

생대추(뚝대추) 과육 및 씨 추출물의 항산화 효과 및 항산화 성분

유미희 · 임효권 · 이효정 · 지영주 · 이인선^{1,*}

계명대학교 식품가공학 전공, ¹계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구(TMR) 센터

Components and Their Antioxidative Activities of Methanol Extracts from Sarcocarp and Seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder

Mi Hee Yu, Hyo Gwon Im, Hyo Jung Lee, Young Ju Ji, and In-Seon Lee^{1,*}

Department of Food Science and Technology, Keimyung University
¹The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University

Abstract Antioxidant activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder were investigated *in vitro*. Contents of total polyphenols in methanol extracts from sarcocarp and seed were 98.83, 138.99 µg/mg, respectively. Radical-scavenging activities of methanol extracts were examined using α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radicals, and hydrogen peroxide assay. Inhibition effects of methanol extracts on peroxidation of linoleic acid were examined by ferric thiocyanate and thiobarbituric acid methods. Both sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder showed relatively high antioxidant activities in various systems.

Key words: *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder, antioxidant, total polyphenol, free radicals

서 론

자유라디칼은 주로 노화와 질병의 원인으로 알려져 있다. 자유라디칼의 반응성은 산소분자처럼 매우 낮은 것에서부터 superoxide radical(O₂·), hydroxyl radical(OH·), hydrogen peroxide(H₂O₂), singlet oxygen(¹O₂)과 같이 매우 높은 것에 이르기까지 다양하다 (1). 이들은 생체에 치명적인 산소독성을 일으키며, 세포막 분해, 단백질 분해, 지질 산화, DNA 변성 등을 초래하여 세포의 기능 장애를 유발하고 암을 비롯한 뇌졸중, 파킨슨 병 등의 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 염증, 노화, 자가면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다(2-4). 특히 생체막의 구성 성분인 불포화지방산을 공격하여 생성되는 과산화 지질의 축적은 생체 기능의 저하나 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다 (5). 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 vitamins, carotenoids, flavonoids와 같은 폐놀성 화합물들이 다량 존재하여, 항산화성, 항알러지성, 항암성 등 다양한 생리기능을 갖고 있는 것으로 밝혀졌다. 폐놀 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 활

성과 기능성 소재로서의 활용에 대한 연구가 진행되고 있다. 페놀화합물의 다양한 항산화력은 그 구조적인 특징과 관련성이 높 은데, 이들은 금속 킬레이트제, 환원제로서, 활성산소의 소거제로서, 사슬절단 항산화제(chain breaking antioxidants)등으로서의 역할에 기인하는 것으로 알려져 있다. 그리고 플라보노이드는 페놀 화합물 중에서 자연적으로 생성되는 가장 큰 그룹의 하나로서, anthocyanins, chalcones, aurones, flavones, flavonols 및 이들의 유도체 등으로 나눌 수 있다. 현재까지 페놀화합물 및 플라보노이드의 구조에 따른 항산화 활성과의 상관성에 대한 연구도 보고되었다(6).

한편 대추(*Zizyphus Jujuba* var. *inermis* Rehder)는 갈매나무과 (Rhamnace)의 *Zizyphus*속, 낙엽, 활엽항목의 열매로서 현재 40여종의 품종과 400여종의 변종이 있는 것으로 알려져 있다. 예로부터 대추는 자양강장의 효과가 있고 이노제, 견이통 완화제, 만성기 관지염, 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, 항 알레르기, 간 보호 작용이 있으며 그 밖에 대장암과 같은 성인병예방, 결핵, 기관지염 및 신경쇠약에 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다(7-9).

대추의 성분으로는 당질과 ascorbic acid가 다량 함유되어 있고, 약용성분으로는 과실 중 각종 sterols, alkaloids, saponins, vitamins, 유기산류, amino산류 등이 보고되고 종자의 성분으로는 주로 oleic acid, linoleic acid의 불포화 지방산으로 이루어진 지방유와 saponin, eblin, lacton 등이, 잎의 성분으로는 flavonoids, alkaloids, vitamin C, rutin등이, 가지수피에는 alkaloids가 뿌리에도 saponin등이 함유되어 있다고 보고되어 있다(10-12). 그러나 대추는 주로 적갈색을 띠는 말린 대추가 약용으로 사용되고 있으며, 말린 대추에 대한 연구에 편중되어 있는 실정이다.

