

대추 추출물이 장내 미생물의 생육에 미치는 영향 및 항산화 활성

정혜미¹ · 김이슬¹ · 안승준¹ · 어미선¹ · 안준배² · 김광엽^{1*}

¹충북대학교 식품공학과

²서원대학교 외식산업학과

Effects of *Zizyphus jujuba* var. *boeunensis* Extracts on the Growth of Intestinal Microflora and Its Antioxidant Activities

Hye Mi Jeong¹, Yi Seul Kim¹, Seung Joon Ahn¹, Mi Sun Auh¹,
Jun Bae Ahn², and Kwang Yup Kim^{1*}

¹Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

²Dept. of Food Service Industry, Seowon University, Chungbuk 361-742, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the effects of jujube extracts on intestinal microflora, along with their antioxidant activities, according to extraction method. The antimicrobial activities of the extracts were measured using the agar diffusion method with a jujube extract concentration of 50 mg/mL. Neither the first nor second jujube extracts were inhibitory against the tested intestinal bacteria. However, water extracts of jujube significantly enhanced the growth of lactic acid bacteria, especially *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium adolescentis*. Total phenol compounds and flavonoid compounds were higher in the 1st than in the 2nd water extracts. The EDA values of both water and ethanol extracts increased in proportion to the extract concentration. The 1st water extract showed the highest value among all the others, which was 85.60% at the concentration of 0.05 mg/mL. Furthermore, the 1st water extract showed stronger antioxidant activity than the other samples with an activity of 679.91 mg AA eq/g. These results support the potential use of jujube water extracts as a functional food component and a valuable resource for the development of nutraceutical foods, to increase the growth of *Bifidobacterium* spp. in the human intestine.

Key words: jujube extracts, intestinal microflora, antioxidant activity, total polyphenol compounds, total flavonoid compounds

서 론

대추(*Zizyphus jujuba* Miller)는 갈매나무목 갈매나무과 의 낙엽성 교목으로 높이가 15 m이며, 가지에 가시가 있다. 잎은 어긋나고 긴 타원형에서 달걀꼴로 길이 2~3 cm이며, 가는 톱니가 있고 3개의 주맥이 있다. 꽃은 작고 옅은 노란색이며, 5~6월에 잎겨드랑이에서 2~3개가 모여 핀다. 열매는 타원형이나 달걀꼴로 9~10월에 익는데 암적갈색이며 5~30 g이고, 과육 속에 핵이 1개 있다. 대추에 관한 우리나라의 전래에는 《한서지리지》의 고대 낙랑에 관한 기록에 ‘낙랑에 대추와 밤이 많이 생산된다’고 하였고, 《제민요술(齊民要術)》에도 전쟁 시 비상식량으로 ‘대추초(멧대추와 보릿가루를 찢어 만든 음식)’와 ‘대추포(대추를 쪄개서 말린 음식)’에 관한 기록이 있어, 역사가 매우 오래되었음을 짐작할 수 있다(1,2).

대추의 성분으로는 당질과 ascorbic acid가 다량 함유되어

있고, 약용성분으로는 과실 중 각종 sterol, 30여 종의 alkaloids, saponin, vitamin C·P·K, rutin 등이 보고되어 뇌출혈과 고혈압의 예방 등 순환기 계통의 건강 유지에 그 약리 효과가 크게 기대된다(1,3).

대추는 대추 주산지의 명칭을 붙여서 충청도의 보은대추, 경기도의 경대추, 논산의 연산대추, 밀양의 고례대추, 경상북도의 동곡대추 등으로 불리고 있으며 이중 충북지역의 특산물인 보은 대추(*Z. jujuba* var. *boeunensis*)는 충청 남·북도 일원에서 오래전부터 재배되어 오던 품종으로, 나무의 자람세는 직립성이고 오전 개화성이며 숙기는 9월 하순경으로 조생종에 속한다. 과실의 크기는 5 g 정도로 작은 편이고 당도는 보통이다. 핵 속에 종자가 전혀 없는 것이 특징이다(1).

인체의 장내에는 100조의 세균이 존재하고 분변 고형물의 약 30%를 차지하고 있다(4). 장내미생물은 인체의 장내에서 상호공생 또는 길항 관계를 유지하면서 섭취된 음식물과 소화관으로부터 분리되는 생체성분을 이용하고 증식 및 배설

*Corresponding author. E-mail: kimky@chungbuk.ac.kr
Phone: 82-43-261-2568, Fax: 82-43-271-4412

되고 있다. 이러한 장내미생물 균총은 사람의 나이와 식이 등에 따라 크게 영향을 받으며, 이들 균총의 조성은 노화, 변비, 장 관련 질환발생 등과 관계가 깊은 것으로 알려져 있다(5,6).

장내 미생물은 크게 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* 속과 같은 유익균과 *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Desulfotomaculum*, *Veilonella* 속과 같은 유해균으로 나눌 수 있다. 대표적인 유익균 *Bifidobacterium* 속은 장내에서 유기산과 항생물질을 생산하여 외부 병원균의 성장과 유해균총의 과잉성장을 억제하는 것으로 보고되고 있다. 반면에 대표적인 유해균 *Clostridium perfringens*는 여러 가지 다양한 독소를 생산하여 신생아의 괴사성 장염, 담석증, 간염 및 virus 감염 등에 깊이 관여하며, *Clostridium difficile*는 항생제의 사용과 관련해서 설사와 대장염을 일으키는 병원체이다(7,8).

2001년 세계보건기구(WHO)와 국제식량기구(FAO)의 합동전문가위원회는 probiotics를 '살아있는 미생물로 적당한 양을 섭취하면 건강에 유익한 세균'이라고 정의했으며(9), 앞서 설명한 *Bifidobacterium*, *Clostridium* 속을 포함하여 *Lactobacillus* 속, *Bacillus* 속, *Saccharomyces* 속 등이 이에 속한다(10). Prebiotics는 probiotics의 성장에 필요한 영양소를 의미하는 것으로(9), fructooligosaccharide, galactooligosaccharide, lactitol, lactulose 및 대두 oligosaccharide 등이 있다. 이 중 올리고당은 glucose나 galactose 등의 단당이 2~10개 정도 결합한 분자량 300~20,000가량의 저분자 물질로, 신체 내의 소화효소에 의하여 분해되지 않고 대장에 도달하여 장내 유용세균의 대표적인 비피더스균에 의하여 선택적으로 이용된다(11). 최근에 많은 형태의 요구르트 및 유산균 함유 건강식품에서 유산균과 prebiotics가 혼합된 형태의 제품이 유행하고 있으며 이렇게 조합된 제품을 synbiotic이라 하고 있다(12).

