실 라디칼 소거능 효과는 글루타치온의 TOSC 값인 약 260과 비교하였을 때, 잣나무잎 추출물 및 부추 추출물의 TOSC 값은 약 1.6-1.7배의 소거능 효과를 보였다(도 4, 도 5 및 도 6 참조).

<70> 과산화질산염에 대한 잣나무잎 추출물 및 부추 추출물의 소거능 효과는 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 글루타치온의 TOSC 값에 비하여 약 2.4-3.1배의 활성을 나타내었다(도 7, 도 8 및 도 9 참조).

<71> 잣나무잎을 4 주간 섭취한 돼지에서 얻은 혈장에서 분석한 항산화 활성은 상기 표 2에 나타내었다.

<72> 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 그 실험 결과, 하이드록실 라디칼에 대한 항산화 활성은 변화가 없었으나, 퍼옥실 라디칼 및 과산화질산염에 대한 소거능 효과는 각각 1.5배 및 1.3배로 증가하였다.

<73> 모든 결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며, 통계적 유의성을 검증하기 위해 스튜던트 t 검정법(Student's t-test)을 수행하였다.

발명의 효과

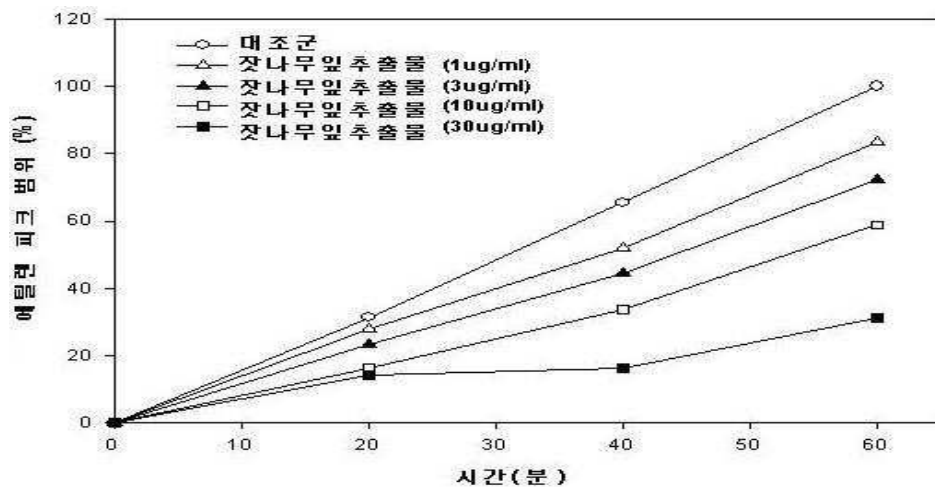
<74> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 잣나무잎(*Pinus Koraiensis*)을 이용한 동물의 사육방법 및 이를 이용하여 생산된 기능성 산물은 육질 개선, 이취 감소 및 각종 성인병 예방의 이익을 주므로 이를 이용해 생산된 기능성 산물은 농가 소득 증대에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

