



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0049209
(43) 공개일자 2017년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) A23F 3/34 (2006.01)
A23L 33/15 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23F 3/34 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0150302
(22) 출원일자 2015년10월28일
심사청구일자 2015년10월28일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
심순미
경기도 성남시 분당구 동판교로 156, 909동 902호(삼평동, 붓들마을9단지금호어울림아파트)
박태식
경기도 성남시 수정구 복정로72번길 16, 203호 (복정동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

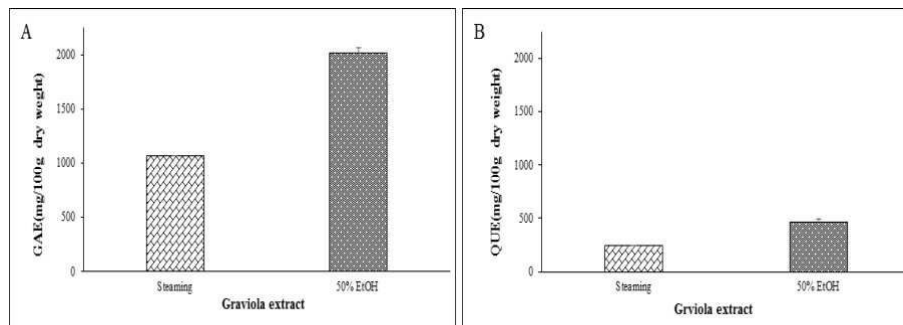
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 브로콜리 또는 배추가 첨가됨으로써 항산화능이 강화된 그라비올라 조성물

(57) 요약

본 발명은 브로콜리 또는 배추가 첨가됨으로써 항산화능이 강화된 그라비올라 조성물에 관한 것으로, 항산화력이 한층 증진된 그라비올라 조성물 또는 그라비올라 추출물을 제공한다. 본 발명은 티백 형태로 제조되어 차로 음용될 수 있고, 기타 그라비올라가 첨가되는 식품 또는 건강기능식품에 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/15 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)
A23V 2250/2117 (2013.01)
A23V 2250/70 (2013.01)

최은혜

서울특별시 서초구 강남대로30길 77-3, 202호(양재동)

(72) 발명자

손유라

서울특별시 광진구 능동로15길 22, A동 402호(화양동, 채움하우스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A2A01007627

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 십자화과 식물 유래 S-methylmethionine의 생체이용률 증진을 통한 소화기관계 질환 예방

효능

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교

연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

건조중량 기준으로 그라비올라 1중량부 대비 0.3~1.5 중량부 만큼의 브로콜리 또는 0.2~1.0 중량부 만큼의 배추가 그라비올라에 첨가된 것을 특징으로 하는 항산화능 강화 그라비올라 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 그라비올라는,

그라비올라의 잎인 것을 특징으로 하는 항산화능 강화 그라비올라 조성물.

청구항 3

건조중량 기준으로 그라비올라 1중량부 대비 0.3~1.5 중량부 만큼의 브로콜리 또는 0.2~1.0 중량부 만큼의 배추가 그라비올라에 첨가된 항산화능 강화 그라비올라 조성물에, 열수를 가하여 추출한 것을 특징으로 하는 항산화능 강화 그라비올라 열수 추출물.

청구항 4

그라비올라에 열수를 가하여 추출한 그라비올라 열수 추출물에, 브로콜리 또는 배추에 열수를 가하여 추출한 브로콜리 열수 추출물 또는 배추 열수 추출물을 첨가하되,

상기 브로콜리 또는 배추는, 건조중량 기준으로 그라비올라 1중량부 대비 0.3~1.5 중량부 만큼의 브로콜리 또는 0.2~1.0 중량부 만큼의 배추인 것을 특징으로 하는 항산화능 강화 그라비올라 열수 추출물.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서,

상기 그라비올라는,

그라비올라의 잎인 것을 특징으로 하는 항산화능 강화 그라비올라 열수 추출물.

청구항 6

루틴(rutin), 캠페롤-루티노사이드(kaempferol-rutinoside), 비타민 U가 중량비로 6 : 7 : 3~7로 조성된 것을 특징을 하는 항산화 조성물.

