

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0042677

(43) 공개일자 2020년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/105 (2016.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0123101

(22) 출원일자 2018년10월16일

심사청구일자 2018년10월16일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

신현재

전라남도 화순군 도곡면 원화길 32

최문희

전라남도 여수시 망마로 82-10, 28동 406호(신기동, 대림산업제2사택)

김다송

전라남도 여수시 새터로 6, 10동 102호(신기동, 롯데첨단소재(주))

(74) 대리인

특허법인 남앤남

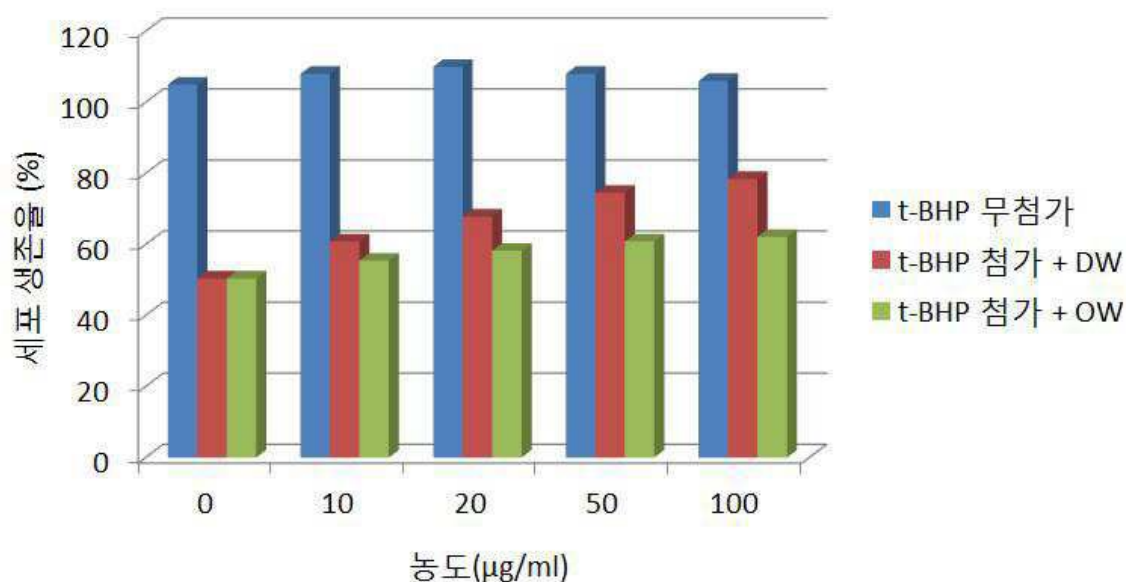
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 모링가 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 기능 개선용 에너지바

(57) 요약

본 발명은 모링가 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 기능 개선용 에너지바에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 항산화 활성, 알파-글루코시다아제 저해활성, 간세포 생존율 증진 활성 및 간세포 파괴 억제 활성을 갖는 모링가 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 기능 개선용 에너지바에 관한 것이다. 본 발명에 따른 모링가 잎 추출물은 항산화 활성, 알파-글루코시다아제 저해활성, 간세포 생존율 증진 활성 및 간세포 파괴 억제 활성을 갖는바, 이를 유효성분으로 포함하는 에너지바는 불규칙한 식사 및 다이어트 등으로 인해 약해져 있는 간 기능을 개선시키고 간을 보호할 수 있는 기능성 에너지바로서 유용하게 사용될 수 있다. 특히 모링가 잎 추출물에 강황 추출물을 병용 사용하는 경우 간보호 활성이 두드러지게 우수한 바, 이러한 소재를 이용한 에너지바는 간을 효과적으로 보호할 수 있는 장점을 가진다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/21 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1425112717

부처명 중소벤처기업부

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 첫걸음기술개발사업

연구과제명 모링가 잎과 잎 추출물을 함유한 미네랄강화 에너지바 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)한스아그리제토 [공동개발기관명 : 조선대학교]

연구기간 2017.09.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

모링가 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 기능 개선용 에너지바.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 에너지바는 강황 추출물을 더 포함하는 에너지바.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 모링가 잎 추출물은 국내산 모링가 잎의 열수추출물인 에너지바.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 모링가 잎 추출물은 국내산 모링가 잎에 식용효소를 첨가하여 추출한 추출물인 에너지바.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 모링가 잎 추출물은 항산화 활성, 알파-글루코시다아제 저해활성, 간세포 생존율 증진 활성 및 간세포 파괴 억제 활성을 갖는 에너지바.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 모링가 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 기능 개선용 에너지바에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 항산화 활성, 알파-글루코시다아제 저해활성, 간세포 생존율 증진 활성 및 간세포 파괴 억제 활성을 갖는 모링가 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 기능 개선용 에너지바에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간은 우리 몸에 들어오는 수백 가지 독성 물질을 해독하고 노폐물을 방출한다. 아무리 뛰어난 거름망이라도 처리 용량엔 한계가 있다. 중금속이나 바이러스뿐 아니라 병을 치료하기 위해 복용한 약도 간의 입장에선 독성 물질이 될 수 있다. 무리한 체중 감량도 간의 해독능력을 떨어뜨린다. 내장지방이 과다하게 분해되면 지방산이 급격히 축적되게 되는데, 섭취 제한으로 영양분이 충분히 공급되지 않은 상태에서 간은 이 지방산을 연료로 사용한다. 지방산은 간에 영양을 공급하는 간문맥을 타고 간으로 이동하고 결국 지방으로 전환 축적돼 비알코올성 지방간을 유발한다. 적당한 체중 감량은 지방간을 해결하는 데 도움을 주지만 운동 없이 심하게 먹는 걸 제한하는 것은 도움이 되지 않는다. 반대로 지나치게 많은 영양 공급 역시 지방간을 유발할 수 있다. 먹을 게 없던 시절엔 고지방/고단백 보양식이 여름을 나는 데 도움을 줬지만 요즘엔 사정이 다르다. 사용하지 못하고 남는 영양분이 간에 쌓여 비알코올성 지방간을 유발한다. 게다가 아시아인은 서양인에 비해 덜 비만해도 지방간이 쉽게 나타나는 경향이 있다(출처: http://news.jtbc.joins.com/article/ArticlePrint.aspx?news_id=NB11302205).

[0003] 일주일에 1kg 이상 급격하게 체중을 감량할 경우 신체는 영양 부족을 일으키거나, 전해질의 불균형을 부를 수 있다. 특히 원푸드 다이어트는 영양분 결핍을 초래해 신체에 악영향을 미칠 수 있으며, 식욕억제제를 과다 복용할 경우 간에 무리를 줄 수 있다. 또 단기에 무리하게 체중을 뺄 경우 내장 지방 조직이 과다하게 분해되면서 지방산이 급격히 축적된다. 축적된 지방산은 간에 영양을 공급해주는 간문맥을 통해 간으로 가게 되는데, 지방

산이 결국 간에서 지방으로 전환되어 축적되면서 '비알코올성지방간'을 부를 수 있다. 결과적으로 과다한 유리 지방산이 간으로 유입되기 때문에 치명적인 간 손상을 일으킬 수 있다. 따라서 체중을 감량할 때는 급하게 빼기 보다는 균형 잡힌 식단과 함께 규칙적인 운동을 통해 서서히 빼야 건강에 무리가 따르지 않는다.

[0004] 한편, 산업이 발달함에 따라 서구화된 입맛과 바쁜 일상에 쫓기는 현대인들의 식사를 대체할 수 있고 언제 어디서나 간편하게 이용 가능한 영양 간식이 요구되고 있는데, 이러한 식사대용식품으로서 에너지바(energy bar)가 주목받고 있다. 에너지바는 곡물바, 견과바, 씨리얼바(cereal bar), 영양바(nutrition bar), 그라놀라바(granola bar) 등과 동일·유사한 가공식품으로서, 곡물이나 견과류를 주재료로 하여 제조되고 탄수화물, 단백질, 지방과 기타 무기질을 간편하게 에너지와 영양소로 보충하여 필요한 칼로리를 공급함으로써 활동량이 많은 사람들이나 운동하는 사람들의 영양보충 간편식으로 많이 이용되고 있다.

[0005] 이에, 본 발명자는 영양보충 간편식으로 이용될 수 있는 에너지바에 간을 보호할 수 있는 소재를 첨가함으로써 불규칙한 식사 및 다이어트 등으로 인해 약해져 있는 간 기능을 개선시키고 간보호 활성을 갖는 기능성 에너지바를 개발하고자 하였으며, 그 결과 항산화 활성, 알파-글루코시다아제 저해활성, 간세포 생존율 증진 활성 및 간세포 파괴 억제 활성을 부여할 수 있는 모링가 잎 추출물을 에너지바에 첨가하였다. 특히, 모링가 잎 추출물과 함께 사용하여 간보호에 시너지 효과를 발생할 수 있는 소재를 찾고자 하였으며, 그 결과 모링가 잎 추출물에 강황 추출물을 병용 사용하는 경우 간보호 활성이 두드러지게 우수한 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1806462호
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1622784호
(특허문헌 0003) 한국공개특허 제10-2014-0096420호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 불규칙한 식사 및 다이어트 등으로 인해 약해져 있는 간 기능을 개선시키고 간을 보호할 수 있는 기능성 에너지바를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,
[0009] 본 발명은 모링가 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 기능 개선용 에너지바를 제공한다.
[0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 에너지바는 강황 추출물을 더 포함할 수 있다.
[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 모링가 잎 추출물은 국내산 모링가 잎의 열수추출물일 수 있다.
[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 모링가 잎 추출물은 국내산 모링가 잎에 식용효소를 첨가하여 추출한 추출물일 수 있다.
[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 모링가 잎 추출물은 항산화 활성, 알파-글루코시다아제 저해활성, 간세포 생존율 증진 활성 및 간세포 파괴 억제 활성을 가질 수 있다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 모링가 잎 추출물은 항산화 활성, 알파-글루코시다아제 저해활성, 간세포 생존율 증진 활성 및 간세포 파괴 억제 활성을 갖는바, 이를 유효성분으로 포함하는 에너지바는 불규칙한 식사 및 다이어트 등으로 인해 약해져 있는 간 기능을 개선시키고 간을 보호할 수 있는 기능성 에너지바로서 유용하게 사용될 수 있다. 특히 모링가 잎 추출물에 강황 추출물을 병용 사용하는 경우 간보호 활성이 두드러지게 우수한 바, 이러한 소재