*Corresponding author: In-Seon Lee, The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, 1000 Sindang-dong, Dalseo-gu, Daegu 704-701, Korea
Tel: 82-53-580-5538
Fax: 82-53-580-5538
E-mail: inseon@kmu.ac.kr
Received October 28, 2005; accepted January 10, 2006

이에 본 실험에서는 풋대추의 유용자원으로의 이용가능성을 알아보기 위해, 풋대추의 과육과 씨를 각각 분리한 후 추출물을 제조하여 이들 각각의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드의 함량을 측정하고 천연항산화제 및 합성항산화제로 널리 알려진 ascorbic acid와 BHA와의 비교측정으로 생대추의 항산화 활성을 검색해 보았다.

재료 및 방법

시료제조

본 실험에서 사용한 풋대추는 당도가 높은 생대추로 경상북도 경산지역에서 재배한 것이며, 깨끗이 수세하여 과육과 씨로 각각 분리한 후 분쇄기로 각각 분쇄하여 80% 메탄올로 3회 반복 추출하였고 추출액은 여과지(Whatman No. 3 England)를 사용하여 여과하고 rotary vacuum evaporator(BUCHI Rotavapor R-205 Switzerland)로 감압농축한 후 동결 건조하여 항산화 활성검정에 사용하였다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(13)을 응용하여 측정하였다. 즉 각 메탄올 추출물 시료 1mg을 증류수 1mL에 녹이고 10배 희석한 희석액 2mL에 2배 희석한 Folin 시약 2mL을 첨가하고 잘 혼합한 후 3분간 방치한 후 10% Na₂CO₃ 2mL을 넣고 1시간 반응 시킨 후 UV/Visible spectrophotometer(UVIKON 922, Kontron, Italy)를 사용하여 700nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 이 때 tannic acid를 이용한 표준곡선은 tannic acid의 최종농도가 5, 25, 50 µg/mL가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 700nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 플라보노이드 함량

시료중의 총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno(14) 등의 방법에 의해 측정하였다. 각 시료 추출물 0.1mL와 80% ethanol 0.9mL을 혼합한 혼합물 0.5mL에 10% aluminium nitrate와 1M Potassium acetate 0.1mL 그리고 80% ethanol 4.3mL을 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 흡광도를 표준물질로 사용한 quercetin 검량선과 비교하여 총 플라보노이드의 함량을 구하였다. Quercetin을 이용한 표준곡선은 quercetin의 최종농도가 5, 25, 50 µg/mL가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 415nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

α-α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거활성

DPPH radical에 대한 각 시료의 환원력을 측정하기 위해 99% 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 800 µL와 메탄올에 녹인 0.15mM DPPH 용액 200 µL를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀ 값으로 나타내었다. 이때 활성비교를 위하여 BHA와 ascorbic acid를 사용하였으며 시료농도의 1/10이 되도록 첨가하여 같은 방법으로 항산화 효과를 측정하였다.

ABTS radical 소거활성

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS+[•] cation decolorization assay방법(15)에 의하여 시행하였다. 7mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma Chemical

Co., USA)와 2.45mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+[•]을 형성시킨 후 732nm에서 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.

Hydrogen peroxide 소거활성

Hydrogen peroxide radical에 대한 소거활성은 Müller 등(16)의 방법에 따라 96 well micro plate에 PBS 100 µL, 물에 녹인 시료 20 µL을 넣고 1mM H₂O₂를 가하여 5분간 방치한 다음 1.25mM ABTS 30 µL와 PBS에 녹인 1u/mL peroxidase 30 µL를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