청구항 7

루틴(rutin), 캠페롤-루티노사이드(kaempferol-rutinoside), 비타민 U가 중량비로 7~9 : 7 : 2로 조성된 것을 특징을 하는 항산화 조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,
상기 조성물은,
식품 조성물인 것을 특징으로 하는 항산화 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,
상기 식품 조성물은,
활성산소의 과다 축적으로 말미암은 질환의 개선용인 것을 특징으로 하는 항산화 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 브로콜리 또는 배추가 첨가됨으로써 항산화능이 강화된 그라비올라 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 그라비올라(graviola) 나무는 가시여지 나무로도 불리우는데, 학명은 아노마 무리카타 (*Annona muricata*)이다. 원산지는 아메리카의 열대지방이며, 6~7m 정도까지 자란다. 잎은 달걀모양 또는 긴 타원형이고, 길이가 7.5~15 cm 정도이다. 잎은 끝이 뾰족하고, 잎자루 부분은 썩기모양이다. 잎은 매끈하고, 윤기가 나며, 잎자루는 짧다.
- [0004] 그라비올라 나무의 꽃은 향기가 강하고, 길이는 0.5~2.5cm 정도이다. 꽃받침조각은 꽃잎에서 좀 떨어져 있는데, 크기가 3~5cm 정도이다. 꽃잎은 6장의 겹잎으로 되어 있다. 겹꽃잎은 두껍고, 가죽질이며, 넓은 달걀모양인데, 끝은 뾰족하고, 부드러운 털로 덮여 있다. 겹꽃잎은 처음에 녹색을 띠다가 점차 연녹색으로 변한다. 속꽃잎은 겹꽃잎과 어긋나서 피는데 꽃잎의 크기가 좀 작다.
- [0005] 그라비올라 나무의 열매는 사우어썩(Soursop)으로 불리며, 포르투갈어로는 그라비올라(Graviola), 스페인어로는 구아나바나(Guanabana)라고 한다. 열매의 무게는 2kg 정도이며, 때로는 6kg까지 나가는 것도 보고된 바 있다. 열매는 타원형으로 녹색을 띠는데, 향기가 나며, 겉면에는 가시가 있다. 해면질로 된 흰 과육은 망고, 파인애플의 맛과 비슷하나 신맛이 많이 난다. 과육은 잘게 썰어 설탕에 재워 먹으며 아이스크림, 청량음료, 발효음료의 원료로 쓰인다.
- [0006] 한편, 그라비올라 잎에 관한 이전 연구는 아세토게닌이라는 35~36개의 탄소지방산으로 이루어진 그라비올라 파생물질에 초점을 두었다. 그라비올라 잎에서 분리한 아세토게닌 성분인 무리코레아신(muricoreacin)과 무리헥소신(murihexocin)은 체장과 전립선 암세포에 상당한 독성을 가지는 것으로 보고되어 있다.
- [0007] 또한, 아세토게닌이 풍부한 그라비올라 잎 추출물이 산화적 스트레스로 유발되는 다양한 질환을 예방하는 항산화 효능을 함유하고 있는 것으로 여러 문헌으로부터 이미 입증되었다 (De Sousa et al., *Int J Mol. Sci.*, 2010, 11, 2067-2078; Ezirim et al., *Indian J Drugs Dis*, 2013, 2, 142-151; Muthu & Durairaj, *Euro. J. Exp. Bio.*, 2015, 5, 39-45; Torres et al., *Cancer letters*, 2012, 323, 29-40). 그러나, 그라비올라의 몇몇 아세토게닌류는 알칼로이드계로 잠재적인 독성을 함유하고 있으며, 산화적 스트레스로 발생한 손상에 존재하는 면역 세포 수를 줄인다고 보고하였다 (Moghadamtousi et al., *J. Ethnopharmacol.*, 2014, 156, 277-289). 반면에, 항산화 활성 물질로 알려진 페놀릭 에시드 및 플라보노이드 글라이코사이드가 그라비올라 잎 에탄올 추출물로부터 분리되어 UV에 노출된 피부세포 HaCaT의 항산화능을 높였음을 확인한 바 있다 (Nawwar et al., *Arch Pharm Res.*, 2012, 35, 761-767.).
- [0008] 그런데, 식품 소재로서 그라비올라의 활용에 대한 연구는 아직 활발하지 못하며, 더욱이 그라비올라의 항산화

효능을 한층 더 강화할 수 있는 방안에 대한 연구 개발은 아직까지 구체적으로 진행된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1071414호에는, 과나바나(*Annona muricata*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 조성물에 관한 것으로, 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출되는 과나바나 추출물이, 멜라닌 생성 세포주의 멜라닌 생성을 저해하고, 티로시나아제 효소 활성을 저해하여, 미백 효과를 나타내는 것으로 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명에서는, 상기에서 살펴본 바와 같이 우수한 항산화 효능을 보유한 그라비올라의 항산화능을 한층 증진시킬 수 있는 방안에 대해 연구하여 개발하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 건조중량 기준으로 그라비올라 1중량부 대비 0.3~1.5 중량부 만큼의 브로콜리 또는 0.2~1.0 중량부 만큼의 배추가 그라비올라에 첨가된 것을 특징으로 하는 항산화능 강화 그라비올라 조성물을 제공한다. 이때, 상기 그라비올라는 바람직하게 그라비올라의 잎을 사용하는 것이 좋다.
- [0014] 한편, 본 발명은 건조중량 기준으로 그라비올라 1중량부 대비 0.3~1.5 중량부 만큼의 브로콜리 또는 0.2~1.0 중량부 만큼의 배추가 그라비올라에 첨가된 항산화능 강화 그라비올라 조성물에, 열수를 가하여 추출한 것을 특징으로 하는 항산화능 강화 그라비올라 열수 추출물을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 그라비올라에 열수를 가하여 추출한 그라비올라 열수 추출물에, 브로콜리 또는 배추에 열수를 가하여 추출한 브로콜리 열수 추출물 또는 배추 열수 추출물을 첨가하되, 상기 브로콜리 또는 배추는, 건조중량 기준으로 그라비올라 1중량부 대비 0.3~1.5 중량부 만큼의 브로콜리 또는 0.2~1.0 중량부 만큼의 배추인 것을 특징으로 하는 항산화능 강화 그라비올라 열수 추출물을 제공한다. 이때, 상기 그라비올라는 바람직하게 그라비올라의 잎을 사용하는 것이 좋다.
- [0016] 본 발명에서는 그라비올라가 자체 보유한 항산화능을 한층 강화시킬 수 있는 방안에 대해 예의 연구하였다. 하기 본 발명의 실험에 의할 경우, 그라비올라 잎 추출물은 야생형의 경우, 효능물질인 루틴(rutin), 캄페롤-루티노사이드(kaempferol-rutinoside), 비타민 U가 중량비로 6:7:2 정도로 구성되어 있는 것으로 확인되었다. 본 발명에서는 이들 지표물질의 성분을 변화시키면서 항산화능이 어떻게 변하는지를 실험하였고, 비타민 U를 3~7 중량부로 올리거나, 루틴을 7~9 중량부로 올릴 경우, 그렇지 않은 경우에 비해 항산화능이 유의적으로 상승함을 확인할 수 있었다.
- [0017] 한편, 본 발명에서는, 상기 항산화능 증진 효과를 기술로 구현하되, 합성 화합물이 아닌 천연물을 그라비올라에 첨가하고자, 루틴 또는 비타민 U가 많이 함유되어 있는 천연물을 탐색하였다. 그 결과, 루틴은 어성초에 많이 함유되어 있음을 확인할 수 있었고, 비타민 U는 브로콜리 또는 배추에 많이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.
- [0018] 루틴의 경우, 야생형 어성초에 함유되어 있는 루틴의 양을 확인한 후, 이를 어성초의 양으로 환산하여 본 발명의 그라비올라에 첨가하려고 시도하였다. 하지만, 어성초 내 루틴의 함량이 너무 낮아, 루틴의 함량 증대를 통한 그라비올라의 항산화력을 증진시키기 위해서는, 그라비올라 대비 어성초를 너무 많이 (약 100배 정도) 첨가해야 하는 것으로 나타났다. 따라서, 그라비올라에 어성초를 첨가하는 것은 무리가 있는 것으로 판단되었다.
- [0019] 한편, 비타민 U의 경우, 브로콜리 또는 배추에 충분히 많은 양의 비타민 U가 함유되어 있어, 건조중량 기준으로 그라비올라 1중량부 대비 0.3~1.5 중량부 만큼의 브로콜리 또는 0.2~1.0 중량부 만큼의 배추를 그라비올라 1중량부에 첨가할 경우, 비타민 U 함량의 증가에 따른 항산화력이 증진된 그라비올라 조성물을 제조할 수 있었다.