지금까지 대추에 관한 연구로는 대추 추출물의 항산화 작용(13,14), 간 보호작용(15), 항암작용(16), 진정작용(17) 등과 같은 약리작용을 하는 성분에 관한 연구가 주로 이루어졌고, 천연물 유래 소재 중 장내 미생물에 영향을 미칠 수 있는 추출물로는 쑥(18), 선인장(19), 민들레(20), 뽕잎(6) 등에 관한 연구가 이루어졌다. 미생물과 관련된 연구로는 대추 추출물이 유산균 생육에 미치는 영향(21), 대추추출물 함량에 따른 효모 발효특성 연구(22), 대추가 냉장 저장한 삼계탕의 산패와 미생물 증식에 미치는 영향(23), 대추 추출물이 난충치성에 관련된 미생물 증식 억제 효과(24) 등이 보고되어 있으며 대추추출물이 장내 미생물에 미치는 영향에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 대추 추출물과 장내 유익균의 생육을 조절하여 장내 부패를 방지하기 위한 probiotics로 유산균을 조합하기 위하여 대추 추출물이 장내 유익균 중에서도 유산균의 생육에 미치는 영향을 *in vitro* 상에서 알아보고자

한다. 또한 증식인자로서 대추 추출물에 존재하는 당이 유산균의 생육에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 추출방법을 달리하여 당 함량이 다른 대추 1차 및 2차 열수, 에탄올 추출물을 각각 제조하였다. 이와 더불어 지역 특산물인 보은대추를 기능성식품 소재로 활용하기 위하여 페놀성 화합물과 항산화성을 검색하여 기능성식품으로 상품화하기 위한 기본 자료를 확보하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 사용균주

본 실험에 사용한 대추는 보은 황토 대추 연합회를 통해 구입, 마쇄하여 사용하였고, 사용균주는 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, Daejeon, Korea)에서 분양받은 균과 Mitsuoka법(25)에 의해 분리된 균을 사용하였다. 한국생물자원센터에서 분양받은 장내 유해균으로는 *Clostridium difficile* KCTC 5009, *Clostridium perfringens* KCTC 3269, *Eubacterium limosum* KCTC 3266, *Bacteroides fragilis* KCTC 3688을 실험에 사용하였고, 장내 유익균으로는 실험실에서 성인 남성의 분변을 채취해 Mitsuoka법(25)에 의해 분리한 *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3472, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3164, *Streptococcus thermophilus* KCTC 3658을 사용하였다. 전배양 및 본배양을 위한 생육배지로 장내 유해균들은 Reinforced Clostridial Medium (RCM) broth(Difco, Detroit, MI, USA), 장내 유익균들은 Lactobacilli MRS broth(Difco)를 사용하였다. 이들 균주는 50% 글리세롤이 포함된 배지에 넣어 -85°C의 deep freezer(Ultra-low temperature freezer, MDF-192, SANYO Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan)에 보관하여 사용하였으며, 실험에 사용하기 전 3회 이상 계대 배양하여 활성화시킨 후 사용하였다.

에탄올 추출물 및 열수 추출물 제조

증식인자로서 대추 추출물에 존재하는 당이 유산균의 생육에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 초기 추출방법을 달리하여 당 함량이 다른 대추 1차 및 2차 추출물을 제조하였다(Fig. 1).

1차 추출물: 보은대추 20 g에 20배의 99.9% 에탄올과 증류수를 각각 가하여 교반 추출기(VS-8480, Vision Scientific Co., Ltd., Seoul, Korea)로 25°C에서 24시간 동안 200 rpm으로 추출하여 여과지(Whatman No. 3, Buckinghamshire, UK)로 여과한 다음, 회전진공농축기(EYELA CCA-1110, Tokyo, Japan)를 이용하여 용매를 제거한 후 1차 추출물로 사용하였다. 제조된 각각의 에탄올, 열수 추출물은 증류수를 이용하여 50 mL로 정용한 후 실험에 사용하였다

2차 추출물: 대추에 존재하는 당을 제거하기 위하여 보은대추 20 g에 3.5배의 증류수를 가하여 교반 추출기(VS-

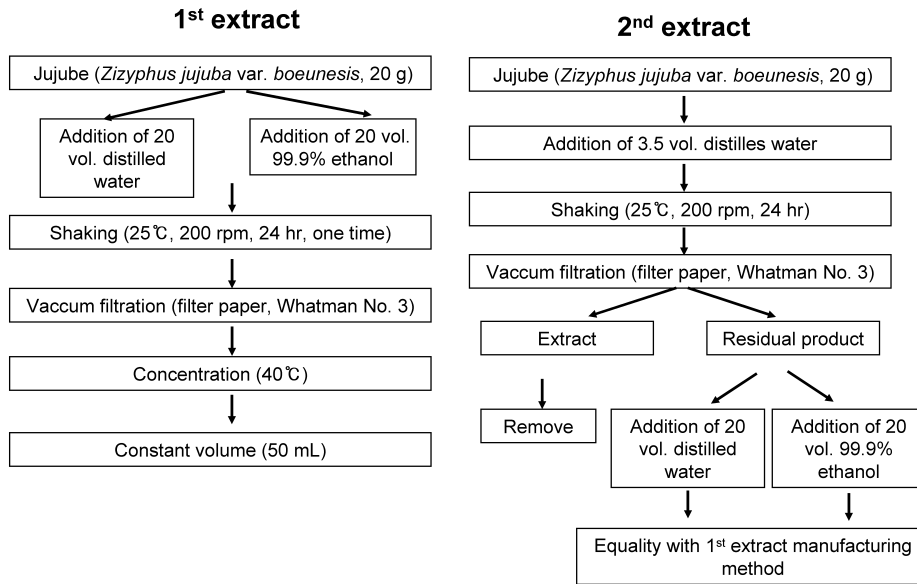


Fig. 1. Procedure for the extraction of jujube.

8480, Vision Scientific Co.)로 25°C에서 24시간 동안 200 rpm으로 추출하였다. 여과지(Whatman No. 3)로 여과한 다음 용매를 제거하였으며 남은 고형분에 20배의 에탄올과 증류수를 각각 가하여 1차 추출물 제조 방법과 동일하게 추출하였다. 추출물을 여과한 다음 회전진공농축기(EYELA CCA-1110)를 이용하여 용매를 제거한 후 2차 추출물로 사용하였다. 제조된 각각의 에탄올, 열수 추출물은 증류수를 이용하여 50 mL로 정용하여 실험에 사용하였다.