Linoleic acid에 대한 항산화 효과

Linoleic acid의 과산화에 대한 저해 효과 검정은 Haraguchi(17) 등의 방법에 준해 다음과 같이 실험하였다. Linoleic acid의 기질 용액은 95%의 에탄올에 녹인 2.52% linoleic acid 4mL, 50mM sodium phosphate buffer(pH7.0) 8mL와 absolute alcohol 4mL를 가하여 제조한 후 cap을 한 뒤 40°C에서 100rpm으로 12일간 incubation하였다. 먼저 FTC가의 측정을 위해서 Linoleic acid 반응기질용액 0.1mL를 취해 75% ethanol 9.7mL, 30% ammonium thiocyanate 0.1mL, 20mM ferrous chloride 0.1mL와 혼합하여 3분간 방치한 후 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

TBA가의 측정을 위해 기질용액 1mL에 20% trichloroacetic acid 2mL와 0.8% thiobarbituric acid 시약 2mL을 가한 후 혼합하여 95°C 수욕 상에서 20분 동안 반응시켰다. 이 반응액을 실온에서 냉각시키고 3,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액의 흡광도를 532nm에서 측정하였다.

V79 세포주에 대한 항산화 효과

풋대추 추출물의 항산화능을 측정하기 위해 Nakayama 등(18)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 활성화 되도록 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%, pH7.0)로 세척한 다음, 50 µM의 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 생존률은 시료 무첨가 대조군에 대한 시료첨가군의 세포수로 표시하였다.

결과 및 고찰

폴리페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화-환원반응에서 기질로 작용하며, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(OH)기를 가진 방향족 화합물들을 가리키며 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 충치 예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산

Table 1. Contents of total polyphenols and flavonoids in methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder

Plant	Part used	Total polyphenols ¹⁾ (µg/mg)	Total flavonoids ²⁾ (µg/mg)
<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i> Rehder	Sarcocarp	98.83 ± 4.70 ³⁾	35.56 ± 6.42
	Seed	138.99 ± 7.39	131.48 ± 4.31

¹⁾Milligrams of total polyphenol content/g of plants based on tannic acid as standard.

²⁾Milligrams of total flavonoid content/g of plants based on quercetin as standard.

³⁾Each value is mean ± S.D.(n ≥ 3).

화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다(19).

먼저 대추의 과육 및 씨의 메탄올 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 각각 tannic acid, quercetin을 기준 물질로 하여 측정하였다(Table 1). 그 결과, 대추과육 추출물의 총 폴리페놀 함량은 98.83 µg/mg, 대추씨 추출물은 138.99 µg/mg으로 대추과육 보다는 대추씨에서 높은 폴리페놀 함량을 보였다. 총 플라보노이드 함량은 대추과육과 대추씨 추출물이 각각 35.56 및 131.48 µg/mg으로 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(20) 대추와 유사한 경향이었으나, 선인장의 경우 폴리페놀 함량이 씨 1.47g, 줄기 1.86g, 열매 3.4-4.9g으로 열매에 비교적 많은 양의 폴리페놀을 함유한 것으로 나타나(21) 대추의 과육 및 씨 추출물과는 다른 경향을 보였다. 그리고 산채류인 섬고사리와 물영경귀 잎의 총 폴리페놀 함량은 각각 120.69, 130.22 µg/mg이었고, 플라보노이드 함량은 각각 16.75, 13.3 µg/mg으로 보고되었다(22). 이 결과와 비교했을 때 대추과육 및 대추씨 추출물은 산채류와 유사하게 비교적 많은 양의 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있으며, 특히 대추씨의 플라보노이드 함량이 매우 높음을 알 수 있었다.

DPPH free radical 소거활성

DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 cystein, glutathione과 같은 함 유황아미노산과 ascorbic acid, BHA 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 자유 라디칼은 인체 내

에서 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(23).