- [0020] 상기와 같이 브로콜리 또는 배추가 첨가되어 항산화력이 강화된 그라비올라 조성물은 천연물로만 배합된 조성물이기 때문에, 합성 첨가물을 꺼려하는 현대 소비자들의 기호를 충분히 충족시킬 수 있는바 시장성이 우수하다 할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 그라비올라 조성물은 티백 등에 담아 차 형태로 제공됨으로써, 소비자가 편히 음용할 수 있고, 또한 그라비올라를 첨가하는 여러 식품에 그라비올라 대용으로 사용될 수 있다.
- [0022] 한편, 본 발명은 루틴(rutin), 캠페롤-루티노사이드(kaempferol-rutinoside), 비타민 U가 중량비로 6 : 7 : 3~7로 조성된 것을 특징을 하는 항산화 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 루틴(rutin), 캠페롤-루티노사이드(kaempferol-rutinoside), 비타민 U가 중량비로 7~9 : 7 : 2로 조성된 것을 특징을 하는 항산화 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 실험에 의한 경우, 그라비올라 잎 추출물은 야생형의 경우, 루틴(rutin), 캠페롤-루티노사이드(kaempferol-rutinoside), 비타민 U가 중량비로 6:7:2 정도로 조성되어 있는 것으로 확인되었다. 그런데, 비타민 U를 3~7 중량부로 올리거나, 루틴을 7~9 중량부로 올릴 경우, 그렇지 않은 경우에 비해 항산화능이 유의적으로 상승함을 확인할 수 있었다.
- [0024] 한편, 본 발명의 항산화 조성물은 일 예로서, 식품 조성물일 수 있고, 상기 식품 조성물은, 바람직하게 활성산소의 과다 축적으로 말미암은 질환의 개선용일 수 있다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명은 항산화력이 한층 증진된 그라비올라 조성물 또는 그라비올라 추출물을 제공한다. 본 발명은 티백 형태로 제조되어 차로 음용될 수 있고, 기타 그라비올라가 첨가되는 식품 또는 건강기능식품에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 그라비올라 잎 열수 추출물과 50% 주정 추출물의 총 페놀릭에시드 (도 1에서 A) 및 총 플라보노이드 (도 1에서 B) 함량 측정 결과이다.
- 도 2는 그라비올라 잎 추출물의 플라보놀인 루틴과 캠페롤-루티노사이드의 LC/MS를 통한 정성분석과 정량분석 결과이다.
- 도 3은 그라비올라 잎 추출물에서 비타민 U의 MS를 통한 정량분석 결과이다.
- 도 4는 그라비올라 잎 추출물의 자유라디칼 소거능 확인 실험결과이다. 도 4에서 A는 과산화기 소거능, B는 질산기소거능 결과이다.
- 도 5는 과산화수소 처리된 HepG2 세포의 그라비올라 잎 추출물에 의한 산화적 스트레스 저해 효과를 보여준다.
- 도 6은 그라비올라 잎 추출물에 의한 항산화 효소인자 및 전사인자의 mRNA 발현 변화 결과를 보여준다.
- 도 7은 ORAC assay를 통한 그라비올라 과산화 라디칼 소거능을 확인한 결과로서, 루틴의 조성비를 증가시킨 그라비올라 열수 추출물과 50% 주정 추출물의 항산화능 평가 결과이다. 도 7에서 A는 열수 추출물, B는 50% 주정 추출물의 결과이다.
- 도 8은 ORAC assay를 통한 그라비올라 과산화 라디칼 소거능을 확인한 결과로서, 비타민 U의 조성비를 증가시킨 그라비올라 열수 추출물과 50% 주정 추출물의 항산화능 평가 결과이다. 도 8에서 A는 열수 추출물, B는 50% 주정 추출물의 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함하는 것으로 한다.

