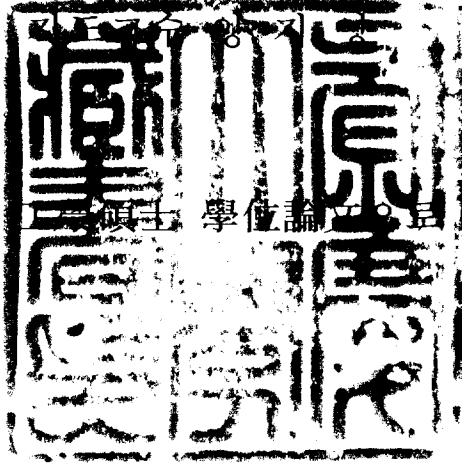


공학석사 학위논문

산죽잎(*Sasa borealis*(Hack.) Mak.)

에탄올 추출물의 항산화 활성

이 論文을 學位論文으로 提出함



2005년 8월

부경대학교 산업대학원

식품산업공학과

강 용 모

강용모의 공학석사 학위논문을 인준함

2005년 6월 17일

주 심 공 학 박 사 전 병 수



위 원 수 산 학 박 사 조 영 제



위 원 농 학 박 사 양 지 영



목 차

Abstract	1
----------------	---

서 론	3
-----------	---

재료 및 방법	8
---------------	---

1. 실험 재료	8
2. 일반 성분 분석	8
3. 시료의 추출 및 용매 분획 제조	8
4. DPPH radical 소거능	9
5. SOD 유사 활성	11
6. Hydrogen peroxide 소거능	11
7. Linoleic acid 자동산화 억제능	12
8. 산죽잎 추출물의 pH 안정성 측정	12
9. 산죽잎 추출물의 열 안정성 측정	13
10. 통계 처리	13

결과 및 고찰	14
---------------	----

1. 일반성분 분석	14
------------------	----

2. 추출용매의 선정	14
3. 산죽잎 추출물의 전자공여능	17
4. 산죽잎 추출물의 SOD 유사 활성 효과	17
5. 산죽잎 추출물의 Hydrogen peroxide 소거 효과	23
6. 산죽잎 추출물의 Linoleic acid 자동산화 억제효과	23
7. 산죽잎 추출물의 안정성	27
7.1 pH 안정성	27
7.2 열 안정성	27
 요 약	 31
 참고문헌	 33
 감사의 글	 41

Antioxidative Activities of Ethanol Extracts
from Leaves of *Sanjook*
(*Sasa boreails*(Hack.)Mak.)

Young-Mo Kang

*Department of Food Industrial Engineering,
Graduate School of Industry,
Pukyong National University*

Abstract

This research was aimed to study a functionality of *sanjook*(*Sasa boreails*(Hack.) Nak) as antioxidant. Ethanol was proper in extraction of antioxidant from leaves of *sanjook*. The leaves of *sanjook* contains 4.08% of moisture, 3.95% of crude lipid, 2.33% of crude protein, 11% of ash and 78.64% of carbohydrates as its general composition. The results of free radical scavenging activity test with ethanol extacts of leaves of *sanjook*

has the highest radical scavenging activity of 93.3% among the tested solvents. It meanted that polarity of antioxidant from leaves of *sanjook* was likely to be polar.

The antioxidant activity of ethanol extracts of leaves of *sanjook* showed dose-response reaction within a concentration range from 0.1 to 0.8 mg/mL. IC₅₀ for DPPH radical scavenging ability, SOD -like activity and H₂O₂ scavenging ability of ethanol extracts of leaves of *sanjook* was 586 ug/mL, 800 ug/mL and 38 ug/mL, respectively. The antioxidant activity of ethanol extracts of leaves of *sanjook* via several tests was simliar to one of BHT. The antiautooxidation effect was 55~60% within the range from 0.1 to 0.8 mg/mL.

pH stability of ethanol extract of *sanjook* leaves showed it was the most stable at pH 6. The more acid or akali it became, the more unstable it turned. Temperature stability of ethanol extract of *sanjook* leaves remained 80% of antioxidant activity within range of 0°C and 100°C.

서 론

사람은 누구나 생활환경이 좋은 조건에서 살고 영양공급의 상태가 좋다고 할지라도 결국은 노화되어 죽음에 이르게 된다. 노화는 생물시계설과 같은 운명설, DNA설과 free radical에 기인한다는 설이 있으나, 과학이 발전하면서 free radical 이론이 점차 유력한 설로 인정되고 있다. 산소는 질량을 기준으로 볼 때 대기의 23%를 차지하는 성분으로 인체의 생명유지에 필요한 에너지를 만들기 위하여 끊임없이 산소를 필요로 하는데 생명체의 호흡과정에서 최종적으로 전자수용체 역할을 한다. 그러나 산화적 스트레스(oxidative stress)로 산화-환원반응이 깨어져 인체로 흡입된 산소의 일부는 정상적인 호흡과정과는 별도로 4전자환원과정(4-electron reduction process)을 거쳐 결국은 물이 되는데 전자를 하나씩 받음에 따라 산소에서 유래되는 superoxide anion radical, hydrogen peroxide, hydroxy radical 및 singlet oxygen 등의 활성 산소가 생성된다. 생체 내에서 산화와 관련된 현상으로 세포막에 존재하는 지질은 반응성이 큰 활성산소와 결합하여 과산화물을 만드는데 이들의 연속반응에 의하여 alcohol류, aldehyde류, ketone류 등을 생성함으로써 생체내의 DNA, RNA, 단백질, 지질 등과 반응하여 각종 염증, 암, 생체의 노화 등을 유발할 뿐만 아니라 세포막분해, 지방산화, 세포노화등 심각한 생리적 장애를 일으키고 결국은 생명체를 죽음에 이르게 하는 것으로 알려져

있다(Gardner & Fridorich, 1991). 즉, 산소는 호흡을 하는 생명체의 생명유지에 필수불가결한 물질이기도 하지만 한편으로는 산화를 촉진하여 생체의 노화와 죽음을 유발하는 양면성을 지니고 있다. 활성산소의 유해성에 대하여 생체에는 superoxide dismutase(SOD), catalase, 각종 peroxidase 등이 있어 각각의 활성산소종을 안정한 물질로 전환시켜 산소 장해에 대한 방어기능을 한다고 알려져 있다. 결국 활성산소의 유해성은 활성산소의 반응성과 생체방어체계의 불균형이 있을 때에 나타난다고 할 수 있다. 노약자나 환자를 비롯하여 인체의 방어체계가 약화된 경우에는 활성산소의 영향력은 상대적으로 더욱 커지게 되지만 체내에서 활성산소관련 효소류의 생합성을 증대시킬 수 있는 방법이 없기 때문에 인체의 대응능력에는 한계가 있다. 이런 문제의 해결을 위하여 체내에서 작용하는 항산화제의 섭취를 늘리는 것이다.

항산화제는 산화에 의해서 일어나는 식품의 냄새나 풍미의 변화, 유지의 산패, 그리고 식품의 변색을 방지하거나 지연시킬 수 있는 기능을 가진 화합물을 총칭하며 인공 합성품을 비롯하여 동식물체 내에서도 이러한 기능을 갖고 있는 물질이 많이 알려지고 있다. 대부분 천연 항산화제들은 식물체로서 나무, 줄기, 뿌리, 잎, 꽃 등의 식물체에 존재하며 이들은 주로 폴리페놀물질로 알려져 있다(Pratt *et al.*, 1992).