대추과육, 대추씨 추출물과 BHA, ascorbic acid의 DPPH 소거활성을 농도별로 측정하여 비교한 결과 Table 2와 같이 100 µg/mL의 농도에서 대추과육이 92%, 대추씨가 95%의 소거능을 보였고, BHA와 ascorbic acid(10 µg/mL)에서 96% 정도의 항산화능을 보여 대추 추출물에서도 우수한 소거활성능이 있음을 알 수 있었다. 그리고 대추과육 및 대추씨 추출물의 RC₅₀ 값은 약 27.5 µg/mL으로, 한국산 약용식물 중 오동나무 열매의 RC₅₀ 값이 27.2 µg/mL으로 유사한 소거능을 가짐을 확인하였다. 이 등(24)에 의하면 고로쇠나무 잎, 모과나무 잎, 산수유 잎, 배롱나무 꽃, 오동나무 열매의 RC₅₀ 값이 각각 39.4, 46, 44.4, 29.6, 27.2 µg/mL이고, Jung 등(25)은 오미자 종자의 메탄올 추출물의 RC₅₀ 값을 33.2 µg/mL로, Li 등(26)은 해양균류의 라디칼 소거능을 측정하여 RC₅₀ 값을 29-200 µg/mL로 보고하였다. 따라서 대추과육 및 대추씨 추출물은 이들 시료보다는 다소 낮지만 비교적 높은 소거활성능을 가진 것으로 생각된다.

ABTS free 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(27-29). ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치하여 ABTS+ 이 생성되면 추출물의 항산화력에 의해 ABTS+ 이 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이

Table 2. Scavenging effects of butylated hydroxyanisole (BHA), ascorbic acid and methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder on α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl radicals (DPPH •)

Samples	Part used	Concentration (µg/mL)	Scavenging effect (%)	RC ₅₀ ¹⁾ (µg/mL)
<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i> Rehder	Sarcocarp	10	31.79 ± 3.36 ²⁾	27.49 ± 7.5
		50	79.58 ± 8.02	
		100	92.14 ± 4.99	
	Seed	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	
Ascorbic acid		1	14.27 ± 1.26	2.09 ± 1.03
		5	101.16 ± 3.83	
		10	96.52 ± 1.3	

¹⁾Concentration required for 50% reduction of DPPH• at 30 min after starting the reaction.

²⁾Each value is mean ± SD (n ≥ 3).

Table 3. Scavenging effects of Trolox and methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder on 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radicals (ABTS⁺)

Samples	Part used	Concentration (µg/mL)	Scavenging effect (%)
Trolox		15 µM	63.24 ± 0.94 ¹⁾
<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i> Rehder	Sarcocarp	10	20.55 ± 1.23
		100	99.11 ± 0.60
	Seed	10	24.15 ± 3.57
		100	98.58 ± 0.58
BHA		1	19.04 ± 3.10
		10	99.38 ± 0.81
Ascorbic acid		1	25.57 ± 0.27
		10	99.86 ± 0.17

¹⁾Each value is mean ± SD (n ≥ 3).

탈색되는데 이를 흡광도 값으로 나타내어 추출물의 ABTS⁺의 소거활성능을 측정할 수 있다.

대추과육 및 대추씨 추출물의 ABTS⁺ 소거활성을 Trolox, BHA, ascorbic acid와 비교 측정한 결과(Table 3) ABTS⁺ 소거활성법에서 표준물질로 사용되는 Trolox는 15 µM에서 63% 정도의 소거활성능을 보여 Roberta등(30)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 대추과육 및 대추씨 추출물이 100 µg/mL의 농도에서 약 92-95%의 DPPH· 소거활성을 나타낸 것과 유사한 결과이며, BHA와 ascorbic acid에서도 같은 경향이 었다.

Hydrogen peroxide 소거활성

Hydrogen peroxide 소거활성을 측정한 결과(Table 4) 같은 농도에서 DPPH radical이나 ABTS radical 소거활성보다 다소 낮은 소거활성능을 보였으며, 100 µg/mL의 농도에서 대추과육 추출물은 약 60%, 대추씨 추출물은 약 72%의 소거활성을 보였는데 이는 대추과육에 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(31) 대추씨에 다량 함유된 flavonoid 화합물의 구조적인 차이 때문에 대추과육에 비해 특히 hydrogen peroxide 소거활성에 더 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다. 박 등(32)은 환삼덩굴에서 분리한 luteolin-7- α - β -D-glucose가 50 µg/mL의 농도

에서 62.4%, 100 µg/mL의 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 µg/mL의 농도에서는 hydrogen peroxide에 대한 활성을 나타내지 못하였고, ascorbic acid 10 µg/mL의 농도에서 약 65%의 소거활성을 보여 대추씨 추출물이 단일물질로 분리·정제가 된다면 BHA나 ascorbic acid보다 우수한 hydrogen peroxide 소거활성을 가질 수 있을 것으로 생각된다.