대추 추출물의 당 분석

TLC(thin layer chromatography): Silica gel TLC plate(20×10 cm, Whatman) 하단에서부터 1.5 cm 위에 standard(1%의 fructose, glucose, galactose, sucrose, maltose)와 대추 1차, 2차 추출물을 각각 1 µL씩 찍어 acetonitrile : water(85:15-v/v) 전개용매에서 3회 전개시킨 후 발색시약(0.5% α-naphthal, 5% H₂SO₄ in EtOH solution)을 이용해 발색시켜 추출물 중의 당을 정성 분석하였다.

HPLC(high performance liquid chromatography): 본 실험에 사용된 시료의 전처리는 추출물 중 단백질을 변성시켜 침전시키기 위해 10분간 끓인 후 얼음으로 냉각, 13000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였으며 0.45 µm filter로 여과, Sep-pak(Sep-Pak® Vac 3 cc C18 Cartridges, Waters, Dublin, Ireland)을 이용하여 추출물의 색소를 제거한 후 HPLC 주입시료로 사용하였다. HPLC는 영린기기 Acme 9000(Acme 9000 HPLC, Young Lin Instrument Co., Anyang, Korea)이며, 칼럼은 NH2P-50 4E(Asahipak NH2P-50 4E, 5 µm, 4.6×250 mm, Shodex, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 이동상은 acetonitrile : water=73:27(v/v%), 유속은 1 mL/min, 검출기는 Refractive Index(RI, Acme 9000, Young Lin Instrument Co.)를 사용하였으며 표준용액으로 검량곡선을 작성하여 추출물 중의 개별 당 함량을 정량하였다(26).

대추 추출물의 항균활성

항균활성 검색은 Agar diffusion test(27)를 응용하였다. 10^{4.5} CFU/mL로 배양된 시험 균주들을 각각의 멸균된 RCM(Difco), MRS(Difco) agar 배지에 2% 접종한 후 petri dish에 pouring하여 배지를 조성하였다. Paper disc(ADVANTEC 8 mm, TOYO ROSHI Kashia Ltd., Tokyo, Japan)를 배지 위에 떨어지지 않도록 부착시킨 다음, 대추 추출물(원하고자 하는 추출물의 농도를 얻고 무게 오차를 줄이기 위하여 질소농축 및 감압농축 후 30% DMSO에 녹임(고형분 함량이 50 mg/mL))을 30 µL씩 주입하여 혐기배양장치(일반 중력 대류 배양기 혐기성 배양장치 MART Microbiology, ANOXOMAT WS80, Lichtenvoorde, Netherlands)에 넣고 37°C에서 24~48시간 배양한 후 생육 저해 환 생성유무를 확인하였다. 추출물을 녹인 용매에 의한 영향을 알아보기 위하여 대조군으로 시험 균주에 대해 안정한 물질이면서 추출물의 용질을 용해할 수 있는 30% DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

대추 추출물이 유익균의 생육에 미치는 영향

인체 장내 유익균의 생육곡선은 *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus* 4종에 대하여 시험하였다. 멸균된 42.5 mL의 MRS broth에 시험균액(멸균식염수로 균 현탁액을 만들어 균 농도를 660 nm에서 optical density 값을 0.4가 되게 한 시험균액) 2.5 mL를 접종한 후 대추 1, 2차 추출물(원하고자 하는 추출물의 농도를 얻고 무게 오차를 줄이기 위하여 질소농축 및 감압농축 후 30% DMSO에 녹임(고형분 함량이 50 mg/mL))을 각각 5 mL씩 가하여 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. 균의 증식 정도는 spectrophotometer(UV-1650PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 660 nm에서 초기 24시간까지는 4시간, 이후에

는 24시간 간격(0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72시간)으로 3일간 O.D.값을 측정하면서 관찰하였다. 대추균으로는 추출물 대신 추출물을 녹인 5 mL의 30% DMSO를 가하여 동일하게 측정하였다.

대추 추출물의 기능성 분석

총 폴리페놀 함량: 총 폴리페놀 함량은 Dewanto 등(28)의 방법에 따라 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다. 대추 추출물 100 μ L에 2% Na_2CO_3 용액 2 mL를 가한 후 3분간 방치한 다음 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 μ L를 가한 후 30분 반응시켜 반응액의 흡광도 값을 750 nm에서 측정하였다. 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(OH)기를 가지며 다양한 생리활성을 가지는 대표적인 폴리페놀계 물질인 gallic acid (Sigma Chemical Co.)를 표준물질로 사용하여 검량선을 작성하였으며, 총 폴리페놀 함량은 시료 100 g 중의 mg gallic acid로 나타내었다. 모든 실험은 3회 반복 실험하였으며 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다($p=0.05$).

총 플라보노이드 함량: 총 플라보노이드 함량은 Dewanto 등(28)과 Choi 등(29)의 방법을 변형하여 측정하였다. 대추 추출물 250 μ L에 증류수 1 mL와 5% NaNO_2 75 μ L를 가하여 5분 반응 후 10% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 150 μ L를 가하여 6분 방치한 다음 1 N NaOH 500 μ L를 가해 11분 반응시킨 후 반응액의 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였다. 표준물질로 (+)-catechin hydrate(Sigma Chemical Co.)를 사용하였고 검량선을 작성하였다. 모든 실험은 3회 반복 실험하였으며 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다($p=0.05$).

DPPH(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)에 의한 전자공여능 측정: 대추 1, 2차 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위하여 전자공여능(electron donating ability, EDA(%))은 Blois의 방법(30)을 변형하여 측정하였다. 2×10^{-4} M DPPH (0.2 mM DPPH)(Sigma chemical Co.) 용액(0.00788 g을 99.9% ethanol 100 mL에 용해) 0.8 mL에 대추 추출물 0.2 mL를 첨가하여 실온에서 30분간 방치 후, 520 nm에서 흡광도의 감소치를 측정하였다. 흡광도를 측정할 때 셀에 분주되는 각 시료에 의한 흡광도의 차이는 ethanol만의 흡광도를 측정하여 보정하였으며 이때 전자공여능은 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{EDA} (\%) = \frac{B-A}{B} \times 100$$

A: 추출물을 넣었을 때의 흡광도 값

B: 추출물 대신 동량의 에탄올을 첨가했을 때의 흡광도 값 또한 추출물의 농도를 3구간으로 구배하여 흡광도를 측정 한 후 추출물의 EDA(%) 값을 50% 감소시키는 IC_{50} (inhibition concentration)을 구하여 각 추출물의 수율에 대한 농도로 표현하였으며, 이를 2회 반복 실험하였으며 Duncan's

multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다($p=0.05$).