항산화제의 역할은 크게 금속이온의 착염화 기능, superoxide dismutase 활성과 superoxide dismutase 유사활

성 물질에 의한 free radical 포집력으로 radical 반응을 종결시키는 것으로 보고되고 있다(Babizhayev *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1994; Deckr *et al.*, 1992; Kohen *et al.*, 1988).

최근에는 식품 분야에서 효소는 아니지만, 활성산소의 반응성을 감소 또는 무력화할 수 있는 물질의 발굴과 이용에 관한 연구가 커다란 관심이 되고 있으며(Akaike *et al.*, 1995), 유지의 지방산화에서 알 수 있듯이 어느 산화방지제가 모든 종류의 유지류에 같은 산화방지 효과를 나타내지는 못하고 특정 물질이 생체의 산화 반응 또는 radical 반응 전반에 걸쳐 반응성을 억제하지는 못한다고 판단되어지며, 활성산소의 종류나 radical source에 따라 또한 반응기작에 따라 반응성을 억제할 수 있는 항산화 물질의 연구가 필요하다고 생각되어진다.

지금까지 활성산소와 free radical 생성을 방지하기 위해 사용되는 항산화제로는 α -tocopherol, BHT(butylated hydroxy toluene), BHA(butylated hydroxy anisole), PG(propyl gallate), TBHQ(tert-butyl hydroquinone), ascorbic acid 등이 알려져 있다(Dziezak, 1986). 그 중에서 합성 항산화제인 BHT와 BHA는 효과가 우수하고 저렴한 가격 때문에 널리 사용되어져 왔다. 그러나 변이원성 및 독성이 지적되어(Branen, 1975) 합성 항산화제의 사용량이 격감되고 천연 항산화제에 대한 관심이 더욱 커지고 있는 실정이다.

따라서 최근 안전성과 관능상 문제가 되지 않는 식품 유래의 천연 항산화제 개발을 위한 많은 연구가 시도되고 있으며 무화

과(Jeong *et al.*, 2002), 포도(Jang *et al.*, 2002), 꽃양배추(Lee *et al.*, 2001), 알로에(Woo *et al.*, 1995), 대두(Bae *et al.*, 1997), 오미자(Jung *et al.*, 2000), 버섯류(Jeong, 1998), 솔잎(Kim *et al.*, 1999), 구지뽕나무(Cha *et al.*, 1999) 등에서 항산화 효과가 보고되고 있다.

대나무는 벼과와 비슷하지만 줄기가 목질인 것이 다르며, 우리나라에는 5속에 10종, 4변종이 분포되어 있고 주로 중부 이남에 자라며, 대표적인 품종은 조릿대(*Sasamorpha purpurascens* Nakai var. *borealis* Nakai), 참대(*Phyllostachys reticulata* Koch) 및 신의대(*Sasa coreana* Nakai)이다.

대나무는 뿌리에서부터 잎까지 약용으로서 활용도가 높아 예로부터 민간요법으로 사용되어 왔으며 동의보감, 본초강목, 신농본초경에 따르면 대나무는 중풍, 고혈압을 치료하는 데 탁월한 효과가 있고 특히, 대나무 잎은 해열, 거담, 청량 등의 목적으로 폐렴, 기관지염 등의 구갈에 사용되었다고 기록되어 있다(Michiko, 1990; Kweon *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2000). 또한 대나무는 성질이 차고 맛이 달며 독이 없는 것으로 알려져 있어 현재 대나무 잎을 이용한 죽엽차, 죽엽주, 냉면 및 대나무 통을 이용한 대나무밥, 대통주등이 식용으로 이용되고 있고 죽력, 죽력고, 죽염 및 대나무수액 등은 민간약으로 활용되고 있다. 국내에서 가장 흔한 대나무인 조릿대 즉, 산죽은 민간요법으로 오래전부터 암, 당뇨병, 고혈압, 동맥경화, 정신불안, 술

독, 기침, 위염 등의 치료 예방에 사용되어져 왔으나 이의 안전성에 관한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 따라서 대나무의 생리활성에 관한 과학적 규명뿐만 아니라 안전성에 대한 검토가 시급하다.

지금까지 이루어진 대나무 관련 연구로는 주로 대나무의 성분분석과 항균활성에 관한 연구가 대부분을 차지하고 있고 (Lee, 2000; Kim *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 1995) 최근에 대나무 추출물의 항산화 효과(Lim *et al.*, 2004)도 보고된 바 있으나 대나무 줄기에 국한되어 있어 대나무잎을 이용한 항산화능에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 대나무 중에서 가장 약성이 강한 산죽잎을 이용하여 극성이 다른 용매로 순차적으로 분획 추출하여 최적의 용매조건을 알아보고 산죽잎의 항산화력을 측정하여 향후 기능성 식품 소재 및 식품첨가물의 이용과 천연 항산화제로서의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 대나무잎은 우리나라에 많이 분포되어 있는 조릿대 산죽(*Sasa borealis*(Hack.) Mak)의 잎으로 경남 함안 지방에서 자생하는 1년산으로서 2004년 10월에 잎을 채취하여 음건한 후 한번 더어서 100 mesh로 파쇄하여 4℃에서 냉장 보관하면서 사용하였다.

본 실험에 사용한 시약은 특급 및 1급 시약을 사용하였으며, DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), pyrogallol, linoleic acid, BHT(butylated hydroxy toluene) 그리고 ascorbic acid는 Sigma co. (St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였고 FeCl₂, ferrozine는 Junsei chemical co.(Japan)에서 구입하여 사용하였다.

2. 일반 성분 분석

산죽잎에 대한 일반성분은 A.O.A.C법(1990)에 의하여 수분 함량은 상압 110℃ 가열건조법, 조지방 함량은 soxhlet법, 조 단백질 함량은 semi-micro Kjeldahl법, 그리고 회분은 건식회화법으로 측정하였으며 탄수화물은 100에서 수분, 단백질, 조지방 및 회분을 뺀 값으로 결정하였다.

3. 시료의 추출 및 용매 분획 제조

산죽잎의 추출 및 각 획분의 분리는 천연 재료의 용매별 항산화물질과 항암성분의 획분 방법(Choi *et al.*, 1993; Nose *et al.*, 1982)을 변형하여 Fig.1과 같은 과정으로 용매의 극성차를 이용해 비극성 용매 획분으로부터 극성 용매 획분으로 각각 분리하였다.

건조분말 상태로 냉장 보관된 산죽잎 100g을 10배가량 (v/w)의 헥산을 넣고 24시간 동안 2회 반복하여 교반 추출한 후 여과지(Whatman No. 5A)로 여과하고 45℃에서 감압 농축하여 헥산 추출액으로 하였다. 헥산으로 추출한 잔사에 10배량의 에탄올로 24시간 동안 2회 반복 추출하여 여과한 다음 45℃에서 감압 농축하여 에탄올 추출액으로 하였다. 다시 에탄올로 추출한 잔사에 10배량의 물로 위와 같은 조작으로 반복하여 열수 추출액으로 하였다.