Linoleic acid에 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 lipase가 촉매하는 가수분해 반응에 의해 쉽게 변질될 수 있으며(24) 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 (RO·), peroxy radicals (ROO·), hydroxyl radical (OH·) 및 malondialdehyde나 4-hydroxynonenal 등은 간접적으로 단백질과 DNA의 손상을 일으킬 뿐만 아니라 노화와 암 발생의 중요한자이기도 하다(33).

지질산화 초기에 발생하는 과산화물은 ferrous chloride(Fe²⁺)를 ferric chloride(Fe³⁺)로 산화시켜 적갈색을 띄게 되며, 지질산화가

Table 4. Scavenging effects of BHA, ascorbic acid and methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder on hydrogen peroxide (H₂O₂)

Samples	Part used	Concentration (µg/mL)	Scavenging effect (%)
<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i> Rehder	Sarcocarp	10	10.88 ± 1.62 ¹⁾
		100	60.12 ± 5.02
	Seed	10	14.61 ± 3.35
		100	72.15 ± 4.44
BHA		1	7.76 ± 1.53
		10	43.68 ± 9.79
Ascorbic acid		1	20.63 ± 1.92
		10	65.45 ± 5.75

¹⁾Each value is mean ± SD (n ≥ 3).

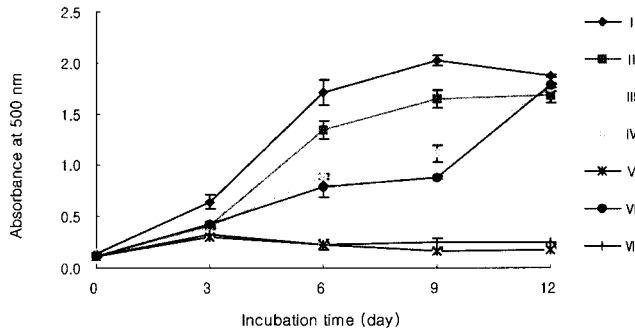


Fig. 1. FTC values in linoleic acid emulsion treated with BHA, ascorbic acid, and methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. I: Control, II: Sarcocarp of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder 10 µg/mL, III: Sarcocarp of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder 100 µg/mL, IV: Seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder 10 µg/mL, V: Seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder 100 µg/mL, VI: BHA 1 µg/mL, VII: BHA 10 µg/mL.

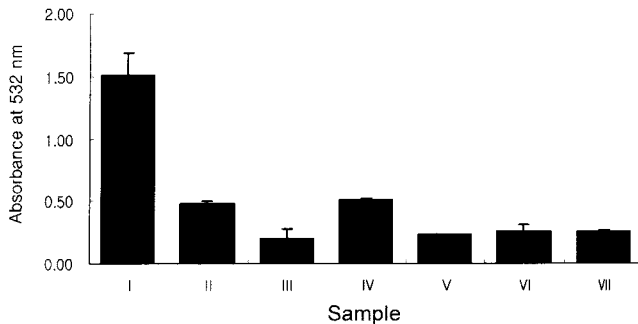


Fig. 2. TBA values in linoleic acid emulsion treated with BHA, ascorbic acid, and methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. I: Control, II: Sarcocarp of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder 10 µg/mL, III: Sarcocarp of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder 100 µg/mL, IV: Seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder 10 µg/mL, V: Seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder 100 µg/mL, VI: BHA 1 µg/mL, VII: BHA 10 µg/mL.