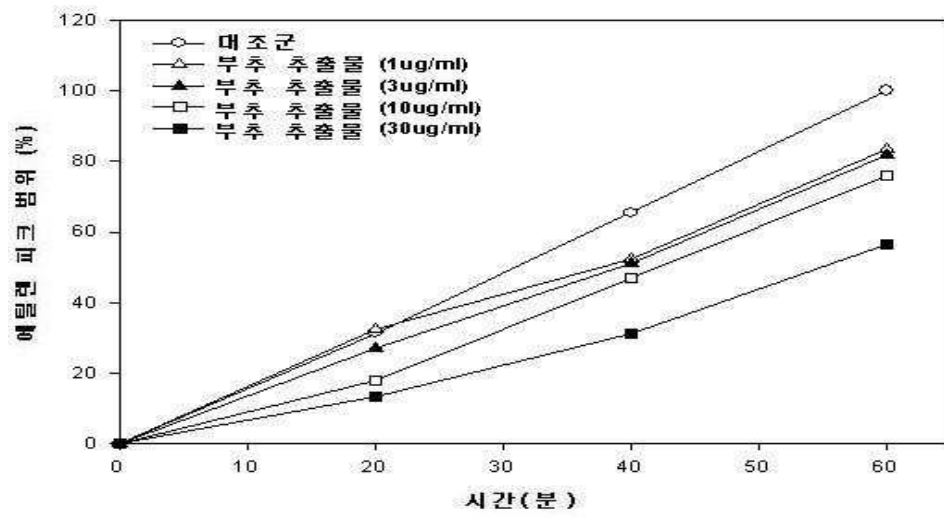
- <1> 도 1은 퍼옥실 라디칼에 대한 잣나무잎 추출물의 항산화 활성을 나타낸 도이고,
- <2> 도 2는 퍼옥실 라디칼에 대한 부추 추출물의 항산화 활성을 나타낸 도이며,
- <3> 도 3은 퍼옥실 라디칼에 대한 글루타치온의 항산화 활성을 나타낸 도이고,
- <4> 도 4는 하이드록시 라디칼에 대한 잣나무잎 추출물의 항산화 활성을 나타낸 도이며,
- <5> 도 5는 하이드록실 라디칼에 대한 부추 추출물의 항산화 활성을 나타낸 도이고,
- <6> 도 6은 하이드록실 라디칼에 대한 글루타치온의 항산화 활성을 나타낸 도이며,
- <7> 도 7은 과산화질산염에 대한 잣나무잎 추출물의 항산화 활성을 나타낸 도이고,
- <8> 도 8은 과산화질산염에 대한 부추 추출물의 항산화 활성을 나타낸 도이며,
- <9> 도 9는 과산화질산염에 대한 글루타치온의 항산화 활성을 나타낸 도이다.