4. DPPH radical 소거능

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)는 보라색을 띠는 일종의 염료로서 phenol과 aromatic amines의 항산화 활성을 측정할 때 많이 이용되는 방법이다(Blois *et al.*, 1958). DPPH는 520nm에서 자신이 가진 홀수의 전자 때문에 강한 흡수 band를 보이나, phenol과 같이 수소나 전자 공여체와 반응을 하게 되어 phenoxy radical을 생성하게 된다. 이때 흡수 band는 사라지고 안정화되어 본래의 진보라색에서 노란색으로 변화하여 흡광도가 감소하게 된다. 즉, 반응액 흡광도의 감소를 측

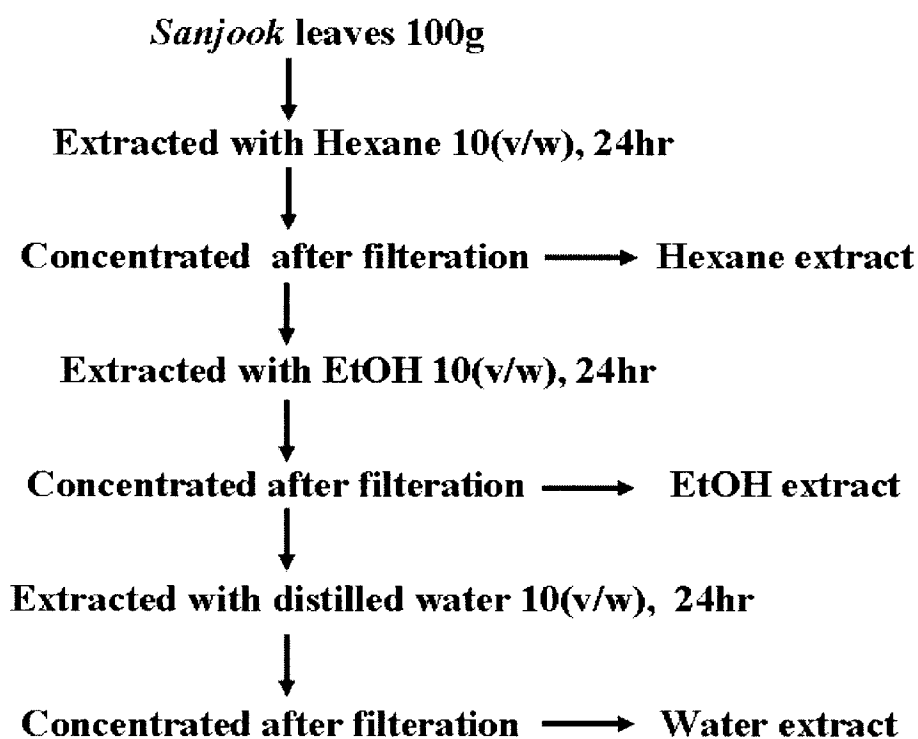


Fig.1. Extraction and fractionation procedure of antioxidants from *sanjook* leaves.

정하여 free radical 소거 활성을 알 수 있다(Hatano *et al.*, 1989).

각 농도별 시료 용액 0.2 mL에 1×10^{-4} M DPPH용액을 0.8 mL 넣고 잘 혼합한 후 10분동안 실온에서 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 에탄올을 사용하였고 시료를 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 free radical scavenging 활성을 백분율로 나타내었다. 활성이 50% 소거능력을 나타내는 시료농도를 IC_{50} 으로 계산하였다. 측정치는 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균값으로 나타내었다.

5. Superoxide dismutase 유사 활성

각 농도별 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 tris/HCl buffer 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 용액 0.2 mL을 가하고 25℃에서 10분간 방치하였으며, 1 N HCl 용액을 1 mL로 가하여 반응을 정지시킨 후, 420 nm에서 측정하였다. 대조구로는 추출물 대신 에탄올을 첨가하여 수행하였고 SOD 유사활성은 $100 - [(시료\ 첨가구의\ 흡광도 / 시료\ 무첨가구의\ 흡광도) \times 100]$ 으로 나타내었다(Marklund *et al.*, 1974).

6. Hydrogen peroxide 소거능

Hydrogen peroxide 소거능은 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)으로 제조한 1 mM H_2O_2 용액 0.6 mL와 시료용액 1 mL을 30℃에서 10분간 반응 시킨 뒤 230 nm에서 흡광도를 측정하

였다. 이때, blank는 H_2O_2 용액대신에 PBS 용액만을 사용하였으며, 대조구는 시료용액 없이 H_2O_2 -PBS 용액으로 사용하였다(Duh *et al.*, 1999).

7. Linoleic acid 자동산화 억제능

각종 농도의 시료 용액 0.5 mL에 linoleic acid emulsion 2.5 mL과 0.2 M 인산완충용액(pH 7.0) 2 mL을 첨가하여 37°C 배양기에서 60시간을 방치하였다. 이때 사용한 linoleic acid emulsion은 linoleic acid 0.2804 g에 0.2804 g의 tween 20, 그리고 50 mL 인산완충용액(pH 7.0)을 조제하여 사용하였다. 37°C 배양기에서 60시간을 방치한 반응액에 30% NH_4SCN 용액 0.1 mL, 20 mM FeCl_2 용액을 가한 뒤, 잘 혼합하여 실온에서 3분간 방치한 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 대신에 시료를 첨가하지 않은 에탄올을 대조구로 하여 백분율로 나타내었다(Mitsuda *et al.*, 1966).

8. 산죽잎 에탄올 추출물의 pH 안정성 측정

시료 0.2 mL에 pH별로 제조한 완충용액 0.6 mL을 가해 실온에서 1시간 방치한 후 다시 완충용액을 이용하여 pH 6으로 조정하였다. pH를 재조정된 것을 시료로 하여 DPPH방법으로 항산화능을 측정하였다. 이때 사용한 완충용액은 pH 2~6은 20 mM citrate- Na_2HPO_4 buffer, pH 7~8은 20 mM Tris/HCl buffer, pH 9~10은 20 mM Na_2CO_3 - NaHCO_3

buffer용액을 각각 사용하였다.

9. 산죽잎 에탄올 추출물의 열 안정성 측정

시료 1 mL을 0℃ ~ 100℃의 각 온도별로 1시간 처리한 후 실온으로 냉각시킨 것을 시료로 하여 DPPH방법으로 항산화능을 측정하였다.

7. 통계 처리

각각의 시료에 대해 평균±표준오차로 나타내었으며, 각 군에 따른 유의차 검증은 분산분석을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 일반 성분 분석

산죽잎의 일반 성분 조성은 Table 1과 같이 수분 4.08%, 조지방 3.95%, 조단백질 2.33%, 회분은 11% 및 탄수화물 78.64%를 함유하고 있었고 일반적인 대나무잎의 일반 성분과 유사한 것으로 나타났다.

2. 추출 용매의 선정

추출 용매의 종류에 따라 산죽잎으로부터 항산화 물질의 추출에 미치는 영향을 조사한 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

조사한 3개의 추출 용매 중 에탄올 추출액이 DPPH방법을 이용한 항산화능측정에 있어서 93.3%로 가장 좋았으며 열수 추출액도 78.3%로 에탄올 추출액 다음으로 높은 활성을 보였으며 hexan 추출액은 거의 추출되지 않았다.