계속 진행되면 malonaldehyde와 같은 저분자의 활성화합물이 생성되는데 이것은 TBA와 결합하여 적색의 화합물을 형성하게 된다. 대추과육과 대추씨 추출물을 linoleic acid 기질에 첨가하여 산화방지 효과를 검색한 결과(Fig. 1-2) 대추과육과 대추씨 추출물 100 µg/mL, BHA 10 µg/mL의 농도에서 높은 산화억제효과를 보였으며, 실험 12일째 대추과육 및 대추씨 추출물 100, BHA 10 µg/mL의 농도에서 대조구에 비해 가장 높은 산화억제효과가 나타났는데 이는 Mohd등(34)이 발표한 월계수의 부위별로 다른 추출물의 산화억제 효과와 유사한 경향을 보였다.

또한 TBA가를 측정된 결과 positive control로 사용한 BHA 1, 10 µg/mL은 대추과육, 대추씨 추출물 100 µg/mL의 농도에서와 유사한 수준의 산화억제 효과를 나타내었다. 대추과육과 대추씨를 비교해 본 결과 10 µg/mL의 농도에서 유사한 수준의 산화억제 효과를 나타냈고 100 µg/mL에서는 대추과육이 대추씨보다 항산화 효과가 더 높은 것으로 관찰되었으나 이들 시료사이에 유의적인 차이는 없는 것으로 보인다. Mohd등(34)은 월계수를 부위별로 하여 과산화물가의 변화를 보았는데 합성항산화제인 BHT와 월계수 뿌리, α-Tocopherol이 항산화 효과가 높은 것으로 측정되었고 대추과육과 월계수 열매 추출물을 비교했을 때 대추과육의 산화억제 효과가 더 우수한 것을 알 수 있었다. Ismail 등(35)에 의

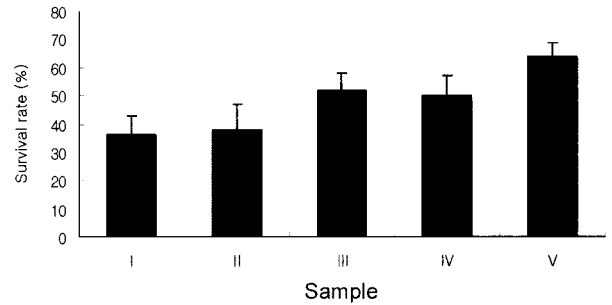


Fig. 3. Protective effects of BHA, ascorbic acid, and methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder on the cytotoxicity of H₂O₂ in V79 cells. I: Control, II: Sarcocarp of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder 10 µg/mL, III: Sarcocarp of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder 100 µg/mL, IV: Seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder 10 µg/mL, V: Seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder 100 µg/mL.

하면 *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 대추과육 및 대추씨 추출물의 경우에도 FTC가(약 91%)와 TBA가(84-86%)의 값의 차이는 보였으나 산화억제 효과가 우수함을 알 수 있었고, 대추과육 및 대추씨 추출물은 DPPH 및 ABTS radical에 대해 높은 소거활성을 보일 뿐만 아니라 hydrogen peroxide의 소거활성능이 뛰어나며 linoleic acid의 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 대추과육 뿐만 아니라 대추씨를 천연 항산화제 및 기능성 식품으로 이용할 수 있는 가능성을 시사한다.

V79 세포주에 대한 항산화 효과

Nakayama 등(36)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 V79 cell을 이용하여 H₂O₂로 유도된 세포독성에 대한 대추과육 및 대추씨 추출물의 세포보호 효과를 살펴본 결과 H₂O₂만 처리한 세포의 생존율이 36% 정도인데 비해 대추과육 및 대추씨 추출물을 함께 처리하였을 때는 100 µg/mL의 농도에서 생존율이 각각 52%, 64%로 증가하여 대추씨 추출물이 H₂O₂로 유도된 세포독성에 대해 높은 세포보호 효과를 가지는 것으로 나타났다(Fig. 3). 천연 항산화 물질인 caffeic acid, quercetin, catechin을 동일한 방법으로 측정하였을 때 그 생존율이 각각 55, 51, 42%로 나타났다는 보고(37-38)와 비교할 때 대추씨 추출물은 이들 천연 항산화 물질들에 비해 세포독성에 대한 보호효과가 더 우수함을 알 수 있었다. 또한 Nakayama 등(18)은 gallic acid와 methyl gallate, propyl gallate, lauryl gallate 등의 gallic acid esters의 H₂O₂로 유도된 세포독성에 대한 보호효과를 보고하였는데, gallic acid 자체에는 아무런 세포보호 효과가 없었으나, methyl gallate 40 µM에서 60%, propyl gallate 10 µM에서 80%, lauryl gallate의 경우가 가장 낮은 농도인 100 nM에서 70%, 200 nM에서 100%의 생존율을 보여 매우 강한 항산화능이 존재함을 확인하였다.