ABTS⁺ decolorization assay에 의한 총 항산화력: 대추 1, 2차 추출물의 항산화 활성은 Dewanto 등(28)의 ABTS⁺ decolorization assay 방법에 의하여 측정하였다. 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS, Sigma Chemical Co.) 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 1:1로 혼합한 후 하루 동안 암소에서 방치하여 ABTS⁺을 형성시킨 후 이 용액을 735 nm에서 O.D.값이 1.4 ~ 1.5가 되도록 물 흡광계수($\epsilon=3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS⁺ 용액 1 mL에 추출액 50 μ L를 가하여 정확히 60분 후에 흡광도 변화를 측정하였으며, 표준물질로서 L-ascorbic acid를 동량 첨가하였다. 총 항산화력은 아래의 식으로 계산하였으며, 2회 반복 실험하여 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다($p=0.05$).

$$\text{AEAC} (\text{mg AA eq}) = \frac{\Delta A}{\Delta A_{\text{std}}} \times C_{\text{std}} \times V \times \frac{100}{W}$$

ΔA : 추출물을 넣었을 때의 O.D.의 변화

ΔA_{std} : AA std. soln.이 추출물 대신 동량 들어갔을 때의 O.D. 변화

C_{std} : AA std. soln.의 농도 (mg/mL)

V : 추출물의 정용부피 (mL)

W : sample homogenate의 weight (g)

결과 및 고찰

TLC를 이용한 대추 추출물의 당 분석

Standard는 Sigma사의 표준품 fructose, glucose, galactose, sucrose, maltose를 mix하여 1%로 제조하였고, 농도가 0.4 g/mL인 대추 1차 및 2차 에탄올·열수 추출물을 각각 5배, 10배 희석하여 1 μ L씩 spotting 한 결과, 대추 추출물의 당 조성은 fructose, glucose, sucrose인 것을 알 수 있었다.

Seok(31)은 중국산 흑대추의 경우 전체 유리당의 60%가 sucrose, 40%는 glucose와 fructose, 적대추의 경우 sucrose 20%, glucose와 fructose는 80%라고 하였고, Tomada 등(32)은 일본산 대추의 경우는 glucose와 fructose만 존재한다고 보고하였다. Baek 등(33)은 한국산 대추에는 glucose와 fructose만 존재하고 Yook(34)은 보은대추에는 glucose, fructose, galactose, sucrose가 존재한다고 하였지만 본 실험에서는 Yook(34)의 보고와는 달리 galactose가 검출되지 않았다.

또한 1차 추출물에 비해 2차 추출물 spot의 발색정도가 감소한 것을 통해 추출방법에 따라 장내 유익균의 증식인자로서 대추 추출물에 존재하는 당 함량이 다르다는 것을 확인하였다(Fig. 2).

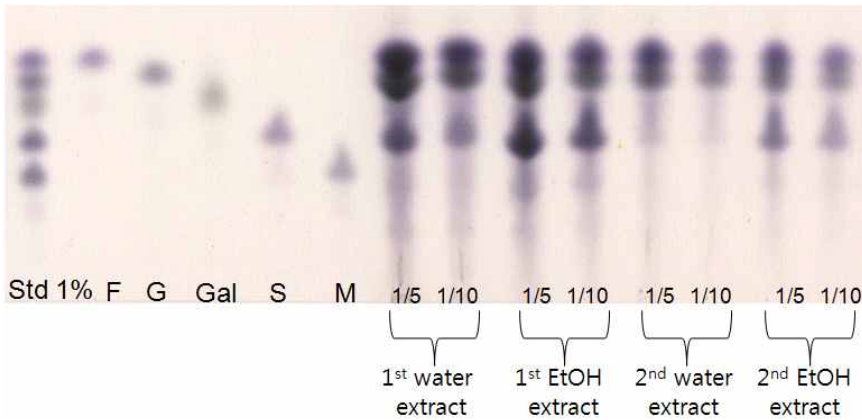


Fig. 2. TLC of sugar in jujube extracts. Solvent: acetonitrile : water (85:15-v/v), F: fructose, G: glucose, Gal: galactose, S: sucrose, M: maltose.

HPLC를 이용한 대추 추출물의 당 분석

TLC 분석을 통해 대추 추출물에는 대표적인 유리당 fructose, glucose, galactose, sucrose, maltose 중 fructose, glucose, sucrose가 존재하는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 대추 추출물의 주요 개별 당인 fructose, glucose, sucrose의 표준 용액 검량선을 분석하였다(Fig. 3). 각 개별 당별로 검량선 분석 결과, sucrose 검량선의 R값이 0.9997, fructose 검량선의 R값이 0.9993, glucose 검량선의 R값이 0.999로 직선성을 보여주었다. 대추 추출물의 개별 당 함량을 3반복 실험하여 분석한 결과, fructose, glucose, sucrose가 각각 1차 에탄올 추출물에서 124.71 mg/g, 145.13 mg/g, 116.05 mg/g, 1차 열수 추출물에서는 197.12 mg/g, 254.75 mg/g, 52.77 mg/g의 함량을 보였다. 2차 에탄올 추출물에서는

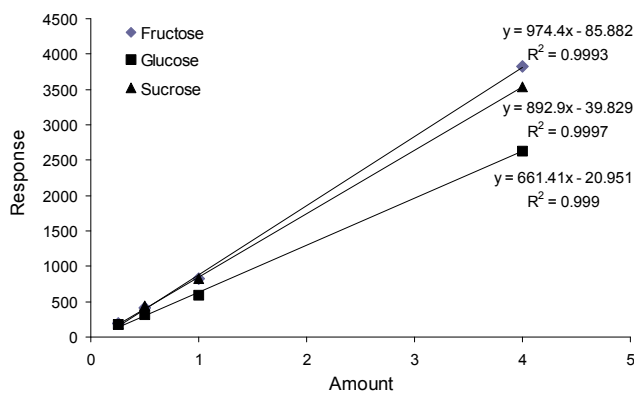


Fig. 3. Calibration curve of sugar standards.

fructose, glucose, sucrose가 46.45 mg/g, 55.16 mg/g, 19.27 mg/g, 2차 열수 추출물에서는 61.72 mg/g, 65.37 mg/g, 6.05 mg/g로 1차 추출물에 비해 에탄올 추출물에서 fructose, glucose, sucrose가 63%, 62%, 83% 감소하였으며, 열수 추출물에서는 69%, 74%, 89% 감소하였다(Table 1). 이는 당이 수용성이기 때문에 물로 추출하였을 경우 검출되는 당의 함량이 에탄올 추출물보다 더 높게 나온다는 Ann 등(35)의 보고와 일치하였다. 하지만, Ann 등(35)은 씨를 제거한 무수 건조 대추의 당 함량 경우, sucrose 25%, fructose 21.2%, glucose 20.7%로 본 결과와는 큰 차이를 보였다. 이러한 결과의 차이는 품종, 추출 방법에 따라 당 함량의 차이가 많을 수 있음을 나타내고 있다.