일반적으로 용매 선정시 기본적으로 고려하여야 할 용매의 극성에 따라 추출되어지는 물질이 달라지므로 추출 용매의 선정은 대상 물질 추출에 중요한 인자가 된다. 에탄올 추출액은 추출용매의 선정실험에서 가장 높은 DPPH radical 소거능을 나타낼 뿐만 아니라 수율면에서도 경제적이었고 용매의 안정성을 고려하여 볼 때 적절한 추출 용매라고 판단되며, 반면에 hexan의 경우 항산화 물질이 거의 추출되지 않는 결과로 보아 산죽잎의 항산화 물질은 극성이 비교적 높은 물질로 추측된다.

Table 1. Proximate chemical composition of dried leaves of *sanjook* and dried leaves of bamboo

(unit : %)

Constituents	Dried leaves of <i>sanjook</i>	Dried leaves of bamboo
Moisture	4.08	6.12
Crude protein	2.33	3.71
Crude fat	3.95	2.24
Ash	11.00	19.5
Carbohydrate	78.64	68.43

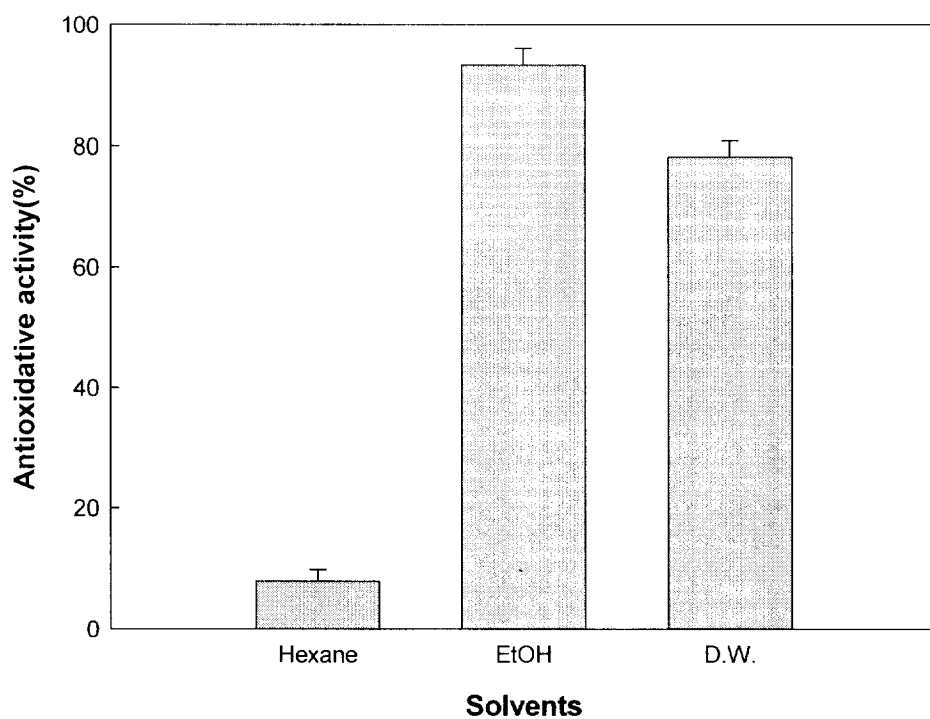


Fig.2. Effect of solvents on extraction of antioxidant from *sanjook* leaves.

3. 산죽잎 에탄올 추출물의 전자공여능

산죽잎으로부터 제조한 에탄올 추출물의 DPPH 전자 공여 작용을 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 산죽잎의 에탄올 추출물은 0.1 mg/mL에서 1.6 mg/mL의 농도범위에서 농도에 의존적으로 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 산죽잎 에탄올 추출물이 0.1 mg/mL 농도에서 16.5%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었고, 0.8 mg/mL 농도에서 63.5%, 1.6 mg/mL 농도에서 93.7%로 높은 활성을 나타내었다. 반면에, 천연 항산화제인 ascorbic acid의 경우 0.06 mg/mL 농도에서 92.4%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내어 산죽잎 에탄올 추출물의 1.6 mg/mL 농도에서의 항산화 활성과 유사하였다.

산죽잎 에탄올 추출물의 DPPH free radical 소거능을 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 50% 감소시키는 데 필요한 시료량(IC₅₀)으로 측정한 결과 583 ug/mL으로 나타났다 (Table 2). 그리고 표준물질로 사용된 ascorbic acid와 BHT의 IC₅₀값이 각각 42 ug/mL, 271 ug/mL으로 나타나 산죽잎 추출물이 효과적인 전자공여능을 보이는 것으로 관찰되었다.

일반 식물체의 항산화 작용에 관해서는 많은 연구가 있는데 약용 식물 20종을 부위별로 DPPH를 이용하여 유리 라디칼 소거능을 측정한 결과, 산수유, 오가피 및 음양곽에서 특이적으로 높은 효과가 관찰되었다(Kim *et al.*, 2004).

4. 산죽잎 추출물의 superoxide dismtase(SOD) 유사활성 효과

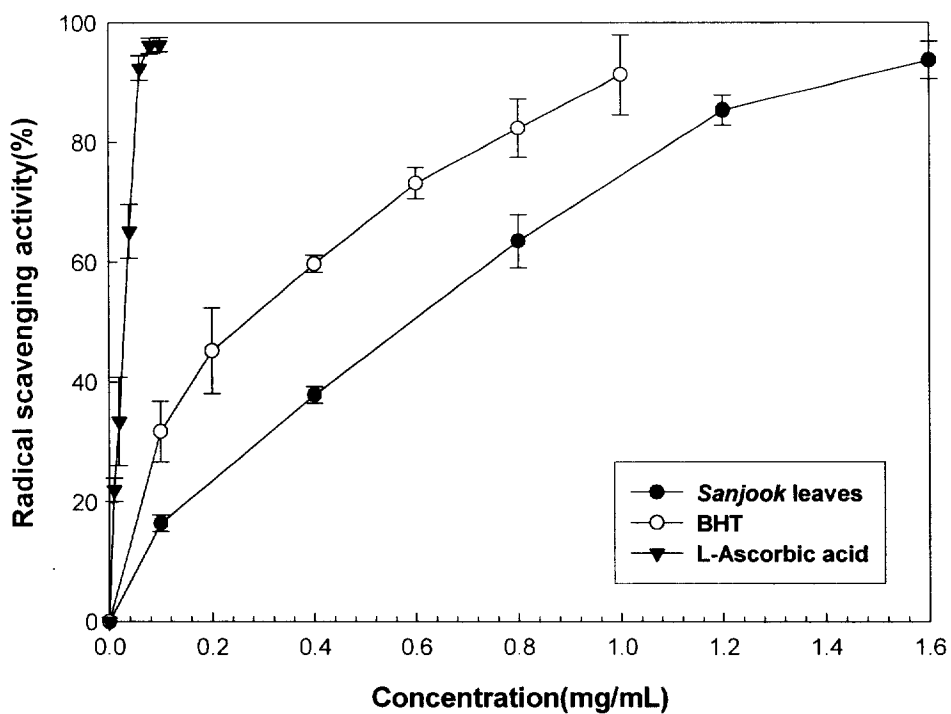


Fig.3. DPPH radical scavenging activity of ethanol extract from *sanjook* leaves, BHT and L-ascorbic acid.