- [0031] **[실시예 1: 그라비올라 잎 추출물 제조]**
- [0032] 본 실시예에서는 필리핀에서 수확하여 건조된 형태로 한국 (주)그라비올라앤네이처 회사로 수입된 그라비올라 잎을 사용하였다. 그라비올라 잎 열수 추출물은 20kg의 건잎을 141℃, 6시간 동안 발효 후 100℃ 이하에서 2시간 동안 2톤의 물과 끓임으로써 수득하였다. 그 후, 잎을 제거한 추출물을 55℃ 감압농축하여, 수분을 제거하고, 동결건조하여 가루화한 형태로 수득한 다음 20℃ 냉동보관하였다.
- [0033] 또 다른 형태의 추출물로서, 그라비올라 잎 50% 주정 추출물을 수득하였다. 63.7g의 그라비올라 건잎과 20배 중량의 50% 주정을 배양기에 넣고, 55℃, 70 rpm 으로 24시간 동안 추출하였다. 추출물을 8 μ m 필터지에 여과하고, 감압농축과 동결건조로 수분을 제거하였다. 가루형태로 만든 후 20℃ 상태에서 냉동보관하였다.
- [0035] **[실험예 1: 그라비올라 잎 추출물의 총 페놀릭엑시드와 총 플라보노이드 함량 측정]**
- [0036] 식물의 2차 대사산물로서 항산화, 항균 등 다양한 생리활성을 나타내는 페놀릭엑시드와 플라보노이드 함량의 측정을 통하여, 실시예 1에서 수득한 두 그라비올라 잎 추출물의 함량을 측정 및 비교하였다.
- [0037] 총 페놀릭엑시드(phenolic compound) 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 응용하여 측정하였다. 그라비올라 잎 열수 추출물과 주정 추출물의 동결건조 파우더 1 g을 각각 1 mL에 용매에 녹인 1 mL 그라비올라 잎 추출물과 5 mL Folin-Ciocalteu 용액을 혼합한 후 4mL의 7.5% 탄산나트륨을 추가로 혼합하였다. 상온에서 60분 동안 기다린 후 마이크로플레이트 리더 (Thermo Scientific)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0038] 한편, 총 플라보노이드 함량은 염화 알루미늄의 색 변화를 알아보는 실험방법으로 측정하였다. 2mL 그라비올라 잎 추출물과 0.1mL의 1M 초산나트륨을 혼합하여 상온에 6분간 반응시켰다. 0.1mL의 염화 알루미늄과 2.8mL 증류수를 추가하여 총 5mL이 되게 한다. 30분간 반응 후, 마이크로플레이트 리더 (Thermo Scientific)로 415nm의 흡광도를 측정하였다.
- [0039] 실험 결과, 도 1에서 보는 바와 같이, 그라비올라 잎 열수 추출물의 총 페놀릭엑시드 함량은 1064.11 $\pm$ 8.18 GAE mg/100 g 건조 중량, 50% 주정 추출물은 2018.25 $\pm$ 47.47 GAE mg/100 g 건조 중량으로 나타났다.
- [0040] 또한, 총 플라보노이드의 함량을 살펴보면, 도 1에서 보는 바와 같이, 그라비올라 잎 열수 추출물은 242.55 $\pm$ 3.01 QUE mg/100g 건조중량, 그라비올라 잎 50%주정 추출물은 464.81 $\pm$ 24.33 QUE mg/100g 건조중량으로 나타났다.
- [0041] 도 1은 그라비올라 잎 열수 추출물과 50% 주정 추출물의 총 페놀릭엑시드 (도 1에서 A) 및 총 플라보노이드 (도 1에서 B) 측정 결과이다.
- [0042] 전체적으로, 그라비올라 50% 주정 추출물의 총 페놀릭엑시드와 플라보노이드 함량이 열수 추출물보다 높게 나타났다.
- [0044] **[실험예 2: LC/MS를 이용한 그라비올라 잎 추출물의 생리활성 물질 확인]**
- [0045] 상기 실시예 1에서 수득한 그라비올라 잎 열수 추출물과 50% 주정 추출물의 생리활성 물질 확인을 위해 UPLC-PDA-ESI-MS/MSn(LCQ fleet, Thermo scientific, USA)를 사용하였다. Zorbax Eclipse XDB-C18 column (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m, Agilent technologies)을 장착하였으며, 이동상 A(1% formic acid in water, HPLC grade)와 B(acetonitrile, HPLC grade)가 사용되었다. 유속은 1 mL/min, 주입량 20 μ L, 농도 구배 5-95% 이동상 B, 60분으로 설정하였다. UV wavelength는 280, 340, 470 nm로 하여 분석하였다. 이온화는 ESI positive-ion mode를 사용하였고, mass range는 100-800 (m/z), capillary voltage는 30 V, capillary temperature은 200℃로 설정하여 검출하였다. 모든 샘플은 UPLC 분석기에 주입되기 전 0.2 μ m 필터로 여과한 후 분석하였다. 상기와 같은 분석 조건에서 흡광도 340 nm일 때, 그라비올라 잎 열수 추출물과 50% 주정 추출물에서 피크(peak) 1,2,3이 확인되었다. 피크 1은 retention time 17.97분에 m/z 610.95[M+H]⁺, 피크 2는 19.45분, 피크 3은 20.28분에 m/z 594.99 [M+H]⁺으로, 루틴(rutin)과 캠페롤-루티노사이드(Kaempferol-rutinoside)와 같은 물질로 확인되었다. 도 2는 그라비올라 잎 추출물의 플라보놀인 루틴과 캠페롤-루티노사이드의 LC/MS를 통한 정성분석과 정량분석 결과이다.
- [0046] 두 번째 확인물질은 비타민 U로, Hypersil Gold perfluorinated phenyl (PFP) column (150 $\times$ 2.1 mm, 3 μ m,

Thermo Scientific)을 장착하였다. 유속은 0.2 mL/min, 주입량은 2 μ L, 농도구배는 이동상 B를 0-3.3 min, 50-39%; 3.3-4 min, 39-45%; 4-5 min, 45-20%; 5-7 min, 20-50%; and 7-10 min, 50-50%로 설정하였다. 이온화 는 ESI positive-ion mode를 사용하였고 mass range는 50-300 (m/z), apillary voltage는 7000 V, capillary temperature은 200℃로 설정하여 검출하였다. 그라비올라 잎 열수 추출물과 50% 주정 추출물을 분석한 결과, 2.38분에 m/z 163.87 [M+H]⁺인 비타민 U 물질이 확인되었다. 도 3은 그라비올라 잎 추출물에서 비타민 U의 MS를 통한 정량분석 결과이다.

