



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A23L 1/29 (2006.01)

A61K 36/725 (2006.01)

A61P 17/18 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0079638

(43) 공개일자 2007년08월08일

(21) 출원번호 10-2006-0010408

(22) 출원일자 2006년02월03일

심사청구일자 2006년02월03일

(71) 출원인 계명대학교 산학협력단
대구 달서구 신당동 1000번지
이인선
대구광역시 달서구 도원동 1443번지 강산타운 409동 1002호

(72) 발명자 이인선
대구광역시 달서구 도원동 1443번지 강산타운 409동 1002호
유미희
대구 달서구 용산동 평화타운 301-701
임효권
대구 수성구 수정1가 536-10번지 한백빌라 106-102
이효정
대구 북구 태전동 에덴 APT 103-1302
이효주
대구 수성구 만촌2동 972-40번지

(74) 대리인 특허법인 율촌

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 항산화 활성을 갖는 풋대추 추출물 및 이를 함유하는 기능성 식품

(57) 요약

본 발명은 항산화 기능을 갖는 대추 추출물 및 이를 함유하는 기능성 식품에 대한 것으로, 대추를 알코올 용매로 추출한 항산화 기능성 대추 추출물 및 이를 함유하는 식품첨가제와 기능성 식품을 제공하여, 높은 항산화 활성을 갖고, 초기 산화억제효과가 뛰어난 천연 항산화제를 제공할 수 있으며, 식품으로써의 일상적인 섭취가 가능하도록 하여 노화를 방지하고 각종 질병을 예방할 수 있는 발명이다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

대추를 물 또는 알코올 및 이들의 혼합물로 추출한 항산화 기능성 대추 추출물.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 대추는 꽃대추인 것을 특징으로 하는 항산화 기능성 대추 추출물.

청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항의 대추 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화 기능성 식품첨가제.

청구항 4.

제 1 항 또는 제 2 항의 대추 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 포함하는 항산화 기능성 식품.

청구항 5.

제 4 항에 있어서,

상기 기능성 식품은 대추 추출물을 전체 식품 조성물에 대하여 적어도 0.01중량% 이상 함유하는 것임을 특징으로 하는 항산화 기능성 식품.

청구항 6.

제 4 항에 있어서,

상기 기능성 식품은 정제, 과립제, 연질캡셀제 및 액제 제형 중에서 선택된 것임을 특징으로 하는 항산화 기능성 식품.

청구항 7.

제 4 항에 있어서,

상기 기능성 식품은 음료 또는 다류임을 특징으로 하는 항산화 기능성 식품.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 항산화 활성을 갖는 대추 추출물 및 이를 함유하는 기능성 식품에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 대추를 추출하여 활성산소를 제거하여 항산화 활성을 갖는 식품첨가제 및 기능성 식품에 관한 것이다.

일반적으로 활성산소(자유라디칼)는 체내에 들어온 산소가 완전연소하지 못하고 일부 불완전 환원되는데, 이 때 생긴 화합물을 말하는 것으로, 그 주된 원인은 호흡하는 과정이나 음식물 대사과정을 통하여 필연적으로 발생되고, 담배의 타르 성분, 매연의 가스, 번비, 가공식품, 스트레스 및 자외선 등이 활성산소를 유발 또는 활성화시킨다.

활성산소의 반응성은 산소분자처럼 매우 낮은 것에서부터 과산화 라디칼(superoxide radical, $O_2 \cdot$), 수산화 라디칼(hydroxyl radical, $OH \cdot$), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 단일체 산소(singlet oxygen, 1O_2)와 같이 매우 높은 것에 이르기까지 다양하다(Wettasinghe M, Shahidi F. Scavenging of reactiveoxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. Food Chem. 70: 17-26 (2000)). 이들은 생체에 치명적인 산소독성을 일으키며, 세포막 분해, 단백질 분해, 지질 산화, DNA 변성 등을 초래하여 세포의 기능장애를 유발하고 암을 비롯한 뇌졸중, 파킨슨 병 등의 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 염증, 노화, 자가면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다(Sawyer DT, Valentine JS. How super is superoxide ACC. Chem. Res. 14: 393 (1981); Fridorich, I. Biological effects of the superoxide radical. Arch. Biophys. 247: 1-11 (1986); Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative diseases. Science. 221: 1256-1264 (1983)). 특히 생체막의 구성 성분인 불포화지방산을 공격하여 생성되는 과산화 지질의 축적은 생체 기능의 저하나 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다(Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev. 59: 527-605 (1979)). 그러므로 활성 산소를 방어하는 항산화 물질이 이러한 질병의 치료 가능성 때문에 주목받고 있으며, 그 중 천연물에서 추출한 천연 항산화제에 관한 연구가 활발하다.