Table 2. DPPH radical scavenging activity of ethanol extract of *sanjook* leaves, BHT and L-ascorbic acid

(unit : ug/mL)	
Components	IC ₅₀
<i>Sanjook</i> leaves	583
BHT	271
L-Ascorbic acid	42

항산화 효소 중의 하나인 superoxide dismutase(SOD)는 세포에 해로운 환원 산소종(superoxide)을 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이다. SOD는 30 KDa 이상의 분자량을 가진 단백질 물질로 체내에 쉽게 흡수되지 못하고 체외로 배출되며(Donnelly *et al.*, 1989), 열과 pH에 불안정하다(Korycka *et al.*, 1979). 그렇기 때문에 SOD와 유사한 활성을 가지면서 SOD의 단점을 보완할 수 있는 SOD 유사활성 물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 산죽잎 에탄올 추출물의 superoxide(O_2^-) 산화억제 작용을 알아보기 위해 superoxide와 반응하여 갈변물질을 나타내는 pyrogallol 자동산화 반응을 측정하여 SOD 유사활성을 측정하였다.

산죽잎의 에탄올 추출물을 사용하여 SOD 유사활성을 측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 산죽잎의 에탄올 추출물을 각 농도별로 SOD 유사활성을 측정한 결과, 산죽잎의 에탄올 추출물 0.1 mg/mL 농도에서 29.7%의 SOD 유사활성을 나타내었으며, 0.6 mg/mL 농도에서 44.9%, 1.2 mg/mL 농도에서 60.8%의 활성을 나타내어 BHT와 유사한 경향을 보였다.

산죽잎의 에탄올 추출물의 SOD 유사활성에 대한 IC_{50} 값은 table 3에서 알 수 있듯이 800 ug/mL으로 BHT의 IC_{50} 값인 680 ug/mL과 유사한 SOD 유사활성을 나타내었으나, ascorbic acid의 IC_{50} 값인 12 ug/mL보다는 큰 SOD 유사활성을 나타냄으로서 ascorbic acid보다는 낮은 SOD 유사 활성을 나타내었다.

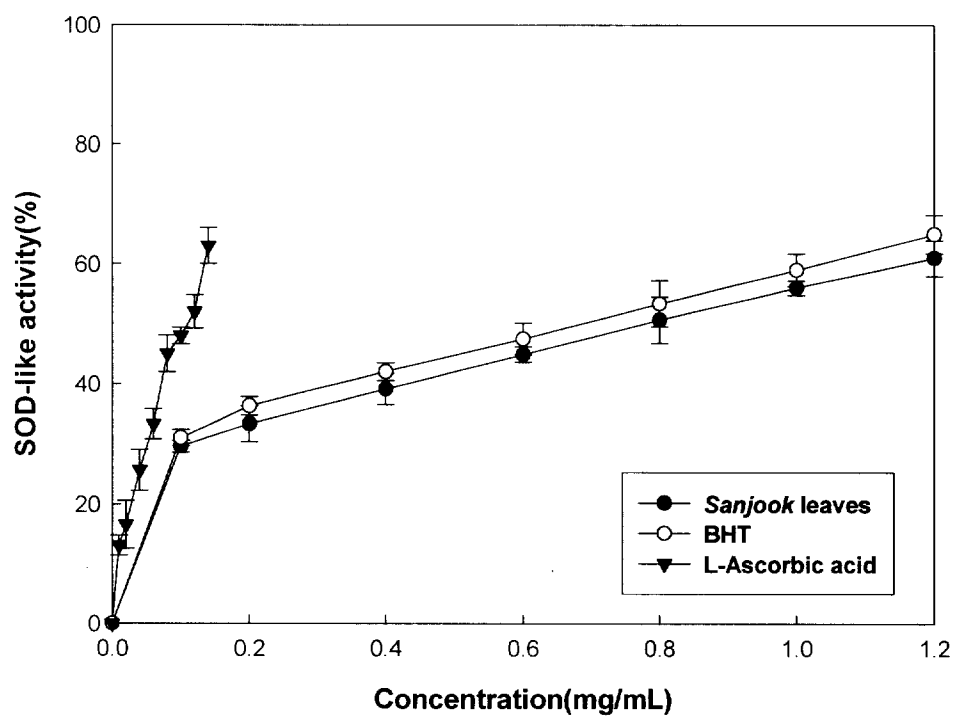


Fig.4. SOD-like activity of ethanol extract of *sanjook* leaves, BHT and L-ascorbic acid.

Table 3. SOD-like activity of ethanol extract of *sanjook* leaves, BHT and L-ascorbic acid

(unit : ug/mL)	
Components	IC ₅₀
<i>Sanjook</i> leaves	800
BHT	680
L-Ascorbic acid	12

일반적으로 천연추출물의 경우, ascorbic acid에 비해서는 항산화효과에 있어 큰 효과를 나타내지 못하나 복령균사체와 복령쌀(Kim *et al.*, 2002)보다 산죽잎 추출물의 SOD 유사활성이 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.

5. 산죽잎 추출물의 hydrogen peroxide 소거 효과

산죽잎의 에탄올추출물을 농도별로 첨가하여 hydrogen peroxide의 소거능을 조사한 결과는 Fig. 5와 같았다. 산죽잎 추출물의 경우, 0.01 mg/mL농도에서 24.6%의 hydrogen peroxide 소거활성을 보였고 0.04 mg/mL농도에서 55.9%, 0.08 mg/mL농도에서 91.1%를 나타내었다. 합성항산화제인 BHT는 0.06 mg/mL의 농도에서 96.8%의 활성을 보임으로써 우수한 H₂O₂ 소거능을 보였다.

Hydrogen peroxide 소거활성에 대한 IC₅₀값은 table 4에 나타내었다. 산죽잎의 에탄올추출물은 38 ug/mL, BHT는 30 ug/mL, ascorbic acid는 3 ug/mL으로 나타냈다. 이러한 결과는 산죽잎의 에탄올 추출물이 지질과산화와 관련되어 항산화 효과가 우수한 것으로 관찰되었다.

6. 산죽잎 추출물의 Linoleic acid 자동산화 억제 효과

산죽잎의 에탄올 추출물의 linoleic acid 자동산화억제에 대한 실험결과를 Fig. 6에 나타내었다. 산죽잎의 에탄올 추출물의 경우, 0.1 mg/mL의 농도에서 56.5%의 linoleic acid 자동