[0047] 그라비올라 잎 열수 추출물의 루틴, 캠페롤-루티노사이드, 비타민 U 함량은 각각 615.47, 700.46, 228.02 μ g/g 건조중량이었다. 반면, 그라비올라 잎 50% 주정 추출물의 루틴, 캠페롤-루티노사이드, 비타민 U 함량은 각각 1445.13, 1688.52, 140.37 μ g/g 건조중량으로 나타났다. 루틴, 캠페롤-루티노사이드 함량은 열수추출물보다 50% 주정추출물이 2.35, 5.41배 높았지만, 비타민 U 함량은 열수추출물이 1.62배 높았다.

[0049] [실험예 3: 그라비올라 잎 추출물을 활용한 과산화 및 질산기 자유라디칼 소거능 확인]

[0050] 상기 실시예 1에서 수득한 그라비올라 잎 추출물의 과산화 라디칼 소거능을 확인하기 위해 ORAC assay 방법을 활용하였다. 100 mL의 75 mM 포스페이트 버퍼(pH 7.0)에 fluorescein sodium salt(44 mg)를 혼합 후, 동일한 포스페이트 버퍼를 희석하여 75 nM의 fluorescent working solution을 만들었다. 50 μ L fluorescent solution과 50 μ L 그라비올라 잎 추출물을 혼합한 후 산화물질 AAPH(2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride)와 37℃에 15분 동안 반응시켰다. 이후, 마이크로플레이트 리더로 excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 5분 간격으로 형광도를 확인하여, 그라비올라 추출물의 형광도를 관찰하였다.

[0051] 또한, 질산기 라디칼 소거능을 확인하기 하기 위해 ABTS assay 방법을 활용하여 그라비올라 잎 열수 추출물과 50% 주정 추출물의 항산화 효과를 확인하였다. 7.4 mM ABTS 용액과 2.45 mM 과항산화염을 혼합하여 암소에서 12-16시간 상온에서 반응시킨 후 ABTS 용액의 734 nm의 흡광도가 0.70 $\pm$ 0.03 될 때까지 희석하였다. 50 μ L의 그라비올라 추출물과 950 μ L의 ABTS 용액을 혼합하고, 96웰 플레이트에 200 μ L씩 주입하였다. 마이크로플레이트 리더로 흡광도 734 nm 에서 항산화 정도를 확인하였다.

[0052] 실험결과 는 도 4와 같았다. 도 4는 그라비올라 잎 추출물의 자유라디칼 소거능 확인 실험결과이다. 도 4에서 A 는 과산화기 소거능, B는 질산기소거능 결과이다.

[0053] 도 4의 A에서 보는 바와 같이 그라비올라 잎 열수 추출물과 50% 주정 추출물의 과산화기 라디칼 소거능은 농도 별로 높아짐을 확인할 수 있었다. 그라비올라 잎 열수 추출물의 항산화 정도는 730.88~1,610.08 μ mol TE/g 이었으며, 그라비올라 잎 50% 주정 추출물은 1567.22~2581.44 μ mol TE/g로 나타나, 주정 추출물이 1~2.9배 더 높은 항산화 수치를 나타내었다. 딸기나 라즈베리와 같은 과일류의 수치가 205.0~728.8 μ mol TE/g 건조중량인 것과 비교하였을 때, 높은 항산화 수치를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0054] 한편, ABTS assay 방법을 활용한 질산기 라디칼 소거능을 측정한 결과, 도 4의 B에서 보는 바와 같이 그라비올라 잎 열수 추출물은 196.410 $\pm$ 0.083 mg VCEAC/100 g, 50% 주정 추출물은 228.343 $\pm$ 0.026 mg VCEAC/100 g의 값을 나타내었다. 그라비올라 잎 50% 주정 추출물이 열수 추출물보다 높은 질산기 라디칼 소거능을 확인할 수 있었다.

[0056] [실험예 4 : 그라비올라 잎 추출물에 함유된 생리활성물질의 산화적 손상물 생성 억제 효능 평가]

[0057] 비극성이고 전하를 띄지 않는 DCFH-DA는 세포막을 쉽게 통과하여 세포질로 들어가면 세포 내 효소인 에스테라아제(esterase)에 의해 형광을 내지 않는 2',7'-dichlorofluorscin (DCFH)이 되고, DCFH는 세포 내에서 발생하는 다양한 활성 산소에 의해 산화되어, 형광을 내는 2',7'-dichlorofluorscein (DCF)로 된다.

[0058] 측정된 형광의 수준은 세포 내 산화 정도와 비례하기 때문에 상기 원리를 이용하여 과산화수소로 인한 간세포의 산화적 손상에 미치는 영향을 평가하였다. 한국세포주은행에서 분주 받은 HepG2 세포를 계대 배양한 후, 96웰 플레이트에 5 $\times$ 10⁴을 분주하여 24시간 동안 5% CO₂, 37℃ 조건에서 배양한 후, 배지를 제거하였다.

[0059] 실시예 1에서 수득한 그라비올라 잎 열수 추출물과 50% 주정 추출물을 각각 여러 농도로(0.1-200 μ g/mL) 처리한 실험군을 2시간 동안 배양한 후, IC₅₀ 농도의 0.05mM 과산화수소를 처리하고, 각각 1, 4, 8시간 동안 배양하

였다. 그 뒤 0.5% EDTA를 분주하여 세포를 떼어내고 2', 7' -MDCFH-DA 시약을 처리하여 30분 뒤 488 nm (excitation), 525 nm (emission) 파장에서 형광을 마이크로플레이트 리더 (Thermo scientific) 기기로 측정하였다.