한편, Kwon 등(26)은 감초 추출물 시료의 개별 당 분석 결과 각 개별 당 함량이 sucrose 11.69%, fructose 1.98%, glucose 1.32%, maltose 1.06%로 보고하였고 Morton(36)은 건조 대추 중 수용성 추출액의 당질 조성 분석 결과에서 대추는 주로 fructose, glucose, oligosaccharide로 구성되어 83.4~76.4%를 함유하고 있다고 보고하였다.

대추 추출물의 항균활성

대추 1, 2차 추출물을 각각 50 mg/mL의 농도로 하여 agar diffusion test로 항균활성을 검색한 결과, 장내유해균인 *Cl. difficile*, *Cl. perfringens*, *Eu. limosum*, *B. fragilis*와 장내유익균인 *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*에서 모두 억제환이 생성되지 않아 항균 활성을 나타내지 않았다.

Table 1. Sugar contents in jujube extracts

Sample	Sugar ¹⁾ (mg/g)			Reduction rate ²⁾ (%)		
	Fructose	Glucose	Sucrose	Fructose	Glucose	Sucrose
First extract	Water	197.12±9.61 ^a	254.75±13.25 ^a	52.77±8.63 ^b	—	—
	EtOH	124.71±20.39 ^b	145.13±16.18 ^b	116.05±27.06 ^a	—	—
Second extract	Water	61.72±31.41 ^c	65.37±24.85 ^c	6.05±0.42 ^c	62.76	61.99
	EtOH	46.45±21.45 ^c	55.16±28.66 ^c	19.27±8.78 ^c	68.69	74.34

¹⁾Values are the mean±standard deviation of triplicate experiments. Means with different letters in same column are significantly different from the others at p<0.05.

²⁾Reduction rate (%)=(contents of first extracts-contents of second extracts/contents of first extracts)×100.

장내 유익균의 생육에 미치는 영향

Agar diffusion test를 통한 항균효과에서 장내유해균들에 대해 항균활성을 나타내지는 않았지만 추출물 중에 존재하는 당이 장내 유익균의 생육에는 영향이 있을 것으로 판단하여 증진 효과를 분석하였다.

대추 1차 추출물에서 *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *B. adolescentis*, *B. bifidum* 모두 대추 추출물 대신 추출물을 녹인 30% DMSO를 첨가한 대조군과 비교하였을 때, 에탄올 추출물에서 각각의 균주들은 대조군과 대수기에 도달하는 시간이 비슷하였고 대조군보다 낮거나 비슷한 흡광도 값을 나타내어 생육에 별다른 영향을 미치지 않았다.

하지만 열수 추출물에서 *B. bifidum*, *B. adolescentis*가 다른 시험균주들과 비교해보았을 때 대조군에 비하여 대수기에 도달했을 때의 흡광도 값이 크게 나타나 생육이 증진되는 결과를 나타내었다(Fig. 4).

2차 추출물에서 열수 추출물은 대조군, 에탄올 추출물과 비교하였을 때 탁도가 높아 초기 흡광도 값이 컸지만, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *B. adolescentis*, *B. bifidum* 모두 대수기에 도달하였을 때 흡광도 값이 대조군, 에탄올 추출물, 열수 추출물 모두 비슷한 값을 나타내어 대추 2차 추출물은 장내 유익균의 생육에 별다른 영향을 미치지 않았다.

대추 1차 추출물에서 *B. bifidum*, *B. adolescentis*가 2차 추출물에 비하여 높은 흡광도를 나타내어 생육이 증진된 결과를 통해 fructose, glucose, sucrose 등과 같은 유리당의

함량이 높을수록 유산균에 의한 발효가 촉진된다고 보고한 Oh 등(37)의 연구와 일치하는 것을 확인할 수 있었고, 이는 대추 추출물에 존재하는 당이 prebiotics로 작용하여 증진효과가 나타난 것으로 판단된다.

한편 Jung과 Noh(21)는 70% ethanol로 추출한 대추 추출물을 첨가한 배지에 3종의 유산균 *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *B. longum*을 각각 접종해 O.D.값을 측정한 결과, 농도 의존적으로 유산균의 성장을 촉진시켰다고 보고하고 있어 추출용매, 추출방법에 따라 결과의 차이가 있을 수 있다는 것을 알 수 있었다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

대추의 추출방법에 따른 유익균의 생육 증진 성분으로 당 이외에 기능성 성분과의 상관관계를 알아보기 위하여 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 알아본 결과가 Table 2와 같다. 대추 추출물의 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 사용하여 검량선을 작성하였으며, 총 플라보노이드 함량은 (+)-catechin hydrate를 표준물질로 사용하여 검량선을 작성하였다.

총 폴리페놀 함량은 1차 열수 추출물에서 11.63 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었고, 1차 에탄올 추출물 10.41 mg/g, 2차 열수 추출물 4.37 mg/g, 2차 에탄올 추출물 3.77 mg/g의 폴리페놀 함량을 나타내었다. Min과 Lee(38)는 제천산 약용식물 추출물의 항산화 특성 실험에서 독활 열수