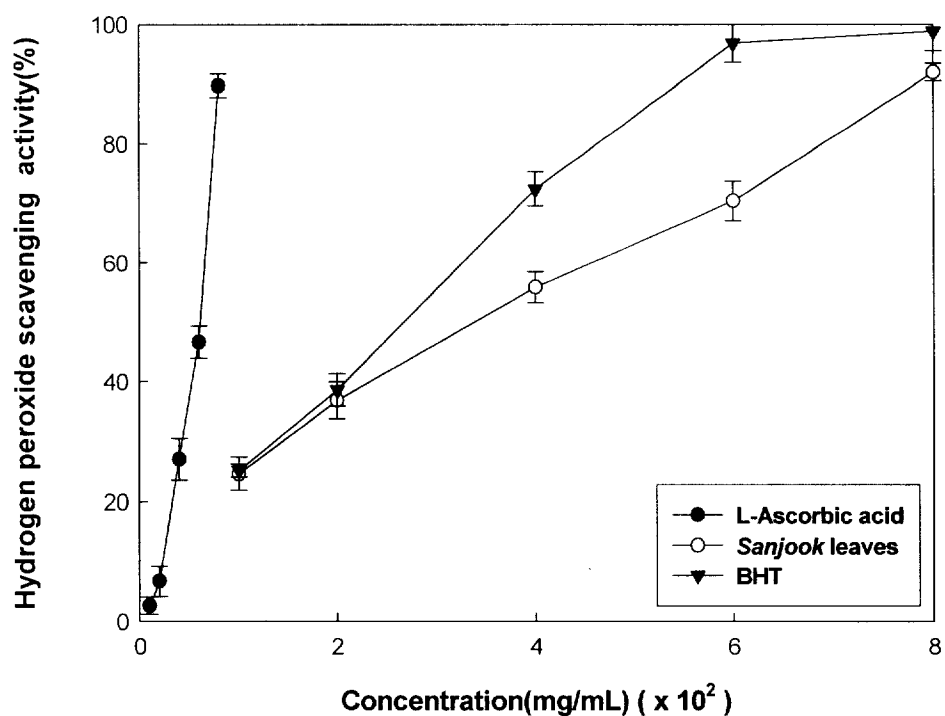


Fig.5. Hydrogen peroxide scavenging activity of ethanol extract of *sanjook* leaves, BHT and L-ascorbic acid.

Table 4. Hydrogen peroxide scavenging acitivity of ethanol extract from *sanjook* leaves, BHT and L-ascorbic acid

(unit : ug/mL)	
Components	IC ₅₀
<i>Sanjook</i>	38
BHT	30
L-Ascorbic acid	3

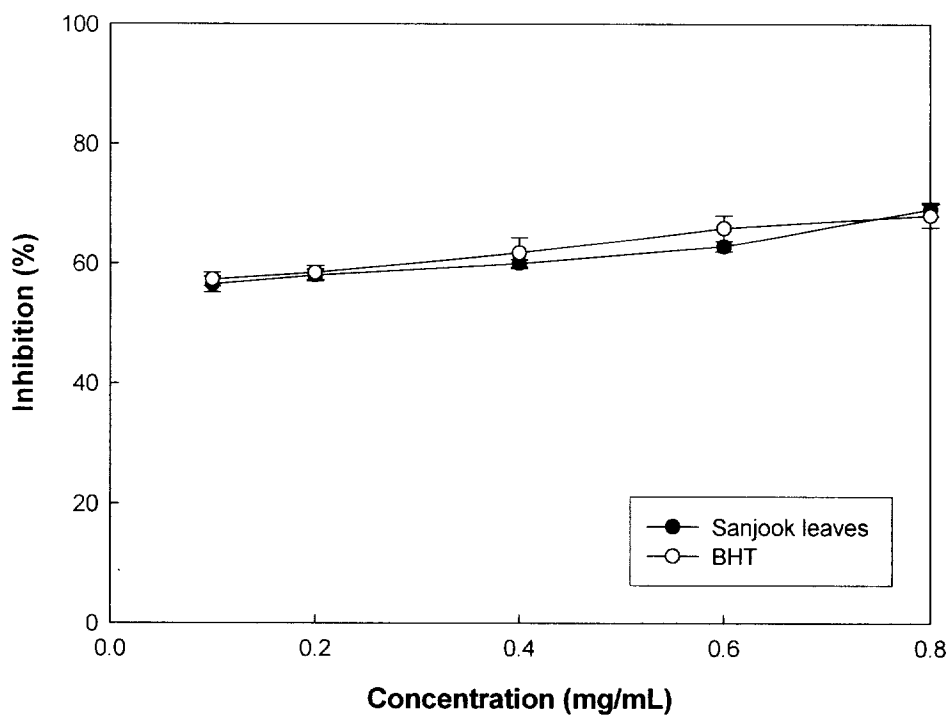


Fig.6. Scavenging activity of ethanol extract of *sanjook* leaves, BHT and L-ascorbic acid against lipid peroxidation.

산화억제효과를 보였으며 0.6 mg/mL과 0.8 mg/mL에서 62.8%와 69.1%의 지질 과산화 억제 효과를 각각 나타내었다. 비교물질인 BHT와 비슷하게 농도 의존적 경향을 보임으로써 지질 과산화 억제 물질로서의 가능성을 보여 주었다.

7. 산죽잎 에탄올 추출물의 안정성

7.1. pH 안정성

산죽잎의 에탄올 추출물의 특성으로서 pH 안정성을 측정한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. pH 6에서 84%의 free radical 소거능으로 가장 안정하였으며 pH가 산성이나 알칼리 영역으로 갈수록 항산화 효과가 급격히 감소하는 것으로 나타났다.

이는 항산화 효과를 나타내는 물질이 중성에서는 안정하나 산성, 알칼리 영역에서는 불안정한 물질임을 알 수 있었다. 반면, 콩의 항산화물질인 daidzein은 pH 7과 pH 9에서 완만한 감소를 나타냈고, genisteine은 pH 7에서는 완만히 감소하였으나 pH 9에서는 급격히 활성이 감소되어 염기에서 불안정하다고 보고하였으며(Ungar *et al.*, 2003), 마늘로부터 분리한 4개의 organosulfur 화합물인 diallylsulfide(DAS)와 diallyldisulfide(DADS)는 pH 2.5~10의 범위에서 안정하였다고 보고하였다(Yin *et al.*, 2002).

7.2 열 안정성

산죽잎의 에탄올 추출물의 열안정성을 측정한 결과를 Fig. 8

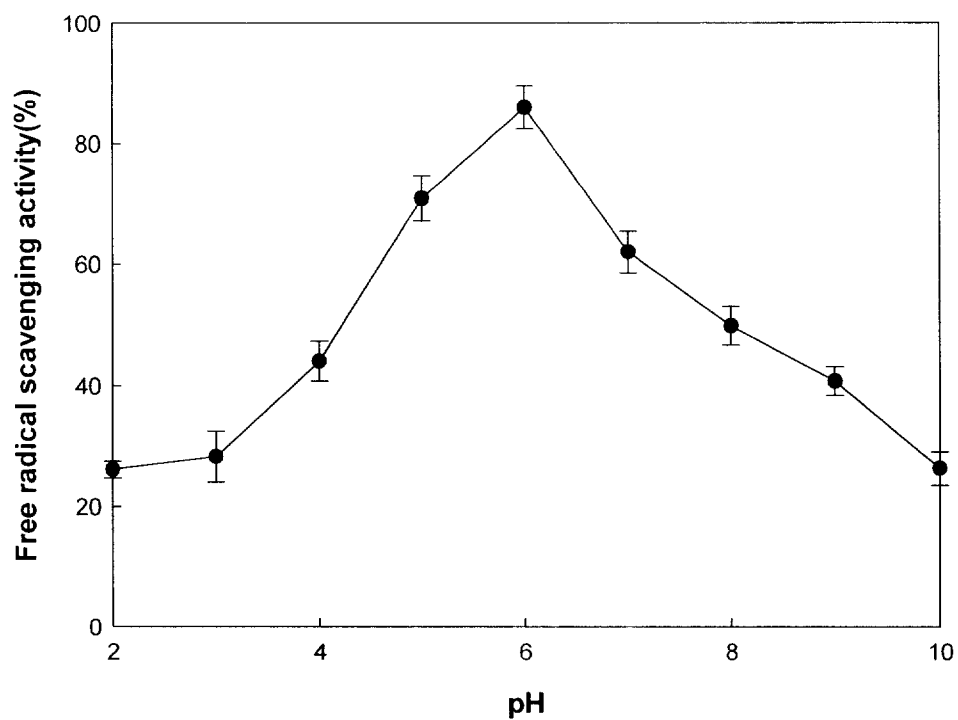


Fig.7. Effect of pH on the stability of antioxidants from ethanol extract of *sanjook* leaves.