현재 가장 많이 사용하고 있는 합성 항산화제인 BHA, BHT는 그 효과는 우수하지만 변이원성과 발암성이 문제시 되고 있으며

(39), tocopherol류와 같은 천연 항산화제는 효과가 낮은 문제점이 있음을 고려할 때 항산화능이 높고 안전한 천연 항산화제 연구에 대추과육 및 대추씨 추출물의 이용이 매우 의의가 있을 것으로 생각된다.

요 약

본 실험에서는 풋대추의 유용자원으로의 이용가능성을 알아보기 위해, 풋대추의 과육과 씨를 각각 분리한 후 추출물을 제조하여 이들 각각의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드의 함량 측정하고 천연항산화제 및 합성항산화제로 널리 알려진 ascorbic acid와 BHA와의 비교측정으로 생대추의 항산화 활성을 검색해 보았다. 먼저 대추의 과육 및 씨의 메탄올 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과, 대추과육 추출물의 총 폴리페놀 함량은 98.83 µg/mg, 대추씨 추출물은 138.99 µg/mg으로 대추과육 보다는 대추씨에서 높은 폴리페놀 함량을 보였다. 총 플라보노이드 함량은 대추과육과 대추씨 추출물이 각각 35.56 및 131.48 µg/mg으로 대추씨에서 플라보노이드 함량이 높게 나타났다. 각 시료의 DPPH 소거 활성을 농도별로 측정하여 비교한 결과, 100 µg/mL의 농도에서 대추과육이 92%, 대추씨가 95%의 소거능을 보였고, BHA와 ascorbic acid(10 µg/mL)에서 96% 정도의 항산화능을 보였다. 또한 ABTS·⁺ 소거활성을 Trolox, BHA, ascorbic acid와 비교 측정한 결과, ABTS·⁺ 소거활성법에서 표준물질로 사용되는 Trolox는 15 µM에서 63% 정도의 소거활성능을 보였고, 추출물은 100 µg/mL에서 98-99% 정도의 ABTS·⁺의 높은 소거활성을 보였으며, BHA와 ascorbic acid는 10 µg/mL에서 99% 이상의 소거활성능을 보였다. Hydrogen peroxide 소거활성을 측정한 결과 같은 농도에서 DPPH radical이나 ABTS radical 소거활성보다 다소 낮은 소거활성능을 보였으며, 100 µg/mL의 농도에서 대추과육 추출물은 약 60%, 대추씨 추출물은 약 72%의 소거활성을 보였다. Linoleic acid에 대한 항산화 효과를 측정할 경우에도 FTC가(약 91%)와 TBA가(84-86%)의 값의 차이는 보였으나 추출물의 산화억제 효과가 우수함을 알 수 있었고, 대추과육 및 대추씨 추출물은 DPPH 및 ABTS radical에 대해 높은 소거활성을 보일 뿐만 아니라 hydrogen peroxide의 소거활성능이 뛰어나며 linoleic acid의 산화를 초기단계에서 효과적으로 억제하여 산화의 진행을 상당히 지연시키는 것을 알 수 있었다. V79 cell을 이용하여 H₂O₂로 유도된 세포독성에 대한 대추과육 및 대추씨 추출물의 세포보호 효과를 살펴본 결과 H₂O₂만 처리한 세포의 생존률이 36% 정도인데 비해 대추과육 및 대추씨 추출물을 함께 처리하였을 때는 생존률이 각각 52, 64%로 증가하여 대추씨 추출물이 H₂O₂로 유도된 세포독성에 대해 높은 세포보호 효과를 보였다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지정 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터, 한국산업기술재단 지역혁신인력양성사업의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