천연물 중에서도 과채류는 비타민(vitamin), 카로티노이드(carotenoids), 플라보노이드(flavonoids)와 같은 페놀성 화합물들이 다량 존재하여, 항산화성, 항알러지성, 항암성 등 다양한 생리기능을 갖고 있는 것으로 밝혀졌다. 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서, 탄소 수에 따라 페놀산, 탄닌, 플라보노이드 등의 다양한 물질로 나눌 수 있고 최근에는 다양한 식물을 대상으로 항산화 활성과 기능성 소재로서의 활용에 대한 연구가 진행되고 있다. 페놀성 화합물의 다양한 항산화력은 그 구조적인 특징과 관련성이 높는데, 이들은 금속 킬레이트제, 환원제로서, 활성산소의 소거제로서, 사슬절단 항산화제(chain breaking antioxidants)등으로서의 역할에 기인하는 것으로 알려져 있다. 그리고 플라보노이드는 페놀성 화합물 중에서 자연적으로 생성되는 가장 큰 그룹의 하나로서, 안토시아닌(anthocyanins), 칼콘(chalcones), 아우론(aurones), 플라본(flavones), 플라보놀(flavonols) 및 이들의 유도체 등으로 나눌 수 있다. 현재까지 페놀성 화합물 및 플라보노이드의 구조에 따른 항산화 활성과의 상관성에 대한 연구도 보고되었다(Kandaswami C, Middleton EJ. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. In Free radicals in diagnostic medicine. Plenum Press, Armstrong D, de. New York and London. pp. 351-376 (1994)).

한편, 현재 가장 많이 사용하고 있는 합성 항산화제인 BHA 및 BHT는 그 효과는 우수하지만 변이원성과 발암성이 문제시되고 있으며(Branen AS. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. JAOCS. 52: 59-63 (1975)), 토코페롤(tocopherol)류와 같은 천연 항산화제는 효과가 낮은 문제점이 있다.

본 발명자들은 과채류 중에서도 대추를 이용하였을 때, 천연항산화제 및 합성항산화제로 널리 알려진 아스코르브산(ascorbic acid)과 부틸 히드록시아니솔(BHA;butylated hydroxyanisole)과 비교하여 동등 이상의 항산화 활성 능력을 갖고 있음을 실험을 통하여 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서 본 발명은 대추를 추출하여 높은 항산화 활성 효과를 갖도록 하는 대추 추출물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은 대추 추출물을 이용하여 항산화 활성 효과를 갖는 기능성 식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 대추를 물 또는 알코올 및 이들의 혼합물로 추출한 항산화 기능성 대추 추출물을 제공한다.

상기 대추는 꾀대추인 것을 특징으로 한다.

또한 본 발명은 상기 대추 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화 기능성 식품첨가제를 제공한다.

아울러 본 발명은 상기 대추 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 포함하는 항산화 기능성 식품을 제공한다.

상기 기능성 식품은 대추 추출물을 전체 식품 조성물에 대하여 적어도 0.01중량% 이상 함유하는 것을 특징으로 한다.

상기 기능성 식품은 정제, 과립제, 연질캡셀제 및 액제 제형 중에서 선택된 것을 특징으로 한다.

상기 기능성 식품은 음료 또는 다류임을 특징으로 한다.

이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

대추(*Zizyphus Jujuba* var. *inermis* Rehder)는 갈매나무과(Ramnaceae)의 *Zizyphus*속의 낙엽, 활엽향목의 열매로서, 현재 약 40여종의 품종과 400여종의 변종이 있는 것으로 알려져 있다. 대추는 예부터 자양강장의 효과가 있고, 이뇨제, 건이통 완화제, 만성기관지염, 거담제, 결핵, 위의 허한증을 치료하는 효능 등 46가지 약리 효과가 있어, 우리나라 사람 대부분 약을 달일 때나 물을 끓일 때 대추 한두 알씩은 꼭 넣어서 끓이는 풍습을 가지고 있다. 뿐만 아니라 대추는 소화완화, 강장, 항알레르기, 간 보호 작용이 있으며 그 밖에 대장암과 같은 성인병 예방, 결핵, 기관지염 및 신경쇠약에 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다(Rhee YK, Kim DH, Han MJ. Inhibitory effect of *Zizyphi fructus* on β -glucuronidase and tryptophanase of human intestinal bacteria. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 199-205 (1998); Na HS, Kim KS, Lee MY. Effect of jujube methanol extract on the hepatotoxicity in CCl_4 -treated rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 25: 839-845 (1996); Lee YG, Cho SY. Effect of jujube methanol extract on benzo(a)pyrene induced hepatotoxicity. J. Korean Soc. Food Nutr. 24: 127-132 (1995)).

또한 대추는 당질과 아스코르브산(ascorbic acid)이 다량 함유되어 있다. 특히 대추의 과실의 성분으로는 각종 스테롤(sterols), 알칼로이드(alkaloids), 사포닌(saponins), 비타민(vitamins), 유기산류, 아미노산(amino acid)류 등이 함유되어 있으며, 종자의 성분으로는 주로 올레산(oleic acid), 리놀릭산(linoleic acid)의 불포화 지방산으로 이루어진 지방유와 사포닌(saponin), 에블린(eblin), 락톤(lacton) 등이, 잎의 성분으로는 플라보노이드(flavonoids), 알칼로이드(alkaloids), 비타민 C(vitamin C), 루틴(rutin)등이, 가시수피에는 알칼로이드(alkaloids)가, 뿌리에는 사포닌(saponin)등이 함유되어 있다고 보고되어 있다(Yook CS. Screening test on the components of the genus *Zizyphus* in Korea (in Korean). Kor. J. Pharmacog. 3: 27-29 (1972); Lee SK. Studies on the constituents of the leaves of *Zizyphus jujuba* Mill. Ph. d. Thesis, Pusan National University, Seoul, Korea (1989); Park MK, Park JH, Shin YG, Cho KH, Han BH, Park MH. Analysis of alkaloids in the seeds of *Zizyphus jujuba* by high performance liquid chromatography(in Korean). Arch. Pharm. Res. 14: 99-102 (1991)).