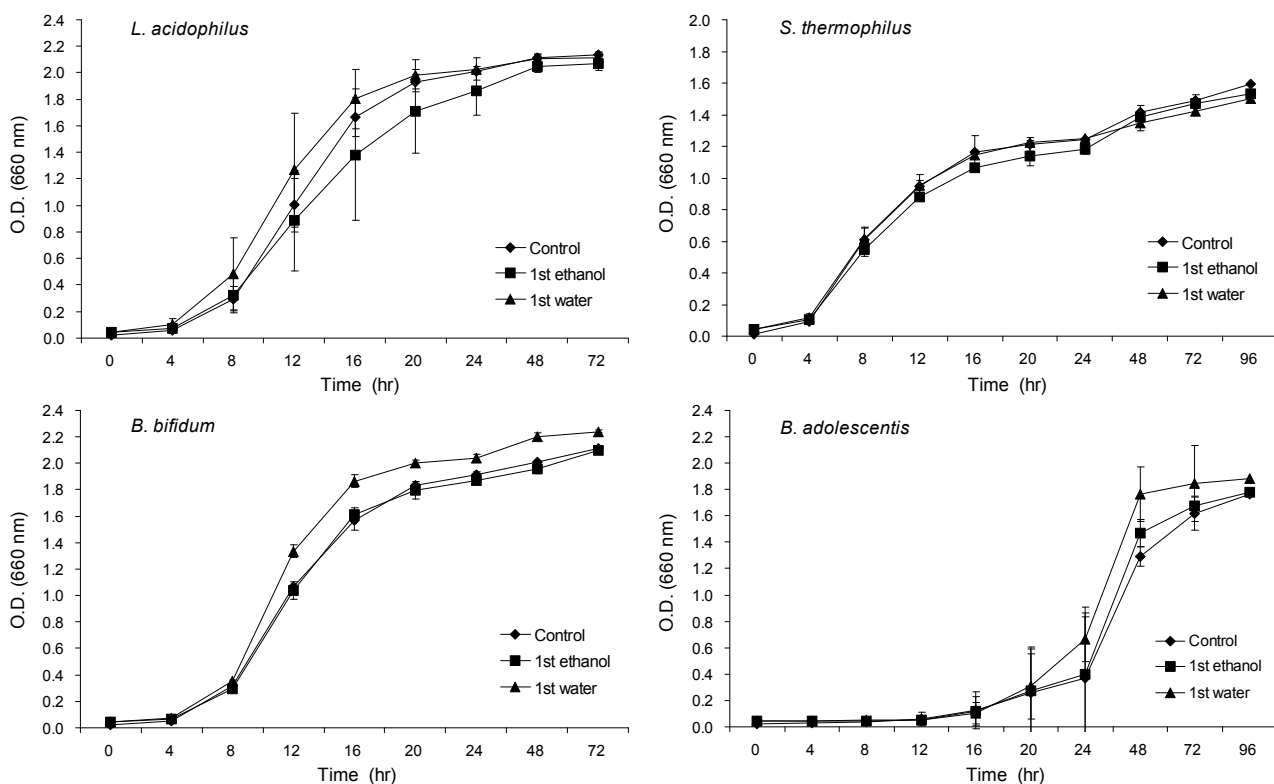


Fig. 4. Effects of 1st jujube extracts on the growth of *L. acidophilus* KCTC 3164, *S. thermophilus* KCTC 3658, *B. bifidum* KCTC 3472 and *B. adolescentis*.

Table 2. Concentration of total polyphenol compound and flavonoid compound in jujube extracts

Sample		Total polyphenol compound ¹⁾ (mg/g)	Total flavonoid compound ²⁾ (µg/g)
First extracts	Water	11.63±0.78 ³⁾	247.45±0.46 ^a
	EtOH	10.41±1.32 ^a	76.39±19.85 ^b
Second extracts	Water	4.37±1.52 ^b	83.90±9.23 ^b
	EtOH	3.77±0.96 ^b	45.70±30.01 ^b

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

²⁾Milligrams of total flavonoid content/g of plants based on (+)-catechin hydrate as standard.

³⁾Values are the mean±standard deviation of triplicate experiments. Means with different letters in same column are significantly different from the others at p<0.05.

추출물의 폴리페놀 함량이 37.92 mg/g, 오가피 열수 추출물 29.23 mg/g, 독활 에탄올 추출물 29.23 mg/g, 오가피 에탄올 추출물 22.86 mg/g으로 보고하고 있으며, 이는 에탄올 추출물보다 열수 추출물의 폴리페놀 함량이 더 많게 나타난 본 실험과 일치하는 양상을 보였다. 또한 Ju 등(39)은 추출방법에 따른 대나무 추출물의 폴리페놀 실험에서 물 추출액이 에탄올 추출액보다 폴리페놀 함량이 많다고 보고하였다.

대추 추출물의 총 플라보노이드 함량은 폴리페놀 함량과 마찬가지로 1차 열수 추출물에서 247.45 µg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며 1차 에탄올 추출물 76.39 µg/g, 2차 열수 추출물 83.90 µg/g, 2차 에탄올 추출물 45.70 µg/g의 플라보노이드 함량을 나타내어, 20여종의 약용식물 물 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정된 Kim 등(40)의 연구에서와 마찬가지로 폴리페놀 함량이 플라보노이드 함량보다 많게 나타났다.

따라서 다양한 기능성을 가지는 폴리페놀과 페놀 화합물 중에서 자연적으로 생성되는 가장 큰 그룹의 하나인 플라보노이드를 다른 추출물에 비해 많은 양을 함유하고 있는 대추 1차 열수 추출물은 *B. bifidum*과 *B. adolescentis*의 생육을 증진시킬 뿐만 아니라 항산화 활성 및 생리기능이 우수할 것으로 생각된다. 하지만 항산화 특성에 관여하는 성분에는 폴리페놀이나 플라보노이드 이외에도 많은 유효성분이 관여할 것으로 판단되어 실험이 지속되어야 할 것으로 생각된다.

DPPH 및 ABTS free radical 소거활성

대추 추출물의 radical 소거활성 결과의 타당성을 높이기 위해 DPPH와 ABTS를 이용한 두 가지의 측정법을 사용하여 대추 1, 2차 추출물의 항산화 활성을 검색하였다.

대조구로 천연항산화제인 ascorbic acid(95.92%, 0.05 mg/mL)를 사용하여 DPPH free radical 소거능에 의한 항산화 활성을 검색한 결과(Table 3), 대추 추출물의 농도가 높을수록 우수한 전자공여능을 나타내었으며, 대추 1차 열수 추출물의 경우 다른 추출물에 비해 가장 높은 85.60%의 전자공여능을 보여 천연 항산화제인 ascorbic acid에 견줄 수 있는 기능성이 있음을 확인하였다. 0.05 mg/mL 농도에서 대추

Table 3. EDAs and IC₅₀ of jujube extracts

Sample		Electron donating ability (%)		IC ₅₀ (mg/mL)
		0.05 mg/mL	0.01 mg/mL	
First extracts	Water	85.60±5.82 ^{a1)}	24.68±0.35 ^a	0.024±0.002 ^b
	EtOH	48.66±1.89 ^b	11.18±0.34 ^b	0.051±0.002 ^b
Second extracts	Water	37.43±3.19 ^d	8.05±0.01 ^d	0.068±0.006 ^b
	EtOH	12.36±1.53 ^c	4.19±0.66 ^c	0.243±0.060 ^a
Ascorbic acid		95.92	19.74	0.022±0.005

¹⁾Values are the mean±standard deviation of duplicate experiments. Means with different letters in same column are significantly different from the others at p<0.05.