를 이용한 에너지바는 간을 효과적으로 보호할 수 있는 장점을 가진다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 본 발명의 모링가 잎 추출물의 세포독성평가를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 모링가 잎 추출물의 알파-글루코시다아제 활성을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 모링가 잎 추출물을 3T3L1 세포에 처리한 후 세포 형태변화를 이미지화한 것이다.
- 도 4는 본 발명의 모링가 잎 추출물을 농도별도 처리에 따른 간세포 사멸 억제 효과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 모링가 잎 추출물의 간 세포로부터 GOT 유리 억제 효과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명의 모링가 잎 추출물의 간 세포로부터 GPT 유리 억제 효과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명의 모링가 잎 추출물과 감초 추출물(또는 강황 추출물/ 또는 대추 추출물)의 병용 처리에 따른 간세포 사멸 억제 효과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 본 발명의 모링가 잎 추출물과 감초 추출물(또는 강황 추출물/ 또는 대추 추출물)의 병용 처리에 따른 간 세포로부터 GOT 유리 억제 효과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 본 발명의 모링가 잎 추출물과 감초 추출물(또는 강황 추출물/ 또는 대추 추출물)의 병용 처리에 따른 간 세포로부터 GPT 유리 억제 효과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 본 발명의 모링가 잎 추출물을 첨가한 에너지바 제조과정을 간략하게 나타낸 모식도이다.
- 도 11은 효소를 첨가한 모링가 잎 추출 공정을 나타낸 모식도이다.
- 도 12는 효소를 첨가하여 제조한 모링가 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 13은 효소를 첨가하여 제조한 모링가 잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 14는 효소를 첨가하여 제조한 모링가 잎 추출물의 ABTS 라디칼 소거능을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 모링가 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 기능 개선용 에너지바를 제공함에 그 특징이 있다.
- [0017] 본 명세서에서 언급하는 ‘모링가(*Moringa oleifera*)’는 모링가과(moringaceae)에 속하며 높이가 5~10 m에 이르는 나무로 아시아, 아프리카, 아라비아 등에서 재배된다. 단백질과 비타민이 풍부해 영양가가 높고, 의학적으로 과혈당증과 항염증, 항암 등 다양한 약리작용을 가지고 있으며, 모링가의 꽃, 뿌리, 씨, 잎, 열매에는 다른 식물들에 비해 비타민, 플라보노이드, 아미노산 등과 같은 피토케미칼이 풍부한 것으로 알려져 있다. 모링가의 다양한 부위들 중 잎은 β -카로틴, 단백질, 비타민 C, 칼슘 등이 풍부해 항산화제로 이용되며, 피부 염증이나 피부 상처 치유에 효과가 있다는 보고가 있다. 또한 모링가 씨 추출물은 플라보노이드와 이소티오시아네이트류, 글루코시놀레이트, 티오카르바메이트(thiocarbamates)와 같은 생리활성물질을 포함하고 있으며, 암세포의 세포자살과 증식억제 효과 등이 보고되면서 모링가 잎의 우수성이 밝혀진바 있다.
- [0018] 본 발명자는 영양보충 간편식으로 이용될 수 있는 에너지바에 간을 보호할 수 있는 소재를 첨가함으로써 불규칙한 식사 및 다이어트 등으로 인해 약해져 있는 간 기능을 개선시키고 간보호 활성을 갖는 기능성 에너지바를 개발하고자 노력하였으며, 모링가 잎 추출물이 항산화 활성, 알파-글루코시다아제 저해활성, 간세포 생존율 증진 활성 및 간세포 파괴 억제 활성을 가짐을 확인함으로써, 이를 유효성분으로 포함하는 기능성 에너지바를 제공하고자 하였다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에서 상기 에너지바는 유효성분으로 모링가 잎 추출물 이외에 강황 추출물을 더 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서는 모링가 잎 추출물과 함께 사용하여 간보호에 시너지 효과를 발생할 수 있는 소재를 찾고자 하였으며, 그 결과 모링가 잎 추출물에 강황 추출물을 병용 사용하는 경우 간보호 활성이 두드러지게 우수한 것을 확인하였다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 모링가 잎 추출물 및 강황 추출물은 1 : 1의 중량비로 포함될 수 있으며, 상기

추출물은 1 µg/ml 내지 10000 µg/ml의 농도로 포함될 수 있다.

- [0022] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 모링가 잎 또는 강황으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 ‘추출물’은 적절한 용매를 이용하여 모링가 잎 또는 강황로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 상기 모링가 잎 또는 강황의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다.
- [0023] 상기 모링가 잎 또는 강황로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라든가 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수(물), 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 물 또는 에탄올을 사용하는 것이 좋다.
- [0024] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 모링가 잎 또는 강황 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [0025] 예를 들면, 본 발명의 에너지바에 포함되는 모링가 잎 추출물 또는 강황 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다.
- [0026] 따라서 본 발명에 있어서 모링가 잎 추출물 또는 강황 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [0027] 또한, 본 발명의 모링가 잎 추출물은 모링가 잎에 식용효소를 첨가하여 추출한 추출물일 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 에너지바에 포함되는 모링가 잎 추출물은 건조된 모링가 잎에 중량의 10~15배의 정제수를 첨가하고, 정제수의 1.0% 효소를 첨가하여 추출한 추출물일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 하기 실시예에서, 상기 모링가 잎 추출물을 효소를 첨가하여 추출한 경우 추출물의 폴리페놀 함량이 증대하고 항산화 활성이 증대하는 것을 확인하였다.
- [0029] 본 발명의 에너지바는 상기 추출물 이외에 다양한 곡류, 견과류, 씨앗류, 말린 과일류, 씨리얼, 당류 또는 결합제 등을 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 사용되는 견과류로서 피스타치오(pistachio), 헤이즐넛(hazelnut), 캐슈넛(cashew nut), 아몬드(almond), 마카다미아(macadamia nut), 땅콩, 호두, 잣, 밤 등이 사용될 수 있고, 씨앗류로서 해바라기씨, 호박씨, 바질씨앗(basil seed), 햄프씨드(hemp seed), 아마씨(linseed), 카카오닙스 등이 사용될 수 있으며, 이들 중에서 1종 또는 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있으나 식용 견과류나 씨앗류이면 그 종류에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명에서 사용되는 곡류는 수수, 현미, 쌀, 귀리, 팥, 통밀, 옥수수, 흑미, 검정콩 및 율무 등의 소재가 사용될 수 있으며, 조직감을 위하여 상기 곡류를 튀기거나 볶아서 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 당류 및 결합제는 포도당 시럽, 설탕 시럽, 조청, 식용지방 바인더, 전분, 젤라틴, 펙틴, 구아검 등이 사용될 수 있다.
- [0034] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0036] <실시예 1>

[0037] 모링가 잎 추출물 제조

[0039] <1-1> 모링가 잎 준비

[0040] 실험을 위하여 국내산 및 국외산 모링가(*Moringa oleifera*) 잎을 준비하였다. 국내산 모링가 잎은 “약초명가” 사이트에서 인터넷으로 구매하였으며, 원산지는 경남 영천이다. 국외산 모링가 잎은 캄보디아산으로 (췌한스아그 리젠토로부터 공급받았다.

[0042] <1-2> 모링가 잎 열수추출물 제조

[0043] 본 실험에서는 모링가 잎 추출물의 수율을 증가시키기 위하여 가압추출법을 사용하여 추출하였다. 자세하게는, 50g 모링가 잎을 1.2L 증류수에 침지 후 autoclave를 사용하여 121℃에서 90분 동안 가압 추출하였다. 추출물의 효능 (항산화능 및 플라보노이드 함량 등)을 실험하기 위하여 Whatman No. 4를 이용해 여과한 후, 감압농축기를 이용하여 농축 후 사용하였다.

[0044] 추출물의 수율은 다음과 같은 식으로 구하였다.

[0045]
$$Yield (\%) = \frac{Weight\ of\ concentrated\ sample\ after\ extraction\ (g)}{Weight\ of\ dried\ moringa\ leaves\ (g)} \times 100$$

[0046] 그 결과, 국내산, 국외산 모링가 잎의 추출수율은 각 각 28.26%, 25.40%로 국내산 모링가 잎의 추출수율이 더 높은 것으로 나타났다. 하기에서는 국내산 모링가 잎 열수추출물은 간략하게 ‘DW’ 로 명명하였으며, 국외산 모링가 잎 열수추출물은 간략하게 ‘OW’ 로 명명하였다.

[0048] <1-3> 모링가 잎 주정추출물 제조

[0049] 50g 모링가 잎을 1.2L 80% EtOH (ethanol)에 침지하여 상온에서 24시간동안 방치 후 Whatman No. 4를 이용해 여과한 후, 감압농축기를 이용하여 농축 후 hexane, chlorofoam, ethyl acetate (EtOAc)로 층분리하여 주정추출물 EtOAc fraction으로 실험을 진행하였다.