도면

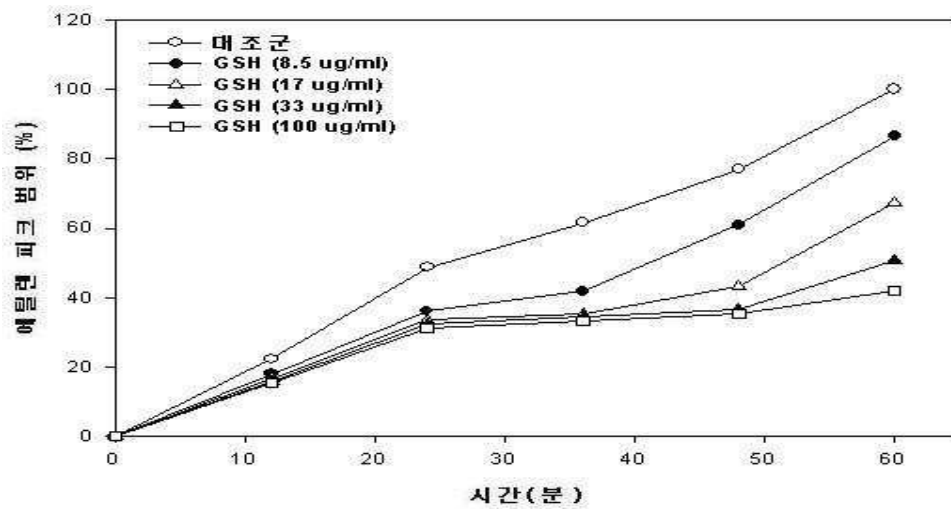
도면1



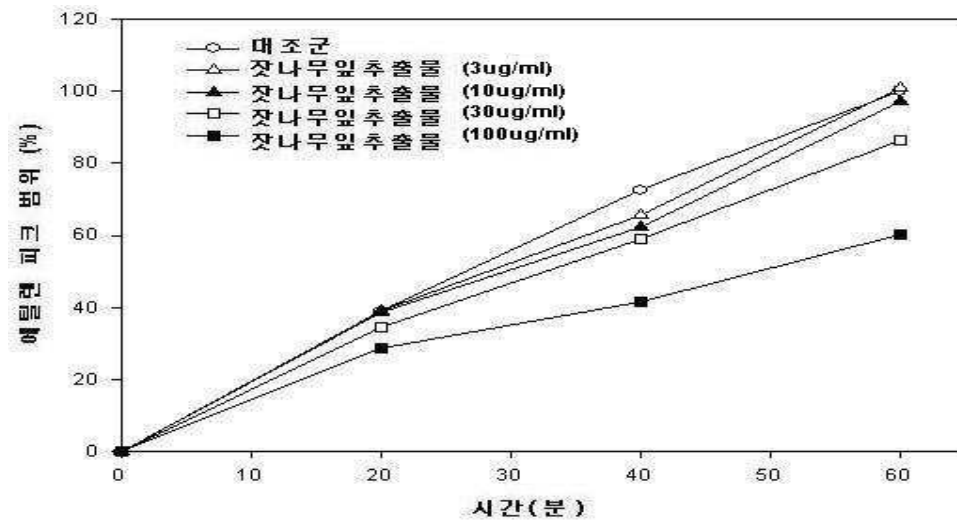
도면2



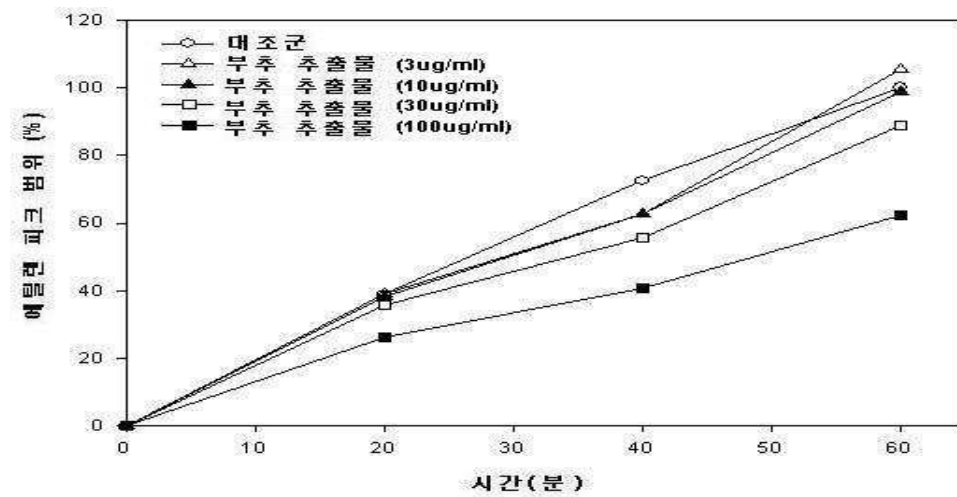
도면3