Table 4. AEAC of jujube extracts

Sample	AEAC (mg AA eq/g)	
First extracts	Water	679.91±33.35 ^{a1)}
	EtOH	343.18±1.14 ^b
Second extracts	Water	327.30±31.70 ^b
	EtOH	176.65±15.22 ^c

¹⁾Values are the mean±standard deviation of duplicate experiments. Means with different letters in same column are significantly different from the others at p<0.05.

1차 에탄올 추출물은 48.66%, 대추 2차 열수 추출물은 37.43%, 대추 2차 에탄올 추출물은 12.36%의 전자공여능을 보여주었다. 또한 IC₅₀ 값의 경우도 대추 1차 열수 추출물이 0.03 mg/mL, 1차 에탄올 추출물 0.05 mg/mL, 2차 열수 추출물 0.07 mg/mL, 2차 에탄올 추출물이 0.24 mg/mL로 대추 1차 열수 추출물이 다른 추출물에 비해 가장 좋은 항산화 활성을 보여주었다. 본 실험의 결과를 통해 대추 1차 열수 추출물은 한약재 추출물의 폴리페놀 화합물과 항산화 활성을 연구한 Park(41)의 연구와 비교해 보았을 때 국화 물 추출물의 전자공여능이 63.0%, 당귀 49.6%, 작약 49.6%를 보인 결과보다 높은 경향을 나타내었다.

표준물질로 수용성인 ascorbic acid를 사용하여 항산화력을 AEAC값으로 산출한 결과는 Table 4에 나타내었다. 대추 1차 열수 추출물이 679.91 mg AA eq/g로 가장 높은 항산화력을 가지고 있었으며, 1차 에탄올 추출물은 343.18 mg AA eq/g, 2차 열수 추출물은 327.30 mg AA eq/g, 2차 에탄올 추출물은 176.65 mg AA eq/g의 항산화력을 가지고 있었다.

ABTS radical 소거활성이 DPPH보다 더 높게 나타났는데 이는 ABTS 방법이 DPPH 방법보다 수소공여항산화제(hydrogen-donating antioxidant)와 연쇄절단형 항산화제(chain-breaking antioxidant) 모두를 측정할 수 있고, 수용상(aqueous phase)과 유기상(organic phase) 모두에 적용이 가능한 장점이 있기 때문에 ABTS radical 소거활성이 더 sensitive하게 나타난 것으로 판단된다는 Re 등(42)의 연구와 일치하였다.

요 약

본 연구에서는 대추 추출물과 장내 유익균의 생육을 조절

하여 장내 부패를 방지하기 위한 probiotics로서 유산균을 조합하기 위하여 대추 추출물이 장내 유익균 중에서도 유산균의 생육에 미치는 영향을 *in vitro* 상에서 알아보고자 하였다. 또한 증식인자로서 대추 추출물에 존재하는 당이 유산균의 생육에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 추출 방법을 달리하여 당 함량이 다른 대추 1차 및 2차 열수, 에탄올 추출물을 각각 제조하였다. 이와 더불어 지역 특산물인 보은대추를 기능성식품 소재로 활용하기 위하여 페놀성 화합물과 항산화성을 검색하여 기능성식품으로 상품화하기 위한 기본 자료를 확보하고자 하였다. TLC와 HPLC 분석을 통해 장내 유익균의 증식인자로 작용할 수 있는 대추 추출물의 당 조성은 fructose, glucose, sucrose인 것을 확인하였고, 1차 추출물에 비하여 2차 열수 추출물은 fructose, glucose, sucrose가 각각 69, 74, 89% 감소하였으며 2차 에탄올 추출물은 63, 62, 83% 감소한 것을 확인할 수 있었다. 인체 장내세균에 대하여 대추 추출물을 50 mg/mL 농도로 하여 생육증진 효과를 분석한 결과, 대추 1차 열수 추출물에서 *B. bifidum*과 *B. adolescentis*가 다른 시험균주들에 비하여 대조군과 대수기에 도달하는 시간은 비슷하였지만, 대조군보다 높은 흡광도 값을 나타내어 생육을 증진시키는 결과를 보였다. 이는 대추 추출물에 존재하는 당이 prebiotics로 작용하여 *Bifidobacterium* 속의 생육을 증진시킨 것으로 사료되며 인체 장내 균총 조성을 바람직한 방향으로 개선시켜 장내 기능을 향상시킬 것으로 기대된다. 또한 당이 아닌 다른 기능성 성분에 의해 생육이 증진되는지를 알아보기 위해 기능성 물질인 페놀류의 함량과 항산화성을 분석하였다. 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과, 대추 1차 열수 추출물에서 각각 11.63 mg/g, 247.45 µg/g으로 다른 추출물에 비해 높은 함량을 보여 주었다. DPPH에 의한 라디칼 소거능을 살펴본 결과, 대추 추출물의 농도가 높을수록 우수한 전자공여능을 나타내었으며 대추 1차 열수 추출물의 경우 다른 추출물에 비해 가장 높은 85.60%의 전자공여능을 보여 천연 항산화제인 ascorbic acid에 견줄 수 있는 기능성이 있음을 확인하였다. ABTS free 라디칼 소거활성을 통해서도 대추 1차 열수 추출물은 679.91 mg AA eq/g의 항산화력을 지니고 있어 다른 추출물에 비해 가장 좋은 항산화 활성을 나타내었다. 따라서 대추 1차 열수 추출물에는 당뿐만 아니라 항산화능, 폴리페놀, 플라보노이드 함량도 높아 *B. bifidum*과 *B. adolescentis*의 생육이 증진된 것으로 사료되며, 기능성 식품소재로 생리활성 성분을 함유하고 있는 대추 추출물에 *Bifidobacterium* 속을 이용하여 유산발효를 진행함으로써 기능성 발효 음료 개발 및 이유식과 같은 다양한 식품 개발에 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부의 보은대추산업육성사업의 연