[0051] <실시예 2>

[0052] 모링가 잎 열수추출물의 미량원소 측정

[0053] 본 발명에서는 상기 <실시예 1>을 통해 제조한 모링가 잎 추출물에 포함되어 있는 미량 원소를 측정하기 위하여 ICP-OES (Parkin Elmer社의 OPTIMA 7300 DV 모델) 분석을 실시하였다.

[0054] 자세하게는 모링가 잎 추출물 0.5 g에 7 mL 65% HNO₃와 1 mL 30% H₂O₂를 각각 가한 후 microwave digestion system (ETHOSTC, Milestone, Sorisole, Italy)을 사용하여 산 분해를 하였다. 산 분해 반응액을 냉각시킨 후 1% HNO₃을 이용하여 50 mL로 정용한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 미네랄 분석을 실시하였다. 미네랄 분석은 ICP-OES (OPTIMA 7300DV, Perkin Elmer, USA)를 이용하였으며, Rf power 1400 W, gas flow rate 15 L/min, nebulizer gas flow 0.65 L/min, auxillary gas flow 0.2 L/min 조건에서 분석하였다.

[0055] 그 결과 하기 [표 1]에서 나타낸 바와 같이, 모링가 잎 추출물에 가장 많이 함유되어 있는 성분은 K이며, Ca, P, Mg, Na, Mn, Fe, Zn 순서로 함유량이 높게 나타났다. 한편, Cu와 Ni은 측정되지 않았다. 국내산 모링가 잎 추출물이 국외산보다 총 미네랄 함유량이 더 높은 것을 확인하였다.

표 1

[0057] 모링가 잎 열수추출물 ICP-OES 분석 결과 (단위 : ppm)

Element	DW	OW
P	14746.97	15624.00

Fe	21.75	16.45
Na	1209.52	4210.53
Ca	23420.88	20041.94
Mg	9732.73	6496.88
K	53343.48	42833.57
Mn	122.00	127.59
Cu	N.D	N.D
Zn	15.88	17.02
Ni	N.D	N.D

[0059] <실시예 3>

[0060] **모링가 잎 열수추출물의 아미노산 분석**

[0061] 본 발명에서는 상기 <실시예 1>을 통해 제조한 모링가 잎 추출물에 포함되어 있는 아미노산을 분석하였다.

[0062] 구성아미노산은 모링가 잎 추출물을 HCl을 가하여 110℃에서 24시간 동안 가수분해하여 추출하였고, 유리아미노산은 모링가 잎 추출물을 이용하였다. 유도체화 용액 (MeOH:H₂O:TEA:PITC=7:1:1:1)으로 상온에서 30 min 동안 유도체화하였다. 유도체화한 시료를 다시 건조한 후 200 μL의 140 mM NaHAc, 0.1% TEA, 6% CH₃CN에 녹이고 0.45 μm membrane filter로 여과하여 분석에 사용하였다. HPLC는 Hewlett Packard 1100 Series (Agilent Co., US A)를 이용하였고, column은 Nove-Pak (300×3.9 mm, 4.0 μm, C18, Waters Co., USA)을 사용하였다. Mobile phase로는 140 mM NaHAc, 0.15% TEA, 0.03% EDTA, 6% CH₃CN (solution A)와 60% CH₃CN, 0.015% EDTA (solution B)를 사용하였다. Gradient program을 이용하여 solution B를 0~4 min 0%, 4~12 min 8%, 12~13 min 12%, 13~15.2 min 20%, 15.2~22.5 min 46%, 22.5~22.72 min 100%, 22.72~23.2 min 100%, 23.2~25 min 100%, 25~25.7 min 0%, 25.7~30 min 0%로 설정하였다. Flow rate 1.0 mL/min, column temperature 46℃, injection volume 10 μL, UV detector 254 nm wavelength 에서 아미노산을 분석하였다.

[0063] 그 결과는 하기 표 2 및 표 3에서 자세히 나타내었다.

표 2

[0065] 구성 아미노산 분석결과 (단위 : μg/mg)

아미노산	DW	OW
Asparagine & Aspartic acid	14.59	4.21
Serine	6.38	2.86
Glutamin & Glutamic acid	24.14	4.99
Glycine	4.97	2.53
Histidine	2.18	3.07
Arginine	3.99	2.03
Threonine	5.82	2.91
Alanine	11.29	5.80
Proline	6.39	2.49
Tyrosine	0.69	1.58
Valine	5.97	4.10
Methionine	0.39	0.86
Cysteine	0	0
Isoleucine	4.31	0.51
Leucine	5.70	7.09
Phenylalanine	5.81	4.41
Tryptophan	0	1.02
Lysine	4.27	6.31
Total amino acid	106.88	56.76

표 3

유리 아미노산 분석결과 (단위 : $\mu\text{g}/\text{mg}$)

아미노산	DW	OW
Asparagine	5.73	1.15
Aspartic acid	2.96	1.44
Serine	2.93	0.96
Glutamin	0	0.86
Glutamic acid	2.02	1.54
Glycine	0.40	0.44
Histidine	0.95	0.27
Arginine	2.67	0.91
Threonine	2.27	0.66
Alanine	5.33	3.47
Proline	2.63	1.75
Tyrosine	0.75	0.36
Valine	3.48	1.99
Methionine	0	0
Cysteine	0	0
Isoleucine	2.31	0.93
Leucine	2.45	1.21
Phenylalanine	3.26	1.33
Tryptophan	1.61	0.70
Lysine	0.87	0.48
Total amino acid	42.60	20.45

[0069] 구성 아미노산 분석결과 국내산 모링가 잎 추출물에는 글루카민(glutamin)과 글루탐산(glutamic acid)이 가장 많이 함유되어 있었고, 국외산 모링가 잎 추출물에는 라이신(lysine)이 가장 많이 함유되어 있었다. 시스테인(Cysteine)은 국내산과 국외산 모링가 잎 추출물에 모두 존재하지 않았다. 총 아미노산 함유량은 국내산 모링가 잎 추출물이 국외산 보다 약 2배 정도 높았다.

[0070] 한편, 유리 아미노산 분석결과 국내산 모링가 잎 추출물에는 아스파라긴(asparagine)이 가장 많이 함유되어 있었고, 국외산 모링가 잎 추출물에는 발린(valine)이 가장 많이 함유되어 있었다. 메티오닌(Methionine)과 시스테인(cysteine)은 국내산과 국외산 모링가 잎 추출물에 모두 존재하지 않았다.

[0072] <실시예 4>

[0073] 모링가 잎 추출물의 세포독성 평가

[0074] 상기 실시예 1에서 제조한 본 발명의 모링가 잎 추출물의 세포 독성을 평가하기 위하여 MTT 에세이를 진행하였다.

[0075] MTT 에세이는 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 시약이 세포내로 흡수된 후 미토콘드리아의 숙식산탈수소효소(succinate dehydrogenase)에 의해 포르마잔(formazan)을 형성하는데 이물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하는 것으로써 세포의 성장율을 측정하는 대표적인 방법이다.

[0076] 3T3-L1 세포를 24 웰 플레이트에 배양한 후, 후보약물들을 농도별로 24시간 또는 48시간 동안 처치. 그리고 생존해 있는 세포를 MTT (0.2 mg/ml)시약에 1시간동안 반응 시킨 후, 상층을 제거하고 well 당 200 μl 의 dimethyl sulfoxide를 넣어 생성된 formazan crystals을 녹여내었다. 마지막으로 microplate reader (Spectra

Max, Molecular Device, Sunnyvale, CA)를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 아무것도 처리하지 않은 vehicle 처리군과 비교하였다. [생존율 (control 대비 %) = $100 \times (\text{약물을 처리한 샘플의 흡광도}) / (\text{control의 흡광도})$].

[0077] 그 결과 도 1에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 모링가 잎 열수추출물은 100 µg/mL 농도에서도 세포독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다. 반면에, 본 발명의 국외 모링가 잎 주정추출물의 경우는 세포독성을 갖는 것으로 측정되었다. 국외 모링가 잎 주정추출물의 경우 피토케미칼(phytochemical)이 다량 함유되어 있으면 세포독성을 갖는 것으로 사료되었다. 따라서, 국내열수 및 국내주정 추출물의 세포독성평가 결과 더 안전한 것을 확인할 수 있었다.

[0079] <실시예 5>

[0080] 모링가 잎 추출물의 항산화 활성

[0082] <5-1> 폴리페놀 함량 측정

[0083] 상기 <실시예 1>에서 제조한 본 발명의 모링가 잎 추출물의 폴리페놀 함량을 측정하였다.

[0084] 자세하게는, Total phenolic content (TPC)는 수정된 Folin-Denis법을 사용하여 측정하였다. 농축한 추출물을 methanol을 사용하여 5,000 ppm 농도로 희석하여 실험하였다. 추출물 5,000 ppm, 0.2 N Folin & Ciocalteu's phenol reagent와 2% Na₂CO₃을 모두 동일한 양을 혼합 후 실온에서 30분간 반응시킨다. UV-VIS spectrophotometer를 사용하여 750 nm 파장에서 반응시킨 용액의 흡광값을 측정하고, TPC는 표준물질인 gallic acid 기준 농도 GAE*mg/g로 나타내었다.

[0085] 그 결과 국내산 열수추출물의 TPC는 21.44 GAE*mg/g, 국내산 주정추출물의 TPC는 33.66 GAE*mg/g, 국외산 열수추출물의 TPC는 27.68 GAE*mg/g, 국외산 주정추출물의 TPC는 60.05 GAE*mg/g으로서 국외산 주정추출물의 폴리페놀 함량이 가장 높은 것으로 확인되었다.

[0087] <5-2> 플라보노이드 HPLC 분석

[0088] 상기 <실시예 1>에서 제조한 본 발명의 모링가 잎 추출물에 함유되어 있는 플라보노이드를 정량분석하기 위하여 HPLC(SPD-20A, SHIMADZU CO., Japan)를 사용하였다. Standard 물질로 gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, coumaric acid, quercetin를 이용하였다.