본 발명에서의 대추 추출물은 꾀대추, 완숙대추 또는 건대추 과육을 이용하여 얻어질 수 있는데, 바람직하기로는 꾀대추 과육으로부터 추출물을 얻는 것이다. 이는 완숙대추나 건대추의 경우 당분 함량이 60~80%인데 비하여, 꾀대추의 경우는 20~36%로 당분 함량이 낮고, 비타민C 등의 비타민군과 여러 생리활성물질들의 함량은 높기 때문인 것으로 생각된다.

상기 대추를 이용하여 추출물을 얻기 위해서는 대추 과육과 씨를 모두 사용할 수 있으며, 상기 추출물의 최종 형태로는 액기스 또는 농축된 여액을 건조한 분말 형태가 모두 가능하다.

구체적으로, 상기 대추를 과육과 씨를 분리하여 물을 첨가하여 열수추출하거나, 알코올 수용액을 첨가하여 추출한 후 여과 및 농축하여 액기스를 제조한다.

본 발명에 따른 열수추출은 정제수를 가한 후 100℃에서 4시간동안 3회 추출한다. 알코올 수용액을 첨가할 때에는 5 ~ 100% 메탄올 또는 에탄올 중에서 선택된 알코올 수용액을 사용하며, 바람직하게는 70~80% 알코올 수용액을 사용하여 실온에서 24시간동안 3회 추출한다.

또한 본 발명은 상기 제조된 엑기스를 건조하여 분말 상태로 사용할 수 있다. 상기 건조 방법은 통상적인 방법을 모두 사용할 수 있으며, 바람직하게는 동결건조 방법을 사용한다.

본 발명에서 이와 같은 대추 추출물을 기능성 식품에 적용하는 경우, 효과적인 측면에서 바람직한 함량은 전체 조성물에 대하여 대추 추출물을 적어도 0.01중량% 이상이다. 대추 추출물의 경우 그 함량이 과량으로 포함되더라도 독성을 나타내지는 않으므로 그 첨가량의 상한을 설정하는 것은 특별한 의미가 없다 할 것이다.

본 발명은 상기 수득된 대추 추출물을 통상적인 식품에 첨가하여 통상적으로 알려진 방법에 의하여 각종 식품을 제조할 수 있고, 또한 일반적인 제형으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 대추 추출물은 세포독성시험 결과 식품으로 사용하기에 적합한 것이다.

이하, 본 발명을 하기의 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명하기로 하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명이 하기의 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

대추 100g을 깨끗이 수세하여 과육과 씨로 각각 분리한 후, 각각을 80% 메탄올로 실온에서 24시간씩 3회 반복 추출하고, 여과지(Whatman No.3 England)를 사용하여 여과하고, 회전진공농축기(BUCHI Rotavapor R-205 Switzerland)로 감압 농축하여 과육 47 °Bx 및 씨 28.8 °Bx의 엑기스를 얻었다.

<실시예 2>

실시예 1과 같은 방법으로 엑기스를 제조하고, 이를 동결 건조하여 과육 87 g 및 씨 0.94 g의 대추 추출 분말을 얻었다.

<실험예 1> 총 폴리페놀 함량

폴리페놀계 물질들은 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(OH)기를 가진 방향족 화합물들을 가리키며, 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화-환원반응에서 기질로 작용하며, 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로, 충치 예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다(Yoshizawa S, Horiuchi T, Yoshida T, Okuda T. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. Phytotner. Res. 1: 44-47 (1987)).

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J. Biol. Chem. 12: 239-249 (1912))을 응용하여 측정하였다. 즉, 각 메탄올 추출물 시료 1mg을 증류수 1ml에 녹이고 10배 희석한 희석액에 2배 희석한 Folin 시약 2ml를 첨가하고, 잘 혼합한 후 3분간 방치하여 10% Na₂CO₃ 2ml를 넣고 1시간 반응시킨 후, UV/Visible spectrophotometer(UVIKON 922, Kontron, Italy)를 사용하여 700nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 이 때 탄닌산(tannic acid)을 이용한 표준곡선은 탄닌산의 최종농도가 5, 25, 50 µg/ml가 되도록 하여 상기와 같은 방법으로 700nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량의 측정 결과는 하기 표 1과 같다.

<실험예 2> 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등(Nieva MM, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol. 71: 109-114 (2000))의 방법에 의해 측정하였다. 각 시료 추출물 0.1ml와 80% ethanol 0.9ml를 혼합한 혼합물 0.5ml에 10% aluminium nitrate와 1 M Potassium acetate 0.1ml 그리고 80% ethanol 4.3ml를 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 흡광도를 표준물질로 사용한 케르세틴(quercetin) 검량선과 비교하여 총 플라보노이드의 함량을 구하였다. 케르세틴을 이용한 표준곡선은 케르세틴의 최종농도가 5, 25, 50 µg/ml가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 415nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다. 총 플라보노이드 함량 측정 결과는 하기 표 1과 같다.

[표 1]

구분	총 폴리페놀 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)*	총 플라보노이드 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)*
과육	98.83 $\pm$ 4.70	35.56 $\pm$ 6.42
씨	138.99 $\pm$ 7.39	131.48 $\pm$ 4.31

* Each value is mean $\pm$ S.D.(n $\geq$ 3).

총 폴리페놀 함량 측정 결과, 대추 과육 추출물의 총 폴리페놀 함량은 98.83 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 대추씨 추출물은 138.99 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 대추 과육 보다는 대추씨에서 높은 폴리페놀 함량을 보였다.