구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- Ann YS. 2009. *The encyclopedia of Korea crop land-race*. Yiyu Publishing Co., Seoul, Korea. p 815-819.
- Huh BG, Park SG. 2008. *When being anxious, our tree picture books which seeks rightly*. Joongang Life Publishing Co., Seoul, Korea. p 87.
- Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. 2006. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *intermis* Rehder. *Korean J Food Sci Technol* 38: 128-134.
- Cummings JH, Macfarlane GT. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 70: 443-459.
- Mitsuoka T. 1990. *A color atlas of anaerobic bacteria*. Shobunsha, Tokyo, Japan. p 51.
- Lee HS, Sang JJ, Lee SD, Moon JY, Kim AJ, Ryu KS. 2001. Effect of dietary mulberry leaf on the composition of intestinal microflora in SD rats. *Korean J Food Sci Technol* 33: 252-255.
- Smith LDS. 1979. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. *Reviews of Infectious Disease* 1: 254-262.
- Bartlett JG. 2002. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 346: 334-339.
- FAO/WHO. 2001. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ont., Canada.
- Oh SJ. 2008. Probiotics and prolongation of life. *Korean J Dairy Sci Technol* 26: 31-37.
- Ku KH, Park DJ, Mok CK. 1997. Effect of yeast fermentation on the production of soy-oil-galactosaccharides from bean cooking water. *Korean J Food Sci Technol* 29: 133-137.
- Choi JB, Shin YW, Paek NS, Kim YM. 2004. Influence of herbal extract on lactic acid bacteria growth and cytoprotectants. *Korean J Food & Nutr* 17: 286-293.
- Hong JY, Nam HS, Shin SR. 2010. Changes on the antioxidant activities of extracts from the *Zizyphus jujube* miller fruits during maturation. *Korean J Food Preserv* 17: 712-719.
- Kim HK, Joo KJ. 2005. Antioxidative capacity and total phenolic compounds of methanol extract from *Zizyphus jujuba*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 750-754.
- Lee YG, Cho SY. 1995. Effect of jujube methanol extract on benzo(a)pyrene induced hepatotoxicity. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 127-132.
- Rhee YK, Kim DH, Han MJ. 1998. Inhibitory effect of *Zizyphi fructus* on β -glucuronidase and tryptophanase of human intestinal bacteria. *Korean J Food Sci Technol* 30: 199-205.
- Han BH, Park MH. 1987. Sedative activity and its active components of *Zizyphi fructus*. *Arch Pharm Res* 10: 208-211.
- Oh MH, Kim KY. 2010. Effect of *Artemisia capillaris* extracts on intestinal microflora *in vitro* and *in vivo*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1587-1594.
- Ra BH, Lee WJ, Cho YW, Kim KY. 2009. Effect of cactus extracts on human intestinal microflora. *J Agric Life Sci* 43: 45-54.
- Park JY, Jang JY, Lee MK, Park EM, Kim MJ, Son DH, Chung HC, Cho SY. 2002. Effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) extracts on the intestinal microorganisms of

- streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 1112-1118.
21. Jung SW, Noh WS. 2006. The effect of jujube extract on the growth of lactic acid bacteria. *J East Asian Soc Dietary Life* 16: 349-356.
 22. Min YK, Lee MK, Jeong HS. 1997. Fermentation characteristics of jujube alcoholic beverage from different additional level of jujube fruit. *Agric Chem Biotechnol* 40: 433-437.
 23. Park OJ, Kim NY, Ham MJ. 2003. The effect of jujubi, ginseng and garlic on the TBA value and microbial count of samgaetang during refrigerated storage. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 19: 591-595.
 24. Jung DS, Lee YK, Lim KW. 2000. Characteristics of fermented fruit and vegetable mixed broth using by bacteriocin producing lactic acid bacteria and yeast. *Korean J Food Sci Technol* 32: 1358-1364.
 25. Mitsuoka T. 1980. *A color Atlas of anaerobic bacteria*. Chongmoon Publishing Co., Tokyo, Japan. p 69-89.
 26. Kwon YJ, Jang GC, Rah HH, Kim YH, Rhee MS. 2005. The study of sugar analysis in licorice extract by HPLC. *J Korean Soc Tobacco Sci* 27: 114-119.
 27. Moon YG, Her MS. 2007. Screening of antioxidative and antibacterial activity from methanol extracts of indigenous plants Jeju-island. *Korean J Biotechnol Bileng* 22: 78-83.
 28. Dewanto V, Xianzhong W, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 4959-4964.
 29. Choi Y, Kim M, Shin JJ, Park JM, Lee J. 2003. The antioxidant activities of the some chemical test. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 723-727.
 30. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1203.
 31. Seok JJ. 1983. Sugar components of dry fruits. *Japan J Food & Nutr* 36: 53-55.
 32. Tomada M, Asakura H, Iida A. 1969. Water-soluble carbohydrates of *Zizyphi fructus*. *Chem Pharm Bull* 26: 1798-1802.
 33. Baek KW, Lee SY, Han DS, Kim JJ. 1969. Studies on components of the jujube in Korea. *J Kangwon National University* 3: 21-24.
 34. Yook CS. 1972. Screening test on the components of the genus *Zizyphus* in Korea. *Kor J Pharmacog* 3: 27-29.
 35. Ann YG, Kim SK, Shin CS. 1997. Sugars in Korea jujube fruit and jujube fruit drink. *Korean J Food & Nutr* 10: 314-319.
 36. Morton J. 1987. Indian jujube. In *Fruits of Warm Climates*. Julia F, ed. Morton, Miami, FL, USA. p 272-275.
 37. Oh SL, Kim SS, Min BY, Chung DH. 1990. Composition of free sugars, free amino acids, non-volatile organic acids and tannins in the extracts of *L. chinensis* M, *A. acutiloba* K., *B. Chinensis* and *A. sessiliflorum* S. *Korean J Food Sci Technol* 22: 76-81.
 38. Min SH, Lee BR. 2007. Antioxidant activity of medicinal plant extracts cultivated in Jecheon. *Korean J Food Culture* 22: 336-341.
 39. Ju Io, Jung GT, Ryu J, Choi JS, Choi YG. 2005. Chemical components and physiological activities of bamboo (*Phyllostachys bambusoides* starf) extracts prepared with different methods. *Korean J Food Sci Technol* 37: 542-548.
 40. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 333-338.
 41. Park YS. 2002. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of medicinal herb extracts. *J East Asian Soc Dietary Life* 12: 23-31.
 42. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.

(2011년 1월 13일 접수; 2011년 3월 15일 채택)