[0060] 측정결과는 도 5와 같이 나타났다. 도 5는 과산화수소 처리된 HepG2 세포의 그라비올라 잎 추출물에 의한 산화적 스트레스 저해 효과를 보여준다.

[0061] 과산화수소만 처리 대조군은 산화적 손상 정도가 124.33%이었고, 양성 대조군인 항산화물질 비타민 C를 처리한 후의 산화적 손상은 100.91%에 그쳤다. 간세포에 독성을 미치지 않는 그라비올라 잎 열수 추출물과 50% 주정 추출물을 농도별로 처리한 결과, 5-25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 101.16~109.20%의 산화적 손상 억제 정도를 확인하였다. 특히, 5 $\mu\text{g/mL}$ 그라비올라 스템 추출물이 양성대조군과 가장 유사한 결과를 보였다. 이상의 결과로부터, 그라비올라 잎 추출물 내의 산화 방지효소 역할이 효과적임을 확인할 수 있었다.

[0063] [실험예 5 : 그라비올라 잎 추출물에 의한 항산화 효소인자 및 전사인자의 mRNA 발현 변화 측정]

[0064] 한국세포주은행에서 분주받은 HepG2 세포를 계대배양한 후 6웰 플레이트에 8×10^5 개의 세포를 분주하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하고, 플레이트의 80%를 세포가 덮을 때까지 배양한 후 여러 농도로 (0~50 $\mu\text{g/mL}$) 그라비올라 잎 열수 추출물과 50% 주정추출물을 처리하였다.

[0065] 8시간 배양 후 세포에서 RNA 추출 키트 (intron Biotechnology, Korea)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 주형으로 하여 cDNA를 PCR로 합성한 후 SYBR 시약을 이용해서 'Step One Plus Real-Time PCR System (applied Biosystems Ins, Carlsbad, CA)'으로 mRNA 양을 정량하였다. 이때, 사용된 프라이머 시퀀스는 표 1과 같았다. 각 mRNA의 상대적 정량은 β -액틴의 상대적 양에 비교해 계산되었다.

표 1

[0066]

유전자		서열
heme oxygenase 1 (HMOX1)	정방향	5'-CTT CTT CAC CTT CCC CAA CA-3'
	역방향	5'-GCT CTG GTC CTT GGT GTC AT-3'
NRF2	정방향	5'-CGG TAT GCA ACA GGA CAT TG-3'
	역방향	5'-ACT GGT TGG GGT CTT CTG TG-3'
superoxide dismutase 1 (SOD1)	정방향	5'-GGT GGG CCA AAG GAT GAA GAG-3'
	역방향	5'-CCA CAA GCC AAA CGA CTT CC-3'
catalase	정방향	5'-TGG AGC TGG TAA CCC AGT AGG-3'
	역방향	5'-CCT TTG CCT TGG AGT ATT TGG TA-3'
β -actin	정방향	5'-GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA-3'
	역방향	5'-GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA-3'

[0068] 실험 결과는 도 6과 같이 나타났다. 도 6은 그라비올라 잎 추출물에 의한 항산화 효소인자 및 전사인자의 mRNA 발현 변화 결과를 보여준다.

[0069] 그라비올라 잎 열수 추출물을 HepG2에 처리하였을 경우, 측정된 유전자의 mRNA 발현이 변화하지 않았으나, 50% 주정 추출물을 처리하였을 경우, 25 및 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리시, SOD1와 NRF2 mRNA의 발현이 2배가량 증가하였다.

[0070] 이상과 같은 결과로부터, 상기 실험에서 관찰된 열수 추출물과 50% 주정 추출물에 의한 자유라디칼 소거능과 상기 실험에서 관찰된 산화적 스트레스 저해 현상은, 항산화 물질의 함량 차이와 항산화 효소인자와 전사인자 mRNA의 발현 변화에 의한 복합적인 결과로 판단되었다.

[0072] [실험예 6: 그라비올라 추출물 조성비에 따른 항산화 평가]

[0073] 상기 실험예 2에서 그라비올라 잎 열수 추출물의 루틴, 캠페롤-루티노사이드, 비타민 U 함량은 각각 615.47, 700.46, 228.02 $\mu\text{g/g}$ 건조중량이었다. 이를 비율로 계산하면 약 6:7:2라 할 수 있다. 본 실험예에서는 루틴, 캠페롤-루티노사이드, 비타민 U의 함량을 변화시켜 가면서, 항산화능이 어떻게 변화하는지를 확인하고자

하였다. 항산화능 측정은 상기 실험예 3에 기재한 방법을 사용하였다.

[0074] 실험결과에는 도 7과 같이 나타났다. 도 7은 ORAC assay를 통한 그라비올라 과산화 라디칼 소거능을 확인한 결과로서, 루틴의 조성비를 증가시킨 그라비올라 열수 추출물과 50% 주정 추출물의 항산화능 평가 결과이다.

[0075] 그라비올라 열수 추출물의 루틴 조성비를 증가시킨 결과, 그라비올라 추출물 (Rutin: Kaempferol-rutinoside : Vitamin U = 6 : 7 : 2, W : W : W)에 대비하여, 대부분의 항산화 수치가 증가하였다. 루틴의 비율이 7, 8, 9로 증가할 때, 대조군 대비 모두 약 513.5, 514.0, 515.8 TE로, 기존의 추출물보다 약 19% 정도가 유의적으로 상승하였다. 다만, 루틴의 비율이 10일 때는 477.5 TE로 11%, 11일 때 446.9 TE로 3%의 상승률을 보여 이전보다는 감소한 수치를 나타냈으며, 이는 대조군(6:7:2)과 유의적으로 차이가 없는 수치이다.