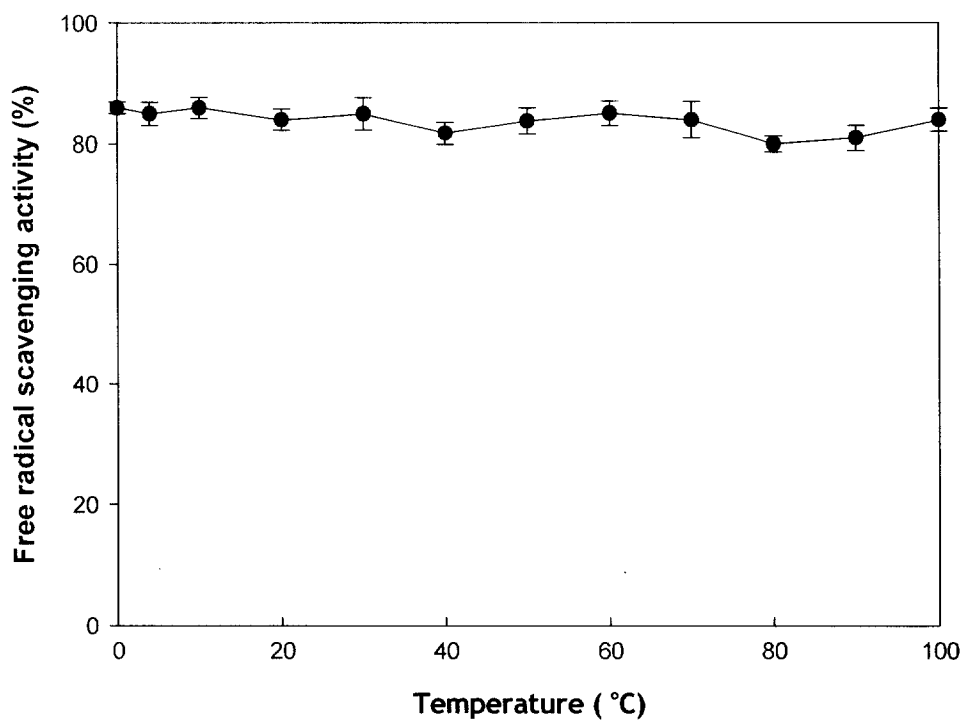


Fig.8. Effect of temperature on the stability of antioxidants from ethanol extract of *sanjook* leaves.

에 나타내었다. 0℃에서 100℃까지 실험한 모든 온도범위에서 큰 감소없이 일정하게 80% 이상의 항산화능을 유지하는 결과를 보여 주었다. 이는 항산화능을 나타내는 물질이 열에 안정한 물질임을 알 수 있었다. 반면, 콩의 항산화물질인 isoflavone은 70℃에서 90℃의 범위에서 1차 kinetic의 양상으로 안정성을 나타내었다고 보고하였고(Ungar *et al.*, 2003), 마늘의 항산화물질인 4개의 organosulfur 화합물들은 모두 65℃에서 항산화활성이 감소되었다고 보고하였다(Yin *et al.*, 2002).

요 약

본 연구는 산죽잎의 생리활성 및 천연 항산화제로서의 기능을 검토하기 위해서 산죽잎의 원료 성분을 분석하고 용매별 산죽잎 추출물로 라디칼 소거능을 알아본 후 용매를 에탄올로 선정하였다. 산죽잎의 에탄올 추출물의 농도별 시료를 가지고 DPPH radical 소거활성, SOD 유사 활성, hydrogen peroxide 소거능, linoleic acid 자동산화 억제효과와 항산화물질을 추출하는 데 영향을 줄 수 있는 pH와 열에 대한 안정성을 측정하였다.

1. 산죽잎의 일반성분은 수분 4.08%, 조지방 3.95%, 조단백질 2.33%, 회분은 11% 및 탄수화물 78.64%를 함유하고 있었다.
2. 산죽잎으로부터 항산화물질 추출의 용매선정을 위해 극성 낮은 것부터 hexan, 에탄올, 열수순으로 순차적으로 추출하여 DPPH법으로 유리 라디칼 소거능을 알아본 결과, 에탄올 추출액의 항산화능이 93.3%로 가장 좋았으며 열수 추출액 또한 78.2%로 에탄올 추출 다음으로 높은 활성을 보였으며 hexan 추출액은 9.6%로 효과가 거의 관찰되지 않았다. 이는 산죽잎의 항산화물질의 극성이 비교적 높은 물질로 추측되어지며 효과적인 항산화물질을 추출하기 위해

서는 에탄올이 적절하였다.

3. 산죽잎의 에탄올 추출물의 항산화 활성을 측정한 결과, 0.1 ~ 0.8 mg/mL의 측정농도 범위에서 농도에 의존적으로 반응하였다. DPPH radical 소거능에 대한 IC_{50} 값은 586 ug/mL, SOD 유사활성에 대한 IC_{50} 값은 800 ug/mL, H_2O_2 소거능에 대한 IC_{50} 값은 38 ug/mL을 나타내었다. 대조구인 BHT의 DPPH radical 소거능에 대한 IC_{50} 값은 271 ug/mL, SOD 유사활성에 대한 IC_{50} 값은 680 ug/mL, H_2O_2 소거능에 대한 IC_{50} 값은 30 ug/mL의 활성을 나타내었다. Thiocyanate method를 이용한 linoleic acid 자동산화억제 효과는 0.1 ~ 0.8 mg/mL의 농도 범위에서 55~60%의 지질산화억제활성을 나타내었으며 대조구인 BHT와 유사한 양상을 나타내었다.

4. 산죽잎의 에탄올 추출물의 특성을 알아보기 위하여 pH와 열에 대한 안정성을 알아본 결과, pH 안정성은 pH 6에서 가장 안정하였으며 산성이나 알칼리 영역으로 갈수록 불안정하였다. 열안정성의 경우 온도 0℃~100℃ 범위에서 80% 이상의 우수한 활성을 유지하였다.

참 고 문 헌

Gardner, D. R., Fridorich. I. 1991. Superoxide sensitivity of *Escherichia coli* 6-phospho gluconate dehydrate. *J. Boil. Chem.*, 226, 1478-1483.

Pratt, D. E., M. T. Huang, S. T. Ho and C. Y. Lee. 1992. Natural antioxidants from plant materials. In phenolic compounds in food and their effects on health. *Am. Chem. Soc.*, Washington D. C., p54.