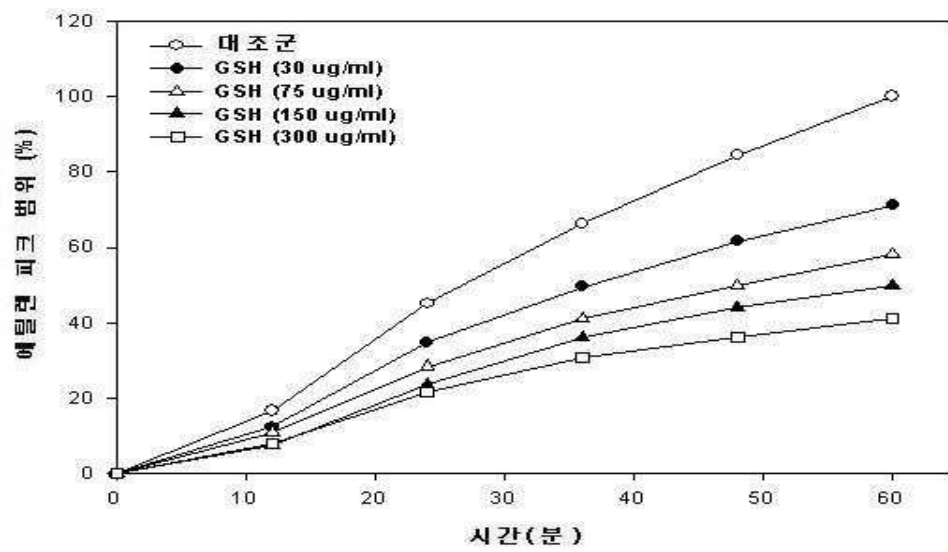
도면4



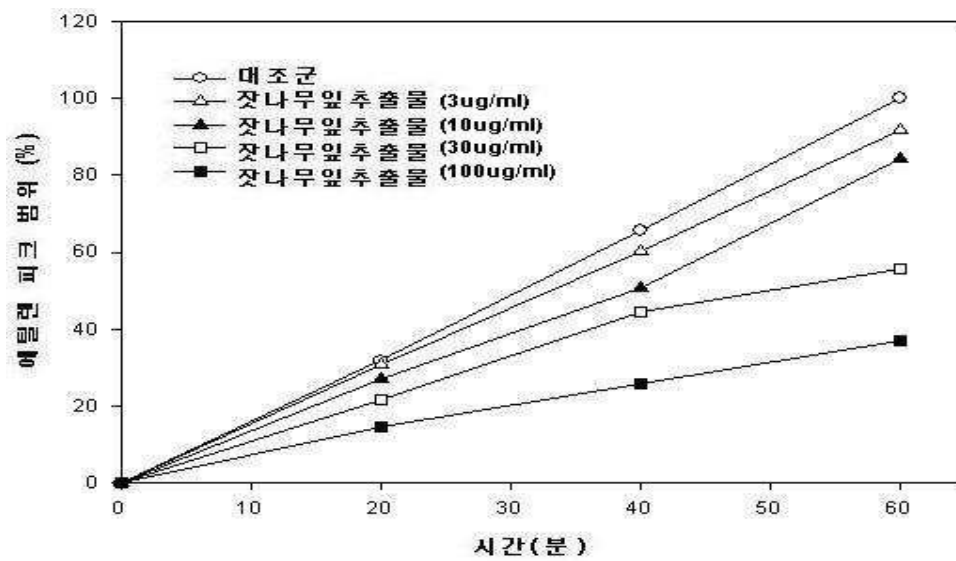
도면5



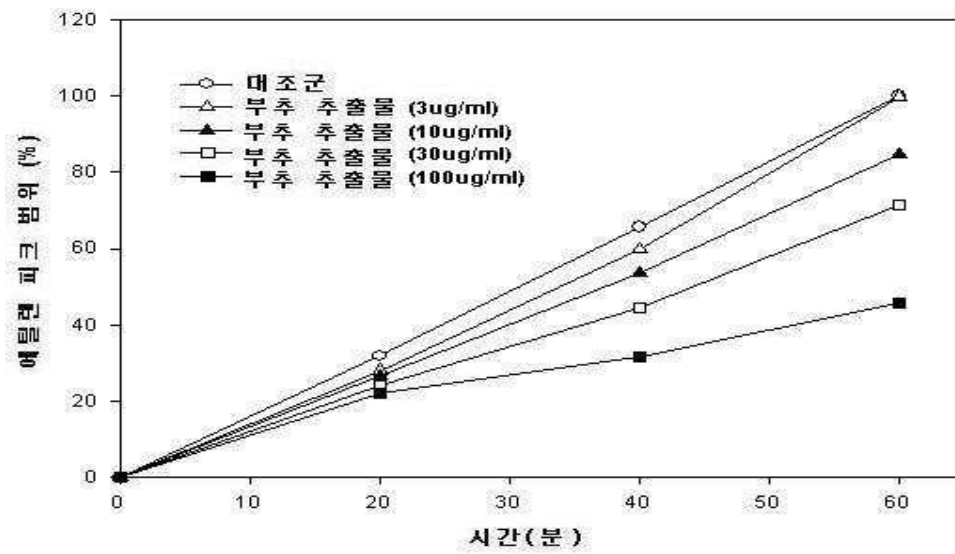
도면6



도면7



도면8



도면9