총 플라보노이드 함량은 대추 과육과 대추씨 추출물이 각각 35.56 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 및 131.48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 대추씨에서 플라보노이드 함량이 높게 나타나 대추씨의 폴리페놀성 물질은 대부분이 플라보노이드 성분임을 알 수 있었다.

국내산 식품 중의 총 폴리페놀 함량을 살펴보면 홍화씨, 순 및 꽃이 각각 12.34, 5.10, 8.05%를 함유하여 씨에서 높은 폴리페놀 함량을 보여(Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 1127-1132 (2000)) 대추와 유사한 경향이였다.

선인장의 경우 폴리페놀 함량이 씨 1.47g, 줄기 1.86g, 열매 3.4~4.9g으로 열매에 비교적 많은 양의 폴리페놀을 함유한 것으로 나타나(Lee YC, Hwang KH, Han DH, Kim SD. Compositions of opuntia ficus-india. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 847-853 (1997)) 대추의 과육 및 씨 추출물과는 다른 경향을 보였다.

그리고 산채류인 섬고사리와 물영정귀 잎의 총 폴리페놀 함량은 각각 120.69, 130.22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이었고, 플라보노이드 함량은 각각 16.75, 13.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 보고되었다(Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung Island. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 233-240 (2005)).

이 결과와 비교했을 때, 대추 과육 및 대추씨 추출물은 산채류와 유사하게 비교적 많은 양의 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있으며, 특히 대추씨의 플라보노이드 함량이 매우 높음을 알 수 있었다.

<실험예 3> α - α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거활성

DPPH는 짙은 자색을 띄는 비교적 안정한 free radical로서 시스테인(cystein), 글루타티온(glutathione)과 같은 함 유황 아미노산과 ascorbic acid, BHA 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 자유 라디칼은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 페놀성 화합물의 경우 자유라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 자유 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다(An BJ, Lee JT, Lee SA, Kwak JH, Park JM, Lee JY, Son JH. Antioxidant effects and application as natural ingredients of korean sanguisorbae officinalis L. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47: 244-250 (2004)).

DPPH radical에 대한 각 시료의 환원력을 측정하기 위해 99% 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 800 μl 와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 200 μl 를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC_{50} 값으로 나타내었다. 이때 활성비교를 위하여 BHA와 ascorbic acid를 사용하였으며 시료농도의 1/10이 되도록 첨가하여 같은 방법으로 항산화 효과를 측정하였다. 그 결과는 하기 표 2와 같다.

[표 2]

구분	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	소거활성(%)*	RC_{50}

대추	과육	10	31.79± 3.36	27.49± 7.5
		50	79.58± 8.02	
		100	92.14± 4.99	
	씨	10	26.64± 5.02	27.54± 5.5
		50	79.32± 5.24	
		100	95.80± 6.1	
BHA		1	25.45± 8.21	3.11± 1.15
		5	94.94± 6.03	
		10	96.34± 0.29	
아스코르브산		1	14.27± 1.26	2.09± 1.03
		5	95.16± 3.83	
		10	96.52± 1.3	

* Each value is mean±S.D.(n≥3).

대추 과육 및 대추씨 추출물과 BHA, ascorbic acid의 DPPH 소거 활성을 농도별로 측정하여 비교한 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대추 과육이 92%, 대추씨가 95%의 소거능을 보였고, BHA와 ascorbic acid(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 96% 정도의 항산화능을 보여 대추 추출물에서도 우수한 소거활성능이 있음을 알 수 있었다. 그리고 대추 과육 및 대추씨 추출물의 RC_{50} 값은 약 27.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로, 한국산 약용식물 중 오동나무 열매의 RC_{50} 값이 27.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 유사한 소거능을 가짐을 확인하였다. 이 Lee 등(Lee SE, Seong NS, Bang JK, Park CG, Sung JS, Song J. Antioxidatives activities of Korean medicinal plants. Korean J. Medicinal Crop Sci. 11: 127-134 (2003))에 의하면, 고로쇠나무 잎, 모과나무 잎, 산수유 잎, 배롱나무 꽃, 오동나무 열매의 RC_{50} 값이 각각 39.4, 46, 44.4, 29.6, 27.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이고, Jung 등(Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (Omija) seed. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 928-935 (2000))은 오미자 종자의 메탄올 추출물의 RC_{50} 값을 33.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로, Li 등(Li XF, Li Y, Nam KW, Kim DS, Chio HD, Son, BW. Screening of radical scavenging activity from the marine-derived fungus. Korean J. Pharmacogn. 33: 219-223 (2002))은 해양균류의 라디칼 소거능을 측정하여 RC_{50} 값을 29~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 보고하였다. 따라서 대추 과육 및 대추씨 추출물은 이들 시료보다는 다소 낮지만 비교적 높은 소거활성능을 가진 것을 알 수 있다.

<실험예 4> ABTS radical 소거활성

혈장에서 ABTS의 양이온 라디칼의 흡광도가 항산화제에 의해 억제되는 것에 기초하여 개발된 ABTS 라디칼 소거활성법은 표준물질인 Trolox의 값과 비교하여 나타낼 수 있으며, *in vivo*에서의 항산화능 측정뿐만 아니라 *in vitro*에서도 항산화능을 측정하기 위한 방법으로 널리 이용되고 있다(Rice-Evans CA, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. Methods Enzymol. 234: 279-293 (1994); Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin. Sci. 84: 407-412 (1993); Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free radical Biol. Med. 20: 933-956 (1996)).

ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치하여 $\text{ABTS}^+ \cdot$ 이 생성되면 추출물의 항산화력에 의해 $\text{ABTS}^+ \cdot$ 이 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 값으로 나타내어 추출물의 $\text{ABTS}^+ \cdot$ 의 소거활성능을 측정할 수 있다.

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 $\text{ABTS}^+ \cdot$ cation decolourisation assay방법(Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol. Med. 26: 1231-1237 (1999))에 의하여 시행하였다. 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma Chemical Co., USA)와 2.45 mM potassium persulfate를 최

중농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+ ·을 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이 0.70(± 0.02)이 되게 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 용액 990 µl에 sample 10 µl를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 하기 표 3과 같다.

【표 3】

구분		농도 (μg/ml)	소거활성(%)*
트롤록스(trolox)		15	63.24± 0.94
대추	과육	10	20.55± 1.23
		100	99.11± 0.60
	씨	10	24.15± 3.57
		100	98.58± 0.58
BHA		1	19.04± 3.10
		10	99.38± 0.81
아스코르브산		1	25.57± 0.27
		10	99.86± 0.17

* Each value is mean± S.D.(n≥3).

대추 과육 및 대추씨 추출물의 ABTS+ · 소거활성을 트롤록스(Trolox), BHA, ascorbic acid와 비교 측정한 결과, ABTS+ · 소거활성법에서 표준물질로 사용되는 Trolox는 15µm에서 63% 정도의 소거활성능을 보여 Robtrea 등(Robtrea RE, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine. 26: 1231-1237 (1999))의 결과와 거의 일치하였고, 추출물은 100 µg/ml에서 98~99% 정도의 ABTS+ ·의 높은 소거활성을 보였으며, BHA와 ascorbic acid는 10 µg/ml에서 99% 이상의 우수한 소거활성능을 보였다. 이는 대추 과육 및 대추씨 추출물이 100 µg/ml의 농도에서 약 92~95%의 DPPH · 소거활성을 나타낸 것과 유사한 결과이며, BHA와 ascorbic acid에서도 같은 경향이었다.

<실험예 5> 과산화수소(Hydrogen peroxide) 소거활성

Hydrogen peroxide radical에 대한 소거활성은 Mπller 등(Mπller HE. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium. Zentralbl Bakteriolo. Mikrobio. Hyg. 259: 151-158 (1985))의 방법에 따라 96 well micro plate에 PBS 100µl, 물에 녹인 시료 20 µl을 넣고 1 mM H₂O₂를 가하여 5분간 방치한 다음 1.25 mM ABTS 30 µl와 PBS에 녹인 1/mlµg peroxidase 30 µl를 첨가하여 37℃에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 하기 표 4와 같다.

【표 4】

구분		농도 (μg/ml)	소거활성(%)*
대추	과육	10	10.88± 1.62
		100	60.12± 5.02
	씨	10	14.61± 3.35
		100	72.15± 4.44
BHA		1	7.76± 1.53
		10	43.68± 9.79
아스코르브산		1	20.63± 1.92
		10	65.45± 5.75

* Each value is mean $\pm$ S.D.(n $\geq$ 3).

과산화수소(Hydrogen peroxide) 소거활성을 측정한 결과, 같은 농도에서 DPPH radical이나 ABTS radical 소거활성보다 다소 낮은 소거활성능을 보였으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대추 과육 추출물은 약 60%, 대추씨 추출물은 약 72%의 소거활성을 보였는데, 이는 대추 과육에 비해 대추씨 추출물의 flavonoid 함량이 높기 때문인 것으로 생각된다. Flavonoid 화합물의 항산화력은 B ring의 hydroxylation의 위치와 수에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 특히 3',4'-dihydroxyl group을 가질 때 항산화력이 높은 것으로 알려져 있어(Ohigashi H, Osawa T, Terao J, Watanabe S, Yoshikawa T. Food factors for cancer prevention. Springer, Tokyo. pp. 613-616 (1997)), 대추씨에 다량 함유된 flavonoid 화합물의 구조적인 차이 때문에 대추 과육에 비해 특히 hydrogen peroxide 소거활성에 더 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다. Park 등(Park SW, Chung SK, Park JC. Active oxygen scavenging activity of Luteolin-7-O- β -D-Glucoside Isolated from *Humulus japonicus*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 106-110 (2000))은 환삼덩굴에서 분리한 luteolin-7-o- β -D-glucose가 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 62.4%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 93.9%의 hydrogen peroxide 소거활성을 나타낸다고 보고하였고, 이는 구조적으로 3',4'-dihydroxyl group에 의한 radical scavenging 작용, benzene ring의 공명효과에 의한 stability 증가 등에 의해 활성이 강하게 나타나는 것으로 보고하였다.

BHA 및 ascorbic acid 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 hydrogen peroxide에 대한 활성을 나타내지 못하였고, ascorbic acid 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 65%의 소거활성을 보여 대추씨 추출물이 단일물질로 분리·정제가 된다면 BHA나 ascorbic acid의 소거활성보다 훨씬 더 우수한 hydrogen peroxide 소거활성을 가질 수 있을 것임을 알 수 있다.