[0089] HPLC 분석조건은 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

HPLC 분석 조건

Parameter	Conditions
Column	Shim-pack C18 (4.6 x 250mm)
Flow rate	0.8 mL/min
Solvent A	1% acetic acid in water
Solvent B	Acetonitrile
Mobile phase	18-32% B 0-15min, 32-50% B 15-40min, 50-100% B 40-45min, 100% B 45-50min, 100-18% B 50-60min, 18% B 60-70min
Time	70 min
Temperature	40℃
Detection wavelength	280 nm
Injection volume	30 µL

[0092] 국내산 열수추출물에는 gallic acid, caffeic acid, rutin, p-coumaric acid가 함유되어 있었고, 국외산 열수추출물에는 gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, p-coumaric acid가 함유되어 있었다. 가장 많이 함유되어 있는 물질은 gallic acid 였다.

[0093] 국내산 주정추출물과 국외산 주정추출물에는 gallic acid, caffeic acid, rutin, p-coumaric acid, quercetin 가 함유되어 있었다. 가장 많이 함유되어 있는 물질은 rutin이었다.

표 5

[0095] 모링가 잎 추출물의 플라보노이드 함량 분석 (단위 : mg/g)

플라보노이드	국내열수	국외열수	국내주정	국외주정
Gallic acid	38.38	45.73	8.76	8.50
Chlorogenic acid	N. D.	18.53	N. D.	N. D.
Caffeic acid	29.61	22.43	14.76	20.12
Rutin	62.63	19.83	56.10	85.54
p-Coumaric acid	36.90	7.60	26.33	29.90
Quercetin	N. D.	N. D.	10.93	15.92

[0097] <5-3> DPPH 라디칼 소거능

[0098] 상기 <실시예 1>에서 제조한 본 발명의 모링가 잎 추출물의 항산화활성을 확인하기 위하여, DPPH 라디칼 소거능을 특정하였다.

[0099] 자세하게는, 각각의 시료의 농도를 100 - 10,000 µg/mL 의 농도가 되도록 조제하고, 농도별 샘플 200 µL에 0.2 mM의 α, α-diphenyl-β-picryl-hydrazyl(DPPH) 용액 800 µL를 넣고 15분 동안 방치 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0100] 추출물의 항산화능은 IC₅₀로 나타내었으며, IC₅₀는 DPPH 라디칼에 대한 소거능을 나타내며 라디칼을 50% 소거하는데 상응하는 농도로 나타내었다.

$$Activity(\%) = \frac{absorbance\ of\ control - absorbance\ of\ sample}{absorbance\ of\ control} \times 100$$

[0101]

[0102] 그 결과, 국내산 열수추출물의 IC₅₀는 1716.38 µg/mL이고, 국내산 주정추출물의 IC₅₀는 603.52 µg/mL이고, 국외산 열수추출물의 IC₅₀는 1164.38 µg/mL이고, 국외산 주정추출물의 IC₅₀는 515.23 µg/mL으로서 국외산 주정추출물의 항산화능이 가장 높은 것으로 확인되었다.

[0104] <5-4> ABTS 라디칼 소거능

[0105] 상기 <실시예 1>에서 제조한 본 발명의 모링가 잎 추출물의 항산화능을 ABTS 라디칼 소거활성 측정을 통해 평가하였다.

[0106] 자세하게는, 증류수에 용해한 7 mM의 ABTS potassium persulfate 2.45 mM을 1:1로 넣어 흡광도 값이 0.70±0.02이 되도록 PBS (pH 7.4)로 희석시켰다. 12-16시간 동안 암소에 방치하고 Radical stock solution은 희석된 용액 800 µl에 농도별로 제조된 샘플 200 µl씩을 가하여 15분 동안 방치 후 720 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 아스코르브산(ascorbic acid)을 사용하고, 농도범위는 100 - 1,000 µg/mL 로 측정하였다.

[0107] 모링가 잎 추출물의 항산화능은 IC₅₀로 나타내었으며, IC₅₀는 ABTS 라디칼에 대한 소거능을 나타내며 라디칼을 50% 소거하는데 상응하는 농도로 나타내었다.

$$Activity(\%) = \frac{absorbance\ of\ control - absorbance\ of\ sample}{absorbance\ of\ control} \times 100$$

[0108]

[0109]

그 결과 국내산 열수추출물의 IC₅₀는 726.55 μg/mL이고, 국내산 주정추출물의 IC₅₀는 69.07 μg/mL이고, 국외산 열수추출물의 IC₅₀는 821.30 μg/mL, 국외산 주정추출물의 IC₅₀는 71.78 μg/mL로서 국내산 주정추출물의 항산화 능이 가장 높은 것으로 확인되었다.

[0111]

<실시예 6>

[0112]

모링가 잎 추출물의 알파-글루코시다아제 저해활성 측정

[0113]

상기 <실시예 1>에서 제조한 본 발명의 모링가 잎 추출물 혈당강하 효과를 평가하기 위하여 알파-글루코시다아제의 저해활성을 측정하였다.

[0114]

참고로, 알파-글루코시다아제(alpha-glucosidase)는 전분 및 이당류의 알파-1,4 결합을 분해하여 포도당을 생성하여 생체의 소화과정에서 주요한 역할을 한다. 따라서 알파-글루코시다아제 억제제(alpha-glucosidase inhibitor)는 탄수화물의 소화과정을 억제하여 제2형 당뇨병자들에게 식후 혈당증가를 억제시킬 수 있는 소재로 보고되고 있다.

[0115]

알파-글루코시다아제 저해활성 평가를 위해, 본 발명의 모링가 잎 추출물을 5,000 ppm 농도로 희석하여 실험하였다. Sample 100 μl와 1 unit/mL α-glucosidase 25 μl를 혼합하여 37℃에서 10분간 방치하였다. 5mM p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside 100 μl를 첨가하여 37℃에서 10분간 반응 후 405 nm에서 흡광값을 측정하였다. 양성대조군으로는 5,000 ppm 아카보즈(acarbose, 경구용 혈당강하제)를 사용하였다.

[0116]

그 결과 도 2에서 나타낸 바와 같이, 양성대조군인 아카보즈(5,000 ppm)의 알파-글루코시다아제 저해 활성은 60.69%였다. 한편, 국내산 열수추출물(5,000 ppm)의 알파-글루코시다아제 저해 활성은 약 15.82%이고, 국내산 주정추출물은 약 67.70%, 국외산 열수추출물은 약 11.39%, 국외산 주정추출물은 75.20% 로 측정되었다. 국내산 및 국외산 주정추출물의 알파-글루코시다아제 저해 활성이 같은 농도의 아카보즈보다 더 좋은 것으로 측정되었고, 국외산 주정추출물의 저해 활성이 가장 높은 것으로 측정되었다.

[0118]

<실시예 7>

[0119]

모링가 잎 추출물의 미네랄 흡수 효과

[0120]

상기 <실시예 1>에서 제조한 본 발명의 모링가 잎 추출물 미네랄 흡수 효과를 측정하였다. 본 실험에서 사용한 세포주는 전구지방세포인 mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocyte이다. 3T3-L1 preadipocyte에 Insulin, dexamethasone(DEX), isobutylmethylxanthin (IBMX)을 처리하면 지방세포로 분화하게 되며, 분화된 지방세포는 계속적으로 증식하여 세포 내 지방구가 축적되어 성숙한 지방세포로 성장하는 동시에 세포의 형태, 유전자 발현 변화, 중성지방량 증가 등 복합적인 변화를 동반하게 된다. 따라서 본 실험에서는 Insulin, dexamethasone, isobutylmethylxanthin을 사용하여 지방세포로 분화시킨 후 국내 및 국외산 모링가 추출물을 농도별(25~100 ug/mL)로 처리하여 지방세포안에 포함되어 있는 지질 감소 효과를 측정하였다.

[0121]

자세하게는, 3T3-L1세포의 분화에 사용된 상층배지를 준비한 후, 8 μm pore 사이즈의 lower chamber가 있는 plate (24-transwell format; Corning, Lowell, MA)에 3T3L1세포를 24시간 배양하였다. 그리고 상층배지를 3T3-L1세포의 분화에 사용된 상층배지로 교환한 후, 6시간 incubation 시켰다. 그리고 상층을 제거하고, formalin으로 고정시킨 후, 0.1% crystal violet으로 염색시킨 후, chamber 위에 남아있던 3T3L1세포는 면봉으로 제거하고, chamber 아래로 이동된 보라색의 3T3L1세포를 이미지 software를 이용하여 이동된 3T3-L1 세포의 보라색을 정량하였다 (12개의 구역으로 나누어 측정).

[0122]

그 결과는 도 3에서 나타낸 바와 같이, Morphology상에서 보이는 노랗게 생성된 부분이 지방세포안에 축적된 지질인데, 본 발명의 모링가 잎 추출물을 각 농도별로 처리한 경우 지질 부분이 현저하게 감소하는 경향이 확인되었다.

[0124] <실시예 8>

[0125] 모링가 잎 열수추출물의 간보호 효과

[0127] <8-1> 간세포 배양

[0128] 본 실험에 사용된 세포는 인간 간 세포주인 HepG2 를 한국 세포주 은행에서 구입하여 사용하였다. 세포를 10% FBS(Lonza, Walkersville, MD USA)이 함유된 DMEM 배지에서 (WelGENE, Daegu, KOREA) 배양하였다. 배양기의 온도는 37° C이며, 5% 이산화탄소 농도를 유지시켰다. 이틀째, 배양 접시에 세포가 80% 정도 채워지면 새로운 배양접시로 옮겼다.