1. 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)
2. Sawyer DT, Valentine JS. How super is superoxide? *ACC. Chem.*

- Res. 14: 393 (1981)
3. Fridorich, I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biophys.* 247: 1-11 (1986)
4. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative diseases. *Science* 221: 1256-1264 (1983)
5. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605 (1979)
6. Kandaswami C, Middleton EJ. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. pp. 351-376. In: *Free Radicals in Diagnostic Medicine.* Armstrong D (ed). Plenum Press, New York and London (1994)
7. Rhee YK, Kim DH, Han MJ. Inhibitory effect of *Zizyphi fructus* on β -glucuronidase and tryptophanase of human interstitial bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 199-205 (1998)
8. Na HS, Kim KS, Lee MY. Effect of jujube methanol extract on the hepatotoxicity in CCl₄-treated rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 839-845 (1996)
9. Lee YG, Cho SY. Effect of jujube methanol extract on benzo(a)pyrene induced hepatotoxicity. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24: 127-132 (1995)
10. Yook CS. Screening test on the components of the genus *Zizyphus* in Korea. *Korean J. Pharmacog.* 3: 27-29 (1972)
11. Lee SK. Studies on the constituents of the leaves of *Zizyphus jujuba* Mill. PhD thesis, Pusan National University, Pusan, Korea (1989)
12. 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. *Arch. Pharm. Res.* 14: 99-102 (1991)
13. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12: 239-249 (1912)
14. Nivea 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)
15. 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)
16. Müller HE. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 259: 151-158 (1985)
17. Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A. Antioxidative substances in leaves of *Polygonum hydropiper*. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1349-1351 (1992)
18. Nakayama T, Niimi T, Osawa T, Kawakishi S. The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* 281: 77-80 (1992)
19. Yoshizawa S, Horiuchi T, Yoshida T, Okuda T. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. *Phytother. Res.* 1: 44-47 (1987)
20. 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)
21. Lee YC, Hwang KH, Han DH, Kim SD. Compositions of *Opuntia ficus-india*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 847-853 (1997)
22. 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)
23. 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)
24. 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)
25. 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)
26. 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)
27. Rice-Evans CA, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. Methods Enzymol. 234: 279-293 (1994)
 28. 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)
 29. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Rad. Biol. Med. 20: 933-956 (1996)
 30. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Rad. Biol. Med. 26: 1231-1237 (1999)
 31. Ohigashi H, Osawa T, Terao J, Watanabe S, Yoshikawa T. Food Factors for Cancer Prevention. Springer, Tokyo, Japan. pp. 613-616 (1997)
 32. 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)
 33. Farag RS, Badei A, Hewedi FM, Baroty GS. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid and oxidation in aqueous media. J. Am. Oil Chem. Soc. 66: 792-799 (1989)
 34. 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)
 35. Ismail M, Manickam E, Danial AM, Rahmat A, Yahaya A. Chemical composition and antioxidant activity of *Strobilanthes crispus* leaf extract. J. Nutr. Biochem. 11: 536-542 (2000)
 36. Nakayama T, Hori K, Terazawa K, Kawakishi S. Comparison of the cytotoxicity of different hydroperoxides to V79 cells. Free Rad. Res. Commun. 14: 173-178 (1991)
 37. Nakayama T, Yamada M, Osawa T, Kawadishi S. Inhibitory effects of caffeic acid ester in H₂O₂ induced cytotoxicity and DNA single strand breaks in Chinese Hamster V79 cells. Biosci. Biotech. Biochem. 60: 316-318 (1996)
 38. Nakayama T, Yamada M, Osawa T, Kawadishi S. Suppression of active oxygen induced cytotoxicity by flavonoids. Biochem. Pharm. 45: 265-267 (1993)
 39. Branen AS. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxytoluene and butylated hydroxytoluene. J. Am. Oil Chem. Soc. 52: 59-63 (1975)