<실험예 6> 리놀레산(Linoleic acid)에 대한 항산화 효과

식품으로서의 지질이나 생체구성 지질은 산화되어 식품의 품질이나 생체에 부정적인 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있는데, 식품 중에 존재하는 지질은 대기 중의 산소와의 반응에 의한 산화적 산패 혹은 식품이나 미생물에서 유래하는 리파아제(lipase)가 촉매하는 가수분해 반응에 의해 쉽게 변질될 수 있으며(Lee SE, Seong NS, Bang JK, Park CG, Sung JS, Song J. Antioxidative activities of Korean medicinal plants. Korean J. Medicinal Crop Sci. 11: 127-134 (2003)), 생체막에 존재하는 지질도 라디칼에 의해 지방산으로부터 수소원자가 박탈됨으로써 산화되기 시작하여 반응성이 높은 유리 라디칼이 형성된다. 지질의 산화에 의해 생성된 hydroperoxide가 촉매력이 강한 전이 금속들에 의해 분해되어 만들어지는 alkoxy radicals ($\text{RO}\cdot$), peroxy radicals ($\text{ROO}\cdot$), hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) 및 malondialdehyde나 4-hydroxynonenal 등은 간접적으로 단백질과 DNA의 손상을 일으킬 뿐만 아니라 노화와 암 발생의 중요한자이기도 하다 (Farag RS, Badei A, Hewedi FM, Baroty GS. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic and oxidation in aqueous media. JAOCS. 66: 792-799 (1989)).

지질산화 초기에 발생하는 과산화물은 ferrous chloride(Fe^{2+})를 ferric chloride(Fe^{3+})로 산화시켜 적갈색을 띄게 되며, 지질산화가 계속 진행되면 malonaldehyde와 같은 저분자의 활성화합물이 생성되는데 이것은 TBA와 결합하여 적색의 화합물을 형성하게 된다.

리놀레산(Linoleic acid)의 과산화에 대한 저해 효과 검정은 Haraguchi 등(Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A. Antioxidative substances in leaves of Polygonum hydropiper. J. Agric. Food Chem. 40: 1349-1351 (1992))의 방법에 준해 다음과 같이 실험하였다. Linoleic acid의 기질용액은 95%의 에탄올에 녹인 2.52% linoleic acid 4 ml, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 8 ml와 absolute alcohol 4 ml를 가하여 제조한 후 cap을 한 뒤 40°C에서 100 rpm으로 12일간 incubation하였다. 먼저 FTC가의 측정을 위해서 Linoleic acid 반응기질용액 0.1 ml를 취해 75% ethanol 9.7 ml, 30% ammonium thiocyanate 0.1 ml, 20 mM ferrous chloride 0.1 ml와 혼합하여 3분간 방치한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 도 1과 같다.(I : Control, II : 대추 과육 추출물 10 $\mu\text{g/ml}$, III : 대추 과육 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$, IV : 대추 씨 추출물 10 $\mu\text{g/ml}$, V : 대추 씨 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$, VI : BHA 1 $\mu\text{g/ml}$, VII : BHA 10 $\mu\text{g/ml}$)

대추 과육과 대추씨 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$, BHA 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 높은 산화억제효과를 보였으며, 실험 12일째 대추 과육 및 대추씨 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$, BHA 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조구에 비해 가장 높은 산화억제효과가 나타났는데, 이는 Mohd 등(Mohd ZZ, Abdul-Hamid A, Osman A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu(*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. Food Chem. 78: 227-231 (2002))이 발표한 월계수의 부위별에 따른 추출물의 산화억제 효과와 유사한 경향을 보였다.

한편, TBA가의 측정을 위해 기질용액 1 ml에 20% trichloroacetic acid 2 ml와 0.8% thiobarbituric acid 시약 2 ml을 가한 후 혼합하여 95℃ 수욕 상에서 20분 동안 반응시켰다. 이 반응액을 실온에서 냉각시키고 3000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다. 그 결과는 도 2와 같다. (I : Control II : 대추 과육 추출물 10 µg/ml III : 대추 과육 추출물 100 µg/ml IV : 대추 씨 추출물 10 µg/ml V : 대추 씨 추출물 100 µg/ml VI : BHA 1 µg/ml VII : BHA 10 µg/ml)

양성 대조구(positive control)로 사용한 BHA 1 µg/ml 및 10 µg/ml은 대추 과육, 대추씨 추출물 100 µg/ml의 농도에서와 유사한 수준의 산화억제 효과를 나타내었다. 대추 과육과 대추씨를 비교해 본 결과 10 µg/ml의 농도에서 유사한 수준의 산화억제율을 나타냈고, 100 µg/ml에서는 대추 과육이 대추씨보다 항산화 효과가 더 높은 것으로 관찰되었으나, 이들 시료사이의 유의적인 차이는 없는 것으로 보인다. Mohd 등(Mohd ZZ, Abdul-Hamid A, Osman A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu(*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. Food Chem. 78: 227-231 (2002))은 월계수를 부위별로 하여 과산화물가의 변화를 보았는데 합성항산화제인 BHT와 월계수 뿌리, α-Tocopherol이 항산화 효과가 높은 것으로 측정되었고 대추 과육과 월계수 열매 추출물을 비교했을 때 대추 과육의 산화억제 효과가 더 우수한 것을 알 수 있었다. Ismail 등(Ismail M, Manickam E, Danial AM, Rahmat A, Yahaya A. Chemical composition and anitioxidant activity of *Strobilanthes crispus* leaf extract. J. Nutr. Biochem. 11: 536-542 (2000))에 의하면 *Strobilanthes crispus* 잎의 ethyl acetate 추출물 (0.2 mg/ml)을 처리시에 FTC가는 95% 이상의 산화억제율을 보였고, TBA가는 linoleic acid의 산화가 약 85% 정도 억제되었다고 보고하였다.