[0130] <8-2> 간세포 생존율 측정

[0131] 본 발명의 실시예 1에서 제조한 모링가 잎 열수추출물의 간세포 보호 효과를 평가하기 위하여, t-BHP(t-butylhydroperoxide)로 산화적 스트레스를 유도한 간세포에서 모링가 잎 열수추출물이 처리에 따른 간세포 생존율에 미치는 영향을 살펴보았다.

[0132] 자세하게는, HepG2 세포를 96-웰 플레이트에 5×10^5 개 정도 분주하여 12시간 배양 후, 혈청이 없는 DMEM 배지에 각각의 농도가 되도록 본 발명의 모링가 잎 추출물을 처리하고 배양하였다. 30분 후, t-BHP(t-butylhydroperoxide)를 넣어주거나 또는 넣어주지 않는 조건에서 3시간 동안 배양하였다. 처리가 끝나면, 식염수로 세포를 1회 세척하고, 0.5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 100 ml 가하고 빛을 차단시켜 37° C 배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후에는 세포를 식염수로 1회 세척하고, 100 ml의 DMSO를 넣어 반응액을 추출한 다음, 마이크로 플레이트 리더(GENios A5082, TECAN, Maennedorf, Switzerland)를 이용해 530 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0133] 그 결과 도 4에서 나타난 바와 같이, 혈청이 없는 DMEM배지에 각각 0, 10, 20, 50 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 본 발명의 모링가 잎 열수추출물을 넣어 30분 간 전처리 후, 1.25 mM t-BHP를 가하여 3시간 동안 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 1.25 mM 농도의 t-BHP를 처리하면, 처리하지 않았을 때와 비교해 약 50%의 세포손상이 관찰된다. 그러나 본 발명의 모링가 잎 열수추출물을 농도별로 첨가해주면, 추출물의 농도가 높을수록 세포 손상이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 특히, t-BHP를 처리하여 50% 감소된 세포 생존율은 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)을 100 $\mu\text{g/mL}$ 첨가했을 때 약 70.2%까지 회복되는 것을 관찰하였으며, 국외산 모링가 잎 열수추출물(OW)을 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 첨가하였을 때 약 62.1%까지 회복되는 것을 관찰하였다. 이러한 결과를 통해 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)이 국외산 모링가 잎 열수추출물(OW)과 대비 간보호 활성이 우수한 것을 확인할 수 있었다. 한편, 전체적으로, 본 발명의 모링가 잎 열수추출물은 농도에 비례하여 t-BHP에 의해 손상된 간세포의 생존율을 증가시킴을 확인하였다.

[0135] <8-3> 간세포로부터 GOT 및 GPT 유리에 미치는 영향

[0136] 본 발명의 실시예 1에서 제조한 모링가 잎 열수추출물의 간세포 보호 효과를 평가하기 위하여, 간세포로부터 GOT 및 GPT 유리에 미치는 영향을 살펴보았다.

[0137] 세포막 파괴를 측정하기 위하여 배지에서 GOT, GPT를 측정하였다. 간세포를 96-웰 플레이트에 5×10^5 개 정도 분주하여 12시간 배양 후, 혈청이 없는 배지에 각각의 농도가 되도록 본 발명의 모링가 잎 열수추출물을 처리하고 배양하였다. 30분 후, 1.25 mM t-BHP를 넣어주고 3시간 동안 배양하였다. 다시 50 ml의 배양액에 지오티용 기질액 (알파-케토글루타레이트산과 L-아스파르트산)과 지피티용 기질액 (알파-케토글루타레이트산과 L-알라닌)을 각각 30 ml씩 넣고 37°C에서 일정시간 반응시켰다. 반응 생성물에 2,4-디니트로페닐히드라진 정색시약(Sigma-aldrich)을 30 ml씩 넣고 실온에서 방치하였다. 20분 후, 100 ml의 수산화나트륨 용액을 넣고 다시 실온에서 10분 간 방치하여 발색시킨다. 60분 이내에 마이크로 플레이트 리더(iGNOS, TECAN)를 이용해 505 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. GOT, GPT 활성은 표준 검량선을 이용하여 Karmen/mL 단위로 표시하였다.

[0138] 참고로, 지오티(GOT)는 간세포에 있는 효소로서, t-BHP에 의해 간 세포가 손상을 입으면 배양액으로 나오게 된다. 그러므로, 배양액 중의 지오티 활성치 증가는 곧 세포의 간세포의 손상을 의미한다. 배양액에 키트 내의 지

오티용 기질액 (알파-케토글루타레이트산과 L-아스파르트산)을 넣고 반응시키면, 지오티에 의해 기질이 옥살로아세트산 및 피루빈산을 생성하게 된다. 생성된 옥살로아세트산 및 피루빈산에 의해 키트 내 정색시약(영동시약) 중의 2,4-디니트로페닐히드라진이 히드라진으로 변화되고, 여기에 수산화나트륨 용액을 넣어 반응액을 등갈색으로 발색시켜 색도를 기기(iGNOS, TECAN)를 이용하여 측정하였다.

[0139] 1.25 mM t-BHP을 간 세포에 처리하여 세포 외로 방출된 GOT 효소의 활성을 관찰한 결과는 도 5에서 자세히 나타내었다.

[0140] 도 5에서 나타낸 바와 같이 t-BHP를 처리하지 않은 세포군 (3 Karmen/mL)에 비해 약 10배 정도 (33 Karmen/mL)의 지오티 활성이 배양액에서 증가하였으며, 여기에 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)을 10, 20, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하는 경우 농도에 따라 지오티 활성이 각각 25.2, 22.5, 16.5 그리고 13.8 Karmen/mL로 감소하는 것으로 나타났으며, 국외산 모링가 잎 열수추출물(OW)을 농도별로 처리하는 경우 지오티 활성이 각각 28.5, 22.8, 17.6 그리고 15.2 Karmen/mL로 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해, 간 세포에서 t-BHP에 의한 지오티의 세포 외 방출이 본 발명의 모링가 잎 열수추출물에 의해 억제됨을 확인하였으며, 특히 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)이 국외산(OW) 대비 우수한 활성을 가짐을 확인하였다.

[0141] 한편, 지피티(GPT)는 간세포에 있는 효소로서, 지오티와 마찬가지로 삼차-부틸 히드로과산화물에 의해 간 세포가 손상을 입으면 배양액으로 나오게 된다. 그러므로, 배양액 중의 지피티 활성치 증가는 곧 세포의 간세포의 손상을 의미한다. 배양액에 키트 내의 지피티용 기질액 (알파-케토글루타레이트산과 L-알라닌)을 넣고 반응시키면, 지피티에 의해 기질이 옥살로아세트산 및 피루빈산을 생성하게 된다. 지오티 측정과 같은 원리에 따라 색도를 측정하여 간세포 손상의 정도를 확인할 수 있다.

[0142] 1.25 mM t-BHP을 간 세포에 처리하여 세포 외로 방출된 GPD 효소의 활성을 관찰한 결과는 도 6에서 자세히 나타내었다.

[0143] 도 6에서 나타낸 바와 같이 t-BHP를 처리하지 않은 세포군 (3 Karmen/mL)에 비해 약 8배 정도 (24 Karmen/mL)의 지피티 활성이 배양액에서 증가하였으며, 여기에 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)을 10, 20, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하는 경우 농도에 따라 각각 22.5, 20.0, 16.2 그리고 14.8 Karmen/mL로 감소하는 것으로 나타났으며, 국외산 모링가 잎 열수추출물(OW)을 농도별로 처리하는 경우 지피티 활성이 각각 22.8, 21.4, 18.5, 15.5 Karmen/mL로 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해, 모링가 잎 열수추출물이 t-BHP에 의한 HepG2의 세포 손상을 감소시킬 수 있음을 확인하였으며, 특히 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)이 국외산(OW) 대비 우수한 활성을 가짐을 확인하였다.

[0145] <실시예 9>

[0146] 간보호 활성의 시너지 효과

[0147] 상기 실시예 8에서는 모링가 잎 추출물이 간보호 활성을 가짐을 확인하였는바, 본 실험에서는 모링가 잎 열수추출물과 함께 사용되어 간보호 활성의 시너지 효과를 나타낼 수 있는 소재를 찾고자 하였다. 본 실험에서는 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)과 함께 사용되는 추출물로 종래 간보호 활성이 알려진 감초 추출물, 강황 추출물 및 대추 추출물을 그 대상으로 하여 실험을 진행하였다.

[0149] <9-1> 감초 추출물, 강황 추출물 및 대추 추출물 준비

[0150] 건조된 감초, 강황 및 대추 각각 50g에 70%에탄올 500ml를 가한 후, 180분 동안 80 내지 85℃에서 가열추출하였다. 이 에탄올 추출물을 여과시킨 후, Rotary vacuum evaporator(RE-111, Buchi Co., Zurich, Switzerland)를 사용하여 40 내지 45℃에서 60 내지 95분 동안 감압농축 하였고, 최종적으로 농축된 추출물을 동결건조기(Ilshin Lab Co., Seoul, Korea)를 사용하여 -50℃에서 48시간 동결건조하여 건조된 감초, 강황 및 대추추출물을 제조하였다.

[0152] <9-2> 간세포 생존율 측정

[0153] 본 발명의 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)의 간보호 활성의 시너지 효과를 평가하기 위하여 상기 실시예 <9-

1>에서 준비한 감초 추출물, 강황 추출물 및 대추 추출물 각각의 병용 첨가에 따른 간세포 보호 활성을 살펴보았다. 간세포 보호 활성은 상기 실시예 <8-2>와 동일한 방식으로 측정하였다. 다만, 세포에 처리되는 모링가 잎 열수추출물과 감초 추출물(또는 강황 추출물/또는 대추 추출물)은 1:1의 조성비로 혼합하여 처리하였다.