[0076] 그라비올라 50% 주정 추출물의 경우, 대조군 대비 루틴의 비율 7에서 2683.4 TE로 약 23% 정도가 유의적으로 증가하였다. 하지만, 루틴의 비율이 8 이상일 때는 대조군(6:7:2)과 유의적으로 차이가 없었다.

[0077] 한편, 비타민 U의 조성비를 변화시켜 가면서 측정한 항산화능 평가는 도 8과 같았다. 도 8은 ORAC assay를 통한 그라비올라 과산화 라디칼 소거능을 확인한 결과로서, 비타민 U의 조성비를 증가시킨 그라비올라 열수 추출물과 50% 주정 추출물의 항산화능 평가 결과이다.

[0078] 그라비올라 스템 추출물의 비타민 U의 조성비를 증가시킨 결과, 그라비올라 추출물 (Rutin : Kaempferol-rutinoside : Vitamin U = 6 : 7 : 2, W : W : W)에 대비하여 대부분의 항산화 수치가 증가하였다. 비타민 U의 비율이 3으로 증가할 때, TE값은 526.9로, 22% 정도가 유의적으로 상승하다. 이후 비타민 U의 비율이 4일 때 557.8 TE, 5일 때 605.7 TE, 6일 때 587.6 TE, 7일 때 626.4 TE로 각각 29%, 40%, 36%, 45%의 비율을 보였다. 루틴의 비율이 높아질수록 항산화능이 유의적으로 증가하는 경향을 확인할 수 있었다.

[0079] 그라비올라 50% 주정 추출물의 경우, 대조군 대비 비타민 U 비율이 3, 4일 때, 2250.1, 2257.8 TE로 모두 약 3% 상승하였다. 비타민 U의 비율이 5, 6일 때, 2282.1, 2287.5 TE로 약 4% 상승하였고, 비율이 7일 때, 2145.3 TE로 그라비올라 추출물보다 약 2%로 감소하는 경향을 보였다. 하지만, 이들의 증감은 모두 대조군(6:7:2) 대비 유의적으로 차이가 있는 수치는 아니었다.

[0080] 이상의 결과로부터, 루틴 또는 비타민 U의 함량을 변화시킬 경우, 그라비올라 열수 추출물이 50% 주정 추출물보다 유의적으로 항산화능을 향상시킬 수 있는 것으로 확인되었다.

[실시예 2: 본 발명의 항산화 효능 강화 그라비올라 조성물의 제조]

[0083] 그라비올라 추출물에는 1 g 당 600 μ g의 루틴, 700 μ g의 캠페롤-루티노사이드, 200 μ g의 비타민 U가 있는 것으로 본 발명을 통해 확인되었다. 본 실시예에서는 상기 실험예 4의 결과를 바탕으로, 그라비올라에 루틴 및 비타민 U를 추가하여 항산화력이 한층 강화된 그라비올라 조성물을 제조하고자 하였다. 다만, 화합물 형태로의 추가는 소비자들이 꺼려하므로, 본 실시예에서는 루틴 및 비타민 U가 많이 함유되어 있는 식물 소재를 탐색하고, 그들 내에 함유되어 있는 루틴 및 비타민 U 양을 전체 식물 양으로 환산하여, 식물로서 첨가하고자 하였다.

[0084] 어성초는 루틴을 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있는데, '0.876 μ g 루틴 / 1 g 어성초 건조 중량' 정도로 함유되어 있다. 하기 표 2는 이를 바탕으로 하여 계산한 어성초의 첨가량이다.

표 2

[0085]

비율	강화된 루틴 함량 (1g 기준)	어성초로 환산 (해당 양 만큼의 루틴을 함유하고 있는 어성초의 양)
6:7:2 (그라비올라 추출물)	-	-
7:7:2	+100 μ g	114.16 g
8:7:2	+200 μ g	228.32 g
9:7:2	+300 μ g	342.48 g
10:7:2	+400 μ g	456.64 g
11:7:2	+500 μ g	570.8 g

[0087] 계산 결과, 그라비올라 1g 당 약 114.16~570.8g의 어성초가 첨가되어야 하는 것으로 확인되었다. 그런데, 이와 같은 양은 그라비올라 대비 너무 많은 양 (약 100배)에 해당하여, 산업적으로는 크게 의미가 없는 것으로 확인되었다.

[0088] 한편, 브로콜리 및 배추는 비타민 U를 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있는데, '334.62 μ g 비타민 U / 1 g 브로콜리 건조중량', '535.99 μ g 비타민 U / 1 g 배추 건조중량'으로 확인되었다. 하기 표 3은 이를 바탕으로 하여 계산한 브로콜리 또는 배추의 첨가량이다.

표 3

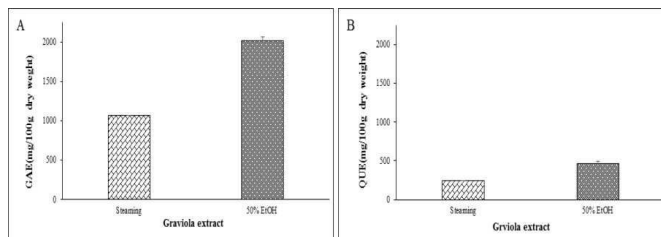
[0089]

비율	강화된 비타민 U 함량 (1g 기준)	브로콜리로 환산 (해당 양 만큼의 비타민 U 를 함유하고 있는 브로콜리 의 양)	배추로 환산 (해당 양만큼의 비타 민 U를 함유하고 있는 배추의 양)
6:7:2 (그라비올라 추출물)	-	-	-
6:7:3	+100 μ g	0.3 g	0.2 g
6:7:4	+200 μ g	0.6 g	0.4 g
6:7:5	+300 μ g	0.9 g	0.6 g
6:7:6	+400 μ g	1.2 g	0.8 g
6:7:7	+500 μ g	1.5 g	1.0 g