따라서 본 실험에 사용된 대추 과육 및 대추씨 추출물의 경우에도 FTC가(약 91%)와 TBA가(84~86%)의 값의 차이는 보였으나 산화억제 효과가 우수함을 알 수 있었고, 대추 과육 및 대추씨 추출물은 DPPH 및 ABTS radical에 대해 높은 소거활성을 보일 뿐만 아니라 과산화수소(hydrogen peroxide)의 소거활성능이 뛰어나며 리놀레산(linoleic acid)의 산화를 초기단계에서 효과적으로 억제하여 산화의 진행을 상당히 지연시키는 것을 알 수 있었다. 이는 대추에 함유된 여러 가지 유용성분들 중 폴리페놀 화합물의 항산화 작용에 기인한 것이라 생각되며 이는 대추 과육 뿐만 아니라 대추씨를 천연 항산화제 및 기능성 식품으로 이용할 수 있는 가능성을 시사한다.

<실험예 7> V79 세포주에 대한 항산화 효과

Nakayama 등(Nakayama T, Hori K, Terazawa K, kawakishi S. Comparision of the cytotoxicity of different hydroperoxides to V79 cells. Free radical Res. Commun. 14: 173-178 (1991))은 식품첨가제로 사용되는 식물성 폴리페놀인 NDGA (nordihydroguaia-retic acid)가 H₂O₂가 일으키는 세포독성에 대한 보호효과를 가진다고 보고하였고, 따라서 다른 폴리페놀계 물질들도 유사한 생리활성을 가질 것이라고 보고하였다.

이에 대추 추출물의 항산화능을 측정하기 위해 Nakayama 등(Nakayama T, Niimi T, Osawa T, Kawakishi S. The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. Mutat. Res. 281: 77-80 (1992))의 방법에 준하여 colony formation assay를 실시하였다. 이때 사용된 V79 cell(Chinese hamster lung fibroblast)은 Dr. Tsutomu Nakayama (University of Shizuoka, Japan)로부터 분양받았다.

V79 cell은 Minimum Essential Medium(MEM)에 fetal bovine serum(FBS), antibiotics을 첨가하여 활성화되도록 하고, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. V79 cell의 수를 200개/dish(60mm)로 조정하여 10% FBS가 첨가된 MEM배지에서 2시간 배양한 후, 배지를 제거하고 FBS가 없는 MEM 배지에 시료를 첨가한 후 4시간동안 배양하였다. 배양된 세포를 HBS (HEPES buffer saline : NaCl 0.8%, KCl 0.04%, NaHPO₄ · 12H₂O 0.025%, glucose 0.1%, HEPES 0.59%, pH 7.0)로 세척한 다음, 50µm의 H₂O₂가 첨가된 HBS를 넣고 30분간 다시 배양한 후 10% FBS가 첨가된 MEM을 넣어 5일간 배양하였다. 배양 후 MEM배지를 제거하고 99% 메탄올을 첨가하여 cell을 고정시킨 다음 Giemsa stain으로 염색하여 세포수를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료 무첨가 대조군에 대한 시료첨가군의 세포수로 표시하여 도 3에 나타내었다. (I : Control, II : 대추 과육 추출물 10 µg/ml, III : 대추 과육 추출물 100 µg/ml, IV : 대추 씨 추출물 10 µg/ml, V : 대추 씨 추출물 100 µg/ml)

V79 cell을 이용하여 H₂O₂로 유도된 세포독성에 대한 대추 과육 및 대추씨 추출물의 세포보호 효과를 살펴본 결과, H₂O₂만 처리한 세포의 생존율이 36% 정도인데 비해 대추 과육 및 대추씨 추출물을 함께 처리하였을 때는 100 µg/ml의 농도에서 생존율이 각각 52% 및 64%로 증가하여 대추씨 추출물이 H₂O₂로 유도된 세포독성에 대해 높은 세포보호 효과를 가지는 것을 알 수 있다. 천연 항산화 물질인 카페인산(caffeic acid), 케르세틴(querctetin) 및 카테킨(catechin)을 동일한 방법

으로 측정하였을 때, 그 생존율이 각각 55%, 51%, 42%로 나타났다는 보고(Nakayama T, Yamada M, Osawa T, Kawadishi S. Inhibitory effects of caffeic acid ester in H_2O_2 induced cytotoxicity and DNA single strand breaks in Chinese Hamster V79 cells. Biosci. Biotech. Biochem. 60: 316-318 (1996); Nakayama T, Yamada M, Osawa T, Kawadishi S. Suppression of active oxygen induced cytotoxicity by flavonoids. Biochem. Pharm. 45: 265-267 (1993))와 비교할 때, 대추씨 추출물은 이들 천연 항산화 물질들에 비해 세포독성에 대한 보호효과가 더 우수함을 알 수 있었다.