[0154] 그 결과 도 7에서 나타낸 바와 같이, 혈청이 없는 DMEM배지에 각각 0, 10, 20, 50 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 모링가 잎 추출물 및 감초 추출물(또는 강황 추출물/또는 대추 추출물)을 넣어 30분 간 전처리 후, 1.25 mM t-BHP를 가하여 3시간 동안 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 1.25 mM 농도의 t-BHP를 처리하면, 처리하지 않았을 때와 비교해 약 50%의 세포손상이 관찰된다. 그러나 모링가 잎 추출물과 감초 추출물(또는 강황 추출물/또는 대추 추출물)을 농도별로 첨가해 주면, 추출물의 농도가 높을수록 세포 손상이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

[0155] 특히, 본 발명의 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)과 강황 추출물을 함께 처리한 실험구에서 다른 처리구 대비 월등하게 우수한 세포생존율을 보여주었으며, 이러한 결과는 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW) 단독 처리군과 비교해서도 더욱 우수한 간세포의 생존율을 확인하였다. 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW) 단독 처리군의 간세포 생존율이 70.2%로 나타난 반면; 모링가 잎 열수추출물(DW)과 강황 추출물을 함께 처리한 실험구는 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 78.8% 세포 생존율 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 85.9%의 세포 생존율을 보여주었다.

[0157] <9-3> 간세포로부터 GOT 및 GPT 유리에 미치는 영향

[0158] 본 발명의 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)의 간보호 활성의 시너지 효과를 평가하기 위하여 상기 실시예 <9-1>에서 준비한 감초 추출물, 강황 추출물 및 대추 추출물 각각의 병용 첨가에 따른 간세포로부터 GOT 및 GPT 유리에 미치는 영향을 살펴보았다. 간세포로부터 유리되는 GOT 및 GPT 수치 측정은 상기 실시예 <8-3>과 동일한 방식으로 측정하였다. 다만, 세포에 처리되는 모링가 잎 열수추출물과 감초 추출물(또는 강황 추출물/또는 대추 추출물)은 1:1의 조성비로 혼합하여 처리하였다.

[0159] 세포 외로 방출된 GOT 효소의 활성을 관찰한 결과는 도 8에서 자세히 나타내었다.

[0160] 도 8에서 나타낸 바와 같이 t-BHP를 처리하지 않은 세포군 (3 Karmen/mL)에 비해 약 10배 정도 (33 Karmen/mL)의 지오티 활성이 배양액에서 증가하였으며, 여기에 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)과 감초 추출물(또는 강황 추출물/또는 대추 추출물) 병용 처리하는 경우 처리하는 농도에 의존적으로 지오티 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 자세하게는, 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)과 감초 추출물을 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 병용 처리한 경우 지오티 활성이 각각 28.5, 20.4, 18.2 그리고 12.8 Karmen/mL로 감소하는 것으로 나타났으며; 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)과 강황 추출물을 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 병용 처리한 경우 지오티 활성이 22.2, 15.5, 9 그리고 5.5 Karmen/mL로 감소하는 것으로 나타났으며; 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)과 대추 추출물을 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 병용 처리한 경우 지오티 활성이 29.8, 20.8, 18.5 그리고 15.4 Karmen/mL로 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해, 간 세포에서 t-BHP에 의한 지오티의 세포 외 방출이 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)과 강황 추출물의 병용 처리에 따라 효과적으로 억제됨을 확인하였다.

[0161] 한편, 1.25 mM t-BHP를 간 세포에 처리하여 세포 외로 방출된 GPT 효소의 활성을 관찰한 결과는 도 9에서 자세히 나타내었다.

[0162] 도 9에서 나타낸 바와 같이 t-BHP를 처리하지 않은 세포군 (3 Karmen/mL)에 비해 약 8배 정도 (24 Karmen/mL)의 지피티 활성이 배양액에서 증가하였으며, 여기에 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)과 감초 추출물(또는 강황 추출물/또는 대추 추출물) 병용 처리하는 경우 처리하는 농도에 의존적으로 지오티 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 자세하게는, 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)과 감초 추출물을 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 병용 처리한 경우 지피티 활성이 각각 22.5, 21.8, 18.8 그리고 15.4 Karmen/mL로 감소하는 것으로 나타났으며; 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)과 강황 추출물을 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 병용 처리한 경우 지피티 활성이 20.5, 15.6, 11.5 그리고 7.2 Karmen/mL로 감소하는 것으로 나타났으며; 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)과 대추 추출물을 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 병용 처리한 경우 지오티 활성이 23.1, 21.5, 17.5 그리고 14.8 Karmen/mL로 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해, 간 세포에서 t-BHP에 의한 지피티의 세포 외 방출이 국내산 모링가 잎 열수추출물(DW)과 강황 추출물의 병용 처리에 따라 효과적으로 억제됨을 확인하였다.

[0164] <실시예 10>

[0165] **모링가 잎 열수추출물을 함유한 에너지바 제조**

[0166] 상기 <실시예 1>에서 제조한 본 발명의 모링가 잎 열수추출물을 함유한 에너지바를 하기 표 6의 조성비로 제조하였다.

[0167] 본 발명의 에너지바 제조에 사용된 아몬드, 크린베리, 호두, 호박씨, 해바라기씨, 수수, 현미, 쌀, 헴프시드, 카카오닙스, 캐슈넛, 씨리얼, 모링가 잎 분말은 광주광역시 동구의 할인마트에서 구입하여 사용하였다. 수수, 현미, 쌀은 조직감을 위하여 포도씨유를 이용하여 튀겨서 사용하였다.

[0168] 한편, 실험에서 사용한 ‘모링가 잎 추출물을 함유한 조청’은 시중에서 구입한 조청에 상기 <실시예 1>에서 제조한 본 발명의 모링가 잎 추출물을 조청 100중량부 대비 17.5중량부로 첨가한 후 1시간동안 80℃온도로 가열하여 제조하였다.

[0169] 하기 표 6에서 개시된 구성성분들을 조성비에 맞게 혼합하고, 혼합물을 102℃의 온도에서 가열한 후 넓은 성형 특에 넣고 성형하여 본 발명의 에너지바를 제조하였다.

표 6

[0171] 모링가 잎 열수추출물을 함유한 에너지바 구성성분 및 조성비

구성성분	에너지바 1	에너지바 2
아몬드	110 중량부	110 중량부
크린베리	29 중량부	29 중량부
호두	110 중량부	110 중량부
호박씨	12 중량부	12 중량부
해바라기씨	12 중량부	12 중량부
수수	12 중량부	12 중량부
현미	12 중량부	12 중량부
쌀	12 중량부	12 중량부
헴프시드	12 중량부	12 중량부
카카오닙스	12 중량부	12 중량부
캐슈넛	55 중량부	55 중량부
씨리얼	110 중량부	110 중량부
모링가 잎 분말	2 중량부	2 중량부
모링가 잎 열수추출물 함유(17.5중량%) 조청	100 중량부	-
모링가 잎 열수추출물 및 강황 추출물 함유(17.5중량%) 조청	-	100 중량부

표 7

[0173] 모링가 잎 열수추출물을 함유한 에너지바의 영양성분분석표(100g 기준)

항목	결과	항목	결과
열량	518.68 kcal	콜레스테롤	불검출
나트륨	25.93 mg	단백질	17.94 g
탄수화물	39.54 g	식이섬유	10.60 g
당류	7.22 g	비타민 A	39.20 µg RE
지방	34.44 g	비타민 C	0.96 mg
트랜스지방	0.05 g	철	5.33 mg
포화지방	5.13 g	칼슘	140.73 mg

[0175] <실시예 11>

[0176] 모링가 잎 열수추출물을 함유한 에너지바의 관능평가

[0177] 상기 <실시예 10>에서 제조한 본 발명의 모링가 잎 열수추출물을 함유한 “에너지바 1”의 관능평가를 진행하였다. 20대 여성 28명 (평균나이 22.71세)과 50대 여성 28명 (평균나이 54.36세)을 대상으로 관능평가를 진행하였다.

[0178] 상기 실시예 10에서 “에너지바 1”을 제품 A, 시중에서 판매되고 있는 “닥터유 에너지바 초콜릿”을 제품 C로 명명하여 관능평가를 진행하였다.

[0179] 관능평가결과 조직감과 쓴맛을 제외한 항목에서 통계적으로 유의적인 차이를 보였다. 색의 기호도는 50대의 평가결과 중 모링가 에너지바가 가장 높게 평가되었지만, 20대의 평가결과는 모링가 에너지바가 닥터유 에너지바보다 낮게 평가되었다. 조직감은 실험군 사이의 유의적인 차이가 없기 때문에, 연령대 및 제품별로 차이가 없다고 판단되어 진다. 향의 기호도는 50대의 평가결과 중 모링가 에너지바가 가장 높게 평가되었지만, 20대의 평가결과는 모링가 에너지바가 닥터유 에너지바보다 낮게 평가되었다. 맛의 기호도는 50대, 20대의 모링가 에너지바의 평가결과가 순서대로 높게 평가되었다. 단맛은 20대, 50대의 닥터유 에너지바가 높게 평가되었으며, 모링가 에너지바는 낮게 평가되었다. 쓴맛은 실험군 사이의 유의적인 차이가 없기 때문에, 연령대 및 제품별로 차이가 없다고 판단되어 진다. 모링가 잎이 특유의 쓴맛을 가지고 있어, 에너지바에 함유되었을 때 쓴맛을 우려했었는데, 관능평가 결과 닥터유 에너지바와 차이가 없는 것으로 확인되었다. 전반적인 기호도는 20대, 50대에서 모링가 에너지바가 닥터유 에너지바보다 좋은 것으로 평가되었다.