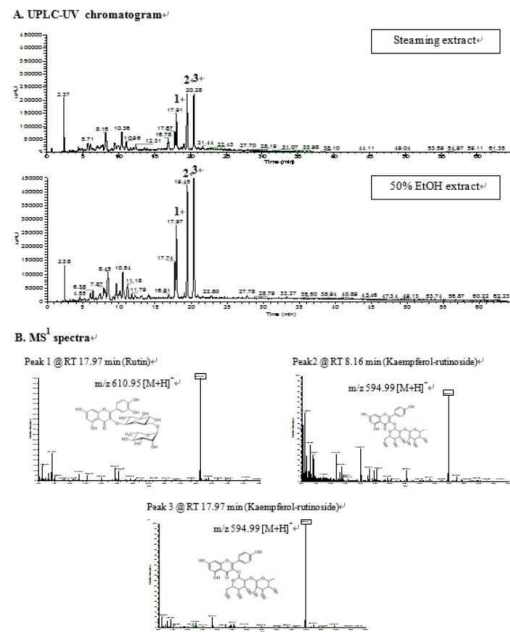
[0091] 계산 결과, 그라비올라 1 g 당 약 0.3~1.5 g의 브로콜리 또는 0.2~1.0 g의 배추가 첨가되어야 하는 것으로 확인되었다.

도면

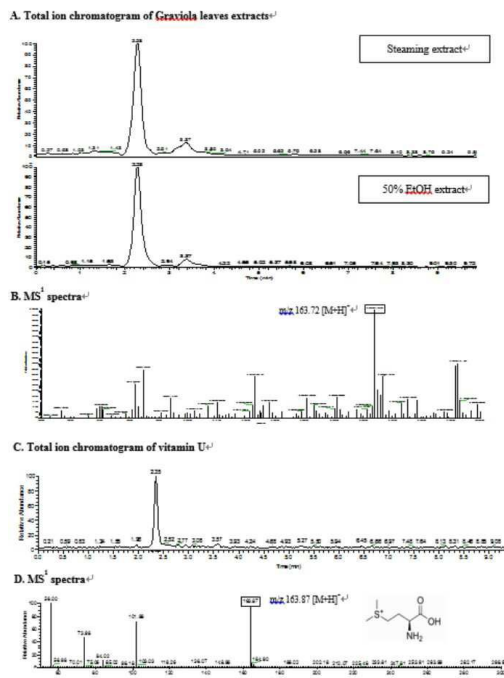
도면1



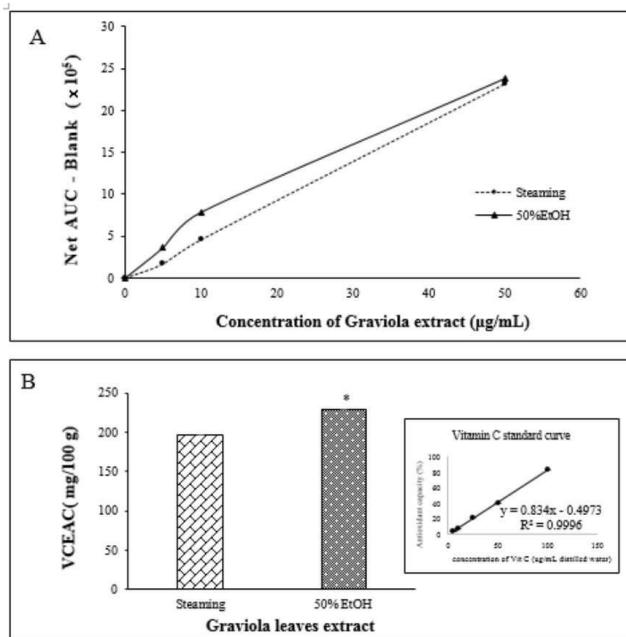
도면2



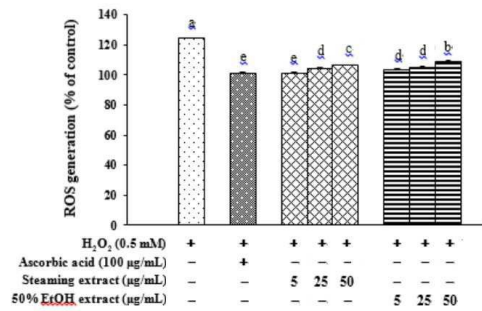
도면3



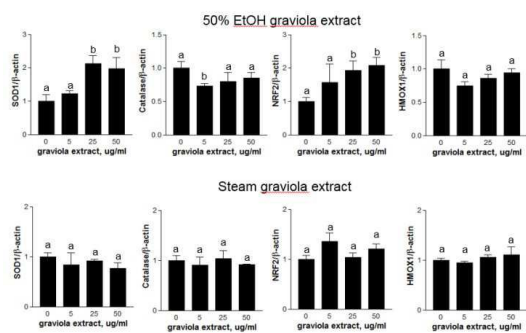
도면4



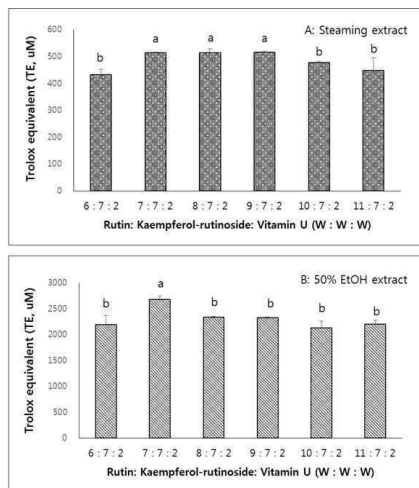
도면5



도면6



도면7



도면8