또한 Nakayama 등(Nakayama T, Niimi T, Osawa T, Kawakishi S. The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. Mutat. Res. 281: 77-80 (1992))은 갈릭산(gallic acid)과 메틸에스테르(methyl gallate), 프로필 에스테르(propyl gallate), 라우릴 에스테르(lauryl gallate) 등의 갈릭산 에스테르(gallic acid esters)의 H_2O_2 로 유도된 세포독성에 대한 보호효과를 보고하였는데, 갈릭산(gallic acid) 자체에는 아무런 세포보호 효과가 없었으나, 메틸에스테르(methyl gallate) 40 μ m에서 60%, 프로필 에스테르(propyl gallate) 10 μ m에서 80%, 라우릴 에스테르(lauryl gallate)의 경우, 가장 낮은 농도인 100 nM에서 70%, 200 nM에서 100%의 생존율을 보여 매우 강한 항산화능이 존재함을 확인하였다.

<제조예 1> 음료의 제조

실험예 2에서 제조한 과육 추출 분말 및 씨 추출 분말이 혼합된 대추 추출물 분말 20중량%, 비타민B₁ 염산염 0.00075중량%, 비타민B₂ 인산에스테르나트륨 0.00075중량%, 비타민B₆ 염산염 0.00045중량%, 엽산 0.00005중량%, 니코틴산아미드 0.003중량%, 구연산 0.095중량%, 당류 25.3중량% 및 정제수 54.6중량%를 혼합하여 여과하는 단계와 이들 혼합물을 90℃ 이상에서 20초간 살균하여 충전한 후 85℃에서 30분간 살균하여 음료를 제조하였다.

<제조예 2> 정제의 제조

실시에 2에 의하여 제조된 과육 추출 분말 및 씨 추출 분말이 혼합된 대추 추출 분말 500mg, 유당 100mg, 전분 100mg을 혼합하고 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<제조예 3> 과립제의 제조

실시에 2에서 제조한 과육 추출 분말 및 씨 추출 분말이 혼합된 대추 추출물 분말 35중량%, 비타민C 0.3중량%, 포도당 28중량%, 덱스트린 28중량%, 70% 에탄올 8.7중량%를 함께 반죽하고 과립제조기를 통과시켜 과립 60mesh의 과립을 제조하였다.

<제조예 4> 캡슐제의 제조

실시에 1에 의하여 제조된 과육 엑기스(47°Bx) 및 씨 엑기스(28.8°Bx)의 혼합엑기스 500mg, 유당 50mg, 전분 50mg, 탈크 2mg을 혼합하고, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

발명의 효과

이상에서 설명한 바와 같이 본 발명은 대추를 이용하여 높은 항산화 활성을 갖고, 초기 산화억제효과가 뛰어난 천연 항산화제로서 대추 추출물 및 이를 함유하는 기능성 식품을 제공하여, 식품으로써의 일상적인 섭취가 가능하도록 하여 노화를 방지하고 각종 질병을 예방할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

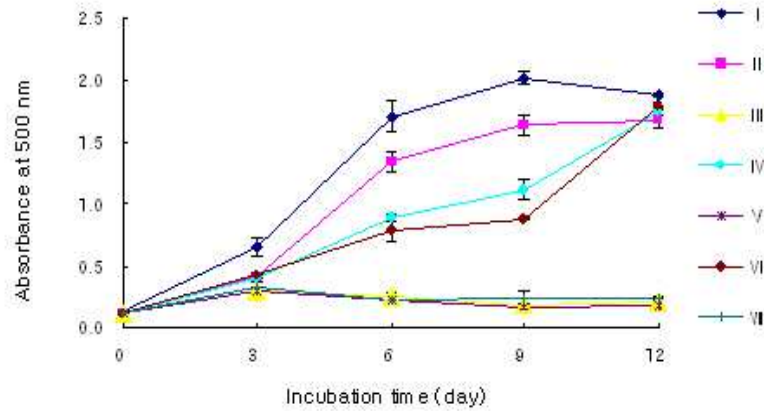
도 1은 본 발명의 대추 추출물과 BHA 및 아스코르브산을 리놀레산(linoleic acid) 기질에 첨가하여 측정한 FTC가를 나타낸 그래프,

도 2는 본 발명의 대추 추출물과 BHA 및 아스코르브산을 리놀레산(linoleic acid) 기질에 첨가하여 측정한 TBA가를 나타낸 그래프,

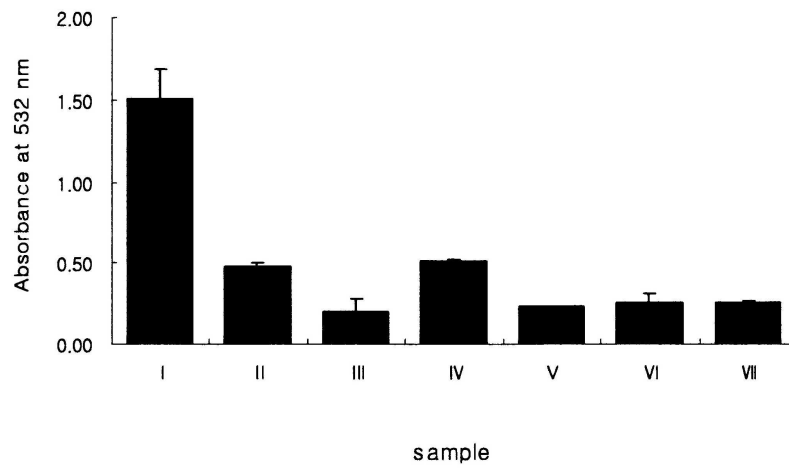
도 3은 본 발명의 대추 추출물과 BHA 및 아스코르브산을 V79 세포주의 과산화수소가 일으키는 세포독성에 대한 생존율을 나타낸 그래프이다.

도면

도면1



도면2



도면3