표 8

[0181] 관능평가 결과

	Age 20' s		Age 50' s	
	Moringa energy bar	Commercial energy bar	Moringa energy bar	Commercial energy bar
Color	5.71±1.58 ^a	6.32±1.09 ^a	7.28±1.63 ^b	5.89±1.57 ^a
Texture	6.18±1.66	5.89±1.47	6.54±2.27	6.11±1.50
Flavor	5.75±1.37 ^{ab}	6.43±1.64 ^{bc}	6.71±1.61 ^c	5.46±1.04 ^a
Taste	7.07±1.27 ^{ab}	6.96±1.32 ^a	7.71±1.38 ^b	5.39±1.40 ^c
Sweet taste	6.00±1.18 ^a	7.86±0.85 ^b	5.96±1.48 ^a	7.04±1.88 ^c
Bitter taste	2.75±1.46	2.00±1.33	2.39±1.99	2.61±1.71
Overall Acceptability	6.43±1.37 ^a	6.21±1.20 ^{ab}	7.75±1.24 ^c	5.57±1.35 ^b

[0183] <실시예 12>

[0184] 식용효소를 이용한 모링가 잎 추출물 제조 및 항산화 활성 측정

[0186] <12-1> 식용효소를 이용한 모링가 잎 추출물 제조

[0187] 본 실험에서는 모링가 잎 추출공정에 있어서 효소를 첨가에 따른 항산화 활성 증가를 살펴보기 위하여, 모링가 잎 추출과정에서 식용효소인 셀룰라아제와 펙티나제를 사용하여 기존의 추출물에 비해 항산화능이 강화된 추출물을 제조하였으며, 이 추출물을 에너지바에 첨가하여 모링가 추출물을 함유하는 에너지바를 제조하였다.

[0188] 셀룰라아제는 비스코자임(Viscozyme[®] L, 100 FBG/g)을 사용하였고, 펙티나제는 펙티넥스(Pectinex[®] 100L, 5,000 FDU/mL)을 사용하였다. 건조된 모링가 잎(국내산, 국외산)에 중량의 10~15배의 정제수를 첨가하고, 정제수의 1.0% 효소를 첨가하였다. 효소는 펙티나제, 셀룰라아제 단독 및 이들의 혼합 효소를 4시간 동안 50℃에서

추출하였으며, Whatman No. 4를 이용해 여과한 후, 감압농축기를 이용하여 농축 후 사용하였다. 이렇게 제조된 모링가 잎 추출물의 폴리페놀 함량과 항산화 활성을 측정하였다.

[0190] <12-2> 폴리페놀 함량 측정

[0191] 상기 실시예<12-1>을 통해 식용효소를 이용하여 제조한 모링가 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 폴리페놀 함량은 상기 실시예 <5-1>과 동일한 방법으로 측정하였다.

[0192] 그 결과 도 12에서 나타낸 바와 같이, 국내산 모링가 잎보다 국외산 모링가 잎의 폴리페놀 함유량이 높았다. 펙티나제를 사용했을 때에는 효소를 첨가하지 않은 대조군과 거의 차이가 없는 반면, 셀룰라아제를 사용하였을 때 폴리페놀 함유량이 증가하였으며, 펙티나제와 셀룰라아제를 혼합하여 추출하였을 때 폴리페놀 함유량이 가장 높은 것으로 나타났다.

[0194] <12-3> DPPH 라디칼 소거능

[0195] 상기 실시예<12-1>을 통해 식용효소를 이용하여 제조한 모링가 잎 추출물의 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 상기 실시예 <5-4>와 동일한 방법으로 측정하였다.

[0196] 그 결과 도 13에서 나타낸 바와 같이, 국내산 모링가 잎보다 국외산 모링가 잎의 DPPH 라디칼 소거능이 높은 것을 확인할 수 있었다. 펙티나제를 사용했을 때에는 효소를 첨가하지 않은 대조군과 거의 차이가 없었으며, 셀룰라아제를 사용하였을 때 항산화활성이 증가하는 것으로 나타났다. 한편, 펙티나제와 셀룰라아제를 혼합하여 추출하였을 때 항산화활성 증가율이 가장 높았다. 50℃에서 4시간동안 1% 펙티나제와 셀룰라아제를 첨가하여 국외산 모링가 잎을 추출할 때 항산화 활성이 67.82%로서, 항산화 활성이 가장 높은 조건이었다. 이는 총 폴리페놀 함량의 실험결과와 일치하였다.

[0198] <12-4> ABTS 라디칼 소거능

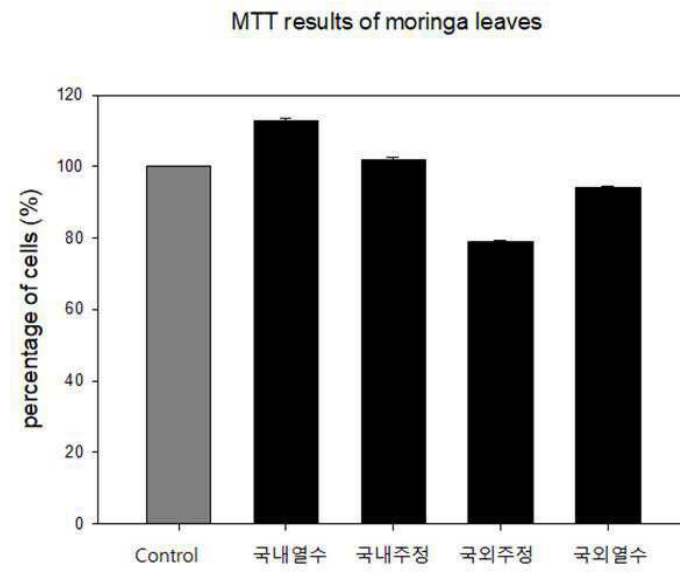
[0199] 상기 실시예<12-1>을 통해 식용효소를 이용하여 제조한 모링가 잎 추출물의 항산화 활성을 평가하기 위하여 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능은 상기 실시예 <5-5>와 동일한 방법으로 측정하였다.

[0200] 그 결과 도 14에서 나타낸 바와 같이, 국내산 모링가 잎보다 국외산 모링가 잎의 항산화 활성이 높았다. 펙티나제를 사용했을 때에는 효소를 첨가하지 않은 대조군 보다 항산화활성이 조금 증가하였으며, 셀룰라아제를 사용하였을 때 항산화활성이 증가하였다. 한편, 펙티나제와 셀룰라아제를 혼합하여 추출하였을 때 가장 높은 항산화 활성 증가율을 보였다. 50℃에서 4시간동안 1% 펙티나제와 셀룰라아제를 첨가하여 국외산 모링가 잎을 추출할 때 항산화 활성이 88.85%로서, 항산화 활성이 가장 높은 조건이었다. 이는 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능의 실험결과와 일치하였다.

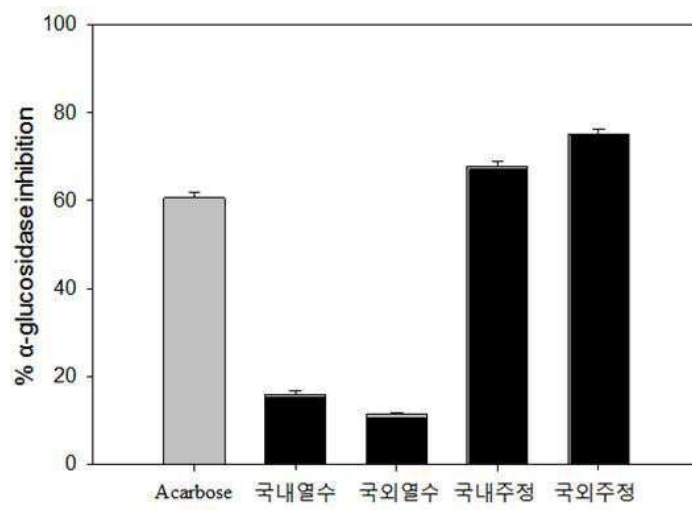
[0202] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

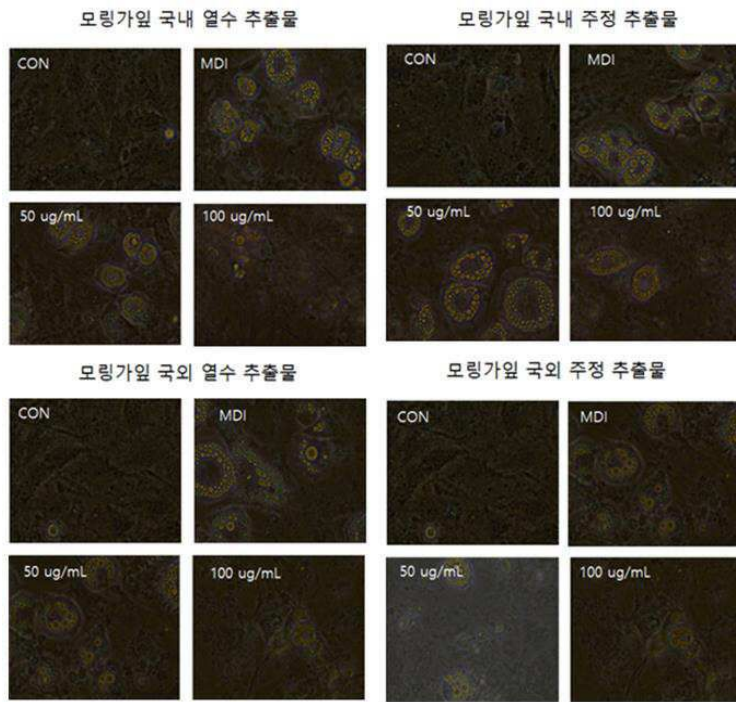
도면1



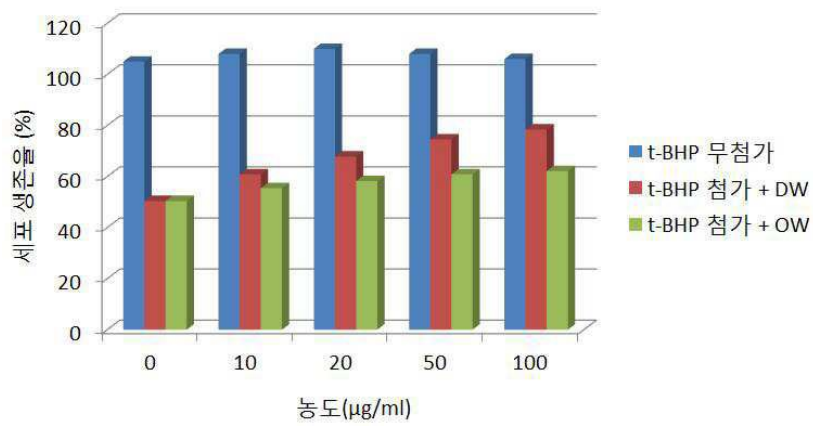
도면2



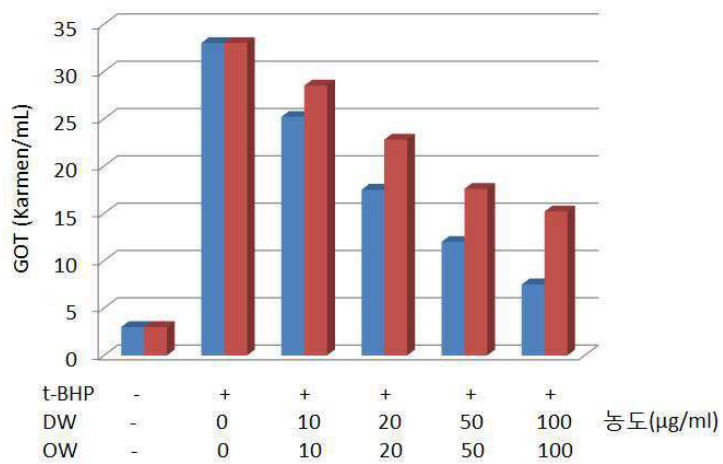
도면3



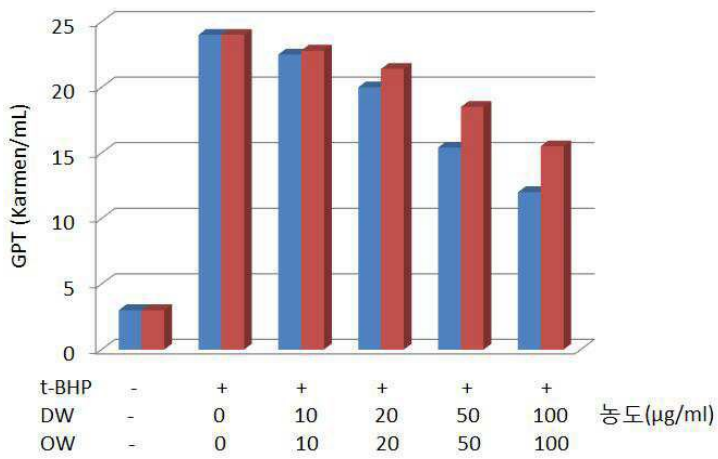
도면4



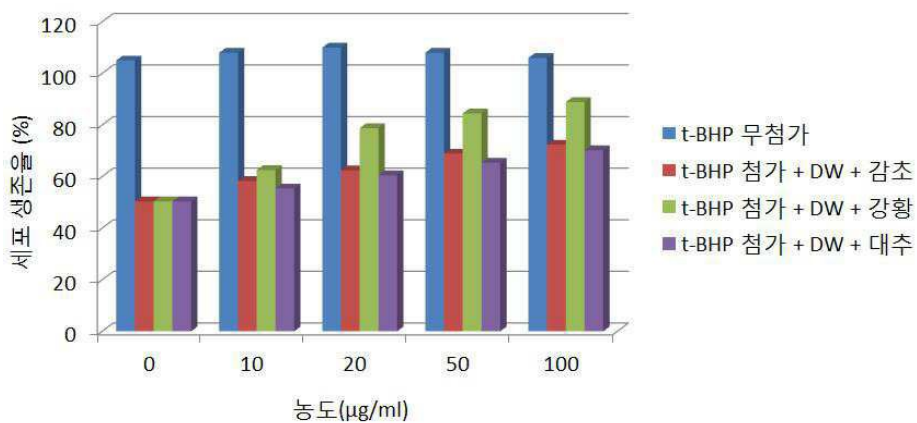
도면5



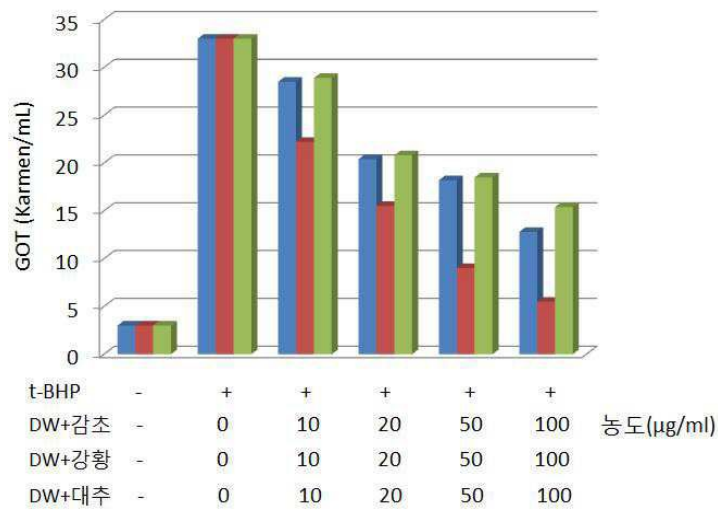
도면6



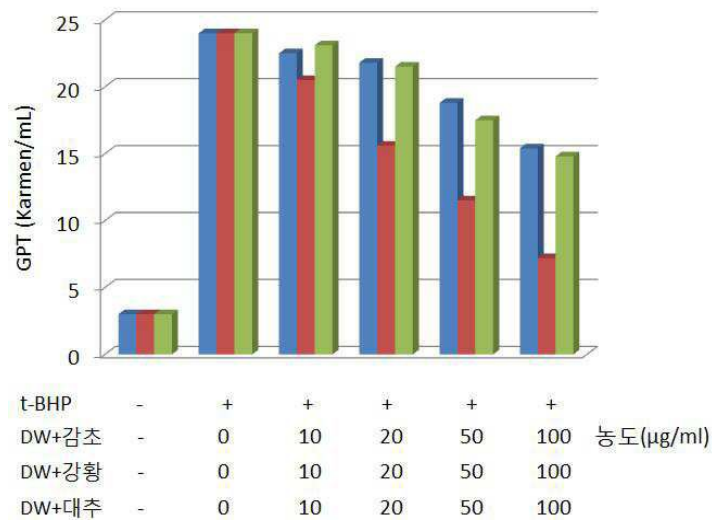
도면7



도면8



도면9



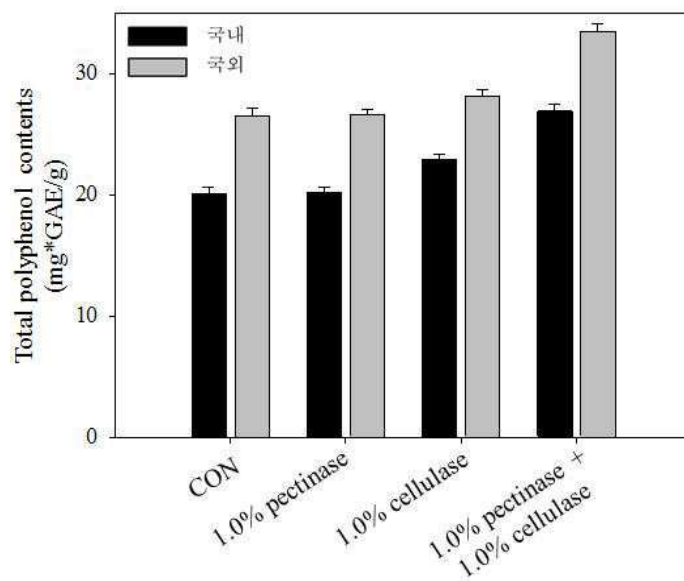
도면10



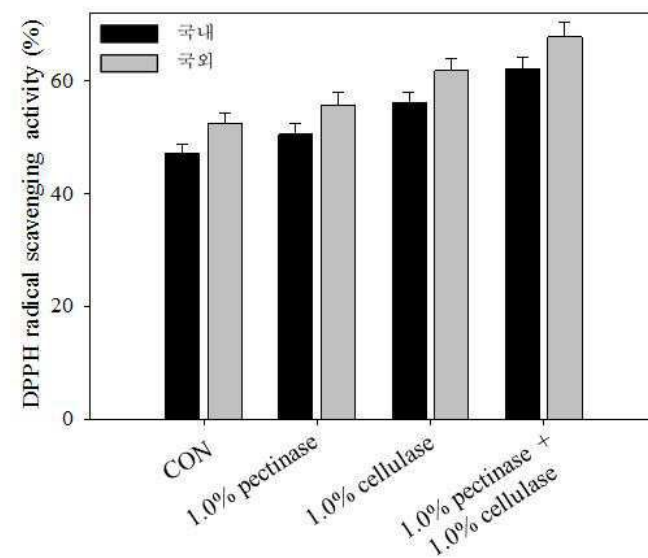
도면11



도면12



도면13



도면14