Babizhayev, M. A., M. C. Seguin, J. Gueyne, R. P. Evstigneeva, E. A. Ageyeva and G. A. Zheltukhina. 1994. L-carnosine(β -alanyl-L-histidine) and carcinine(β -alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *J. Biochem.*, 304, 509-516.

Chan, W. K., E. A. Decker, J. B. Lee and D. A. Butterfield. EPR. 1994. Spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptide. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1407-1410.

Decker, E. A., Crum and J. T. Calvert. 1992. Difference in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 756-759.

Akaike, T., S. Ijiri, K. Sato, T. Katsuki and H. Maeda. 1995. Determination of peroxy radical-scavenging activity in food by using bactericidal action of alkyl peroxy radical. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1864-1870.

Dziezak, J. D. 1986. Antioxidants. *Food Technol.* 40, 94-102.

Branen, A. S. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1, 59-62.

Jeong, M. R., B. S. Kim and Y. E. Lee. 2002. Physicochemical characteristics and antioxidative effects of Korean figs(*Ficus carica L.*). *J. East Asian Soc. Dietary Life.*, 12, No.6.

Jang, J. K and J. Y. Han. 2002. The antioxidant ability of

grape seed extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 34, 524-528.

Lee, J. H., S. I. Jeong, I. S. You, S. K. Kim, K. N. Lee, D. S. Han and S. H. Baek. 2001. The inhibitory effects of the methanol extract of *Houttuynia cordata* Thunb against cadmium induced cytotoxicity(V). *Kor. J. Pharm. acogn.*, 31, 228-234.

Woo, N., M. S. Ahn and K. Y. Lee. 1995. Antioxidant effect of Aloe(*Aloe arborescences*) extracts on linoleic acid and soybean oil. *Korean J. Soc. Food Sci.*, 11, 536-541.

Bae, E. A and G. S. Moon. 1997. A study on the antioxidative activities of Korean soybeans. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 203-208.

Jung, G. T., I. O. Ju, J. S. Choi and J. S. Hong. 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrate scavenging effects of *Schizandra Chinesis Ruprecht* (Omija) seed. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 32, 928-935.

Jeong, E. J. 1998. Antioxidative and nitrite scavenging effects of solvent extracts from *Gyrophora esculenta*. *Korean J. Food Nutr.*, 11, 426-430.

Kim, S. M., E. J. Kim, Y. S. Cho and S. K. Sung. 1999. Antioxidant of pine extracts according to preparation method. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 28, 984-989.

Cha, J. Y, H. J. Kim, C. H. Chung and Y. S. Cho. 1999. Antioxidative activities and content of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 28, 1310-1315.

Michiko, F. 1990. Difference between bamboo shoots and vegetables in thermal disintegration of tissues and polysaccharides fractionated by successive extraction. *J Food Sci.*, 55, 739-745.

Kweon, M., H. J. Hwang and H. C. Sung. 2001. Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo(*Phyllostachys edulis*). *J Agric Food Chem.*, 49, 4646-4655.

Zhang, H. C and D. D. Kitts. 2000. Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo (*Phyllostachys nigravar*). Henonis leaf extract *in vitro*. *J Agric Food Chem.*, 48, 3170-3176.

Lee, S. K. 2000. Antimicrobial activity of bamboo(*Phyllostachys bambusoides*) essential oil. *J. Food Hyg. Safety.*, 15, 55-59.

Kim, M. J., B. K. Kim and M. S. Jang. 1996. Effect of bamboo(*Pseudosasa japonica Makino*) leaves on the quality and sensory characteristics of Dongchimi. *J Food Sci Nutr.*, 1, 159-167.

Chung, D. K and R. N. Yu. 1995. Antimicrobial activity of bamboo leaves extract on microorganisms related to kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27, 1035-1038.

Lim, J. A., S. N. Young and S. H. Baek. 2004. Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of ethanol extract from *phyllostachys bambusoides*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 36, 306-310.

A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.

Choi, K. J., M. W. Kim, S. K. Hong and D. H. Kim. 1993. Effect of solvent on the yield, brown color intensity, UV absorbance, reducing and antioxidant activities of extracts from white and red ginseng. *J. Kor. Agr. Chem. Soc.*, 26, 8.

Nose, M and N. Fujino. 1982. Antioxidative activities of some vegetable foods and active component of avocado epicarp. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.*, 29, 507.

Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.*, 4617, 1198-1199.

Hatano, T., R. Edamatsu, M. A. Hiramatsu, Y. Fujita, T. Uehara, T. Yoneyama and T. Okuda. 1989. Effect of the interaction of tannins with co-existing substances VI. Effects of tannins and related polyphenol superoxide anion radical and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.*, 37(8), 2016-2021.

Marklund, S and G. Marklund. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47, 469-474.

Duh, P. D, Y. Y. Tu and G. C. Yen. 1999. Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*chrysanthemum morifolium Ramat*). *Lebensm. Wiss. Technol.*, 32, 269-277.

Kim, S. J., J. S. Moon, J. M. Kim, S. G. Kang and S. T. Jung. 2004. Preparation of jam using *Undaria pinnatifida sporophyll*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 33, 598-602.

Kim, S. K., S. Y., Ryu, S. U and Y. S. Choi. 2001. Cytotoxic alkaloids from *Houttuyna cordata*. *Arch. Pharm. Res.*, 24, 518-521.

Donnelly, J. K., K. M. McLellan, J. L. Walker and D. S. Robinson. 1989. Superoxide dismutase in foods, A review. *Food Chem.*, 33, 243-270.

Korycka-Dahl, M., Richardson. T and Hicks. C. L. 1979.

Superoxide dismutase activity in bovine milk serum. *J. Food Prot.*, 42, 867-871.

Ungar, Y., O. F. Osundahunsi and E. Shimoni. 2003. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. *Agric. Food Chem.*, 51, 4393-4399.

Yin, M. C., S. W. Hwang and K. C. Chan. 2002. Nonenzymatic antioxidant activity of four organosulfur compounds derived from garlic. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6143-6147.

감사의 글

직장 생활에 바쁜 나날을 보내고 시간에 쫓겨 힘들어 하던 저에게 항상 아낌없는 배려와 격려로 지도해 주신 양지영 교수님께 머리 숙여 감사 드립니다. 또한 세심하게 심사해주신 조영제 교수님, 전병수 교수님, 이근태 교수님, 김선봉 교수님, 안동현 교수님, 이양봉 교수님께 진심으로 감사 드립니다.

대학원 진학에 고민하던 저에게 용기와 많은 조언을 해주신 활성연구소 박용대 소장님과 따뜻한 관심으로 격려해주신 김태원 형과 송종엽 형에게도 감사의 말씀을 전합니다.

또한 바쁜 직장 생활에 아낌없이 지원해주신 부산 식약청 김진수 청장님과 친형님같이 학업에 정진할 수 있도록 온정을 베풀어주신 식품감시과 김재인 과장님, 김영생 사무관님 그리고 함께 의지하며 공부한 김성필, 조문태 형, 김성근, 강승극, 정순아, 장미란씨에게도 감사 드립니다.

실험 관련하여 자료 찾는 데에 도와준 경북대 대학원 최경훈, 그리고 제가 어렵고 힘들때, 본인도 직장 생활에 고달픈 몸으로 끝까지 저를 도와준 후배 박성희씨에게 진심으로 감사를 전하며, 학교 올 때마다 반갑게 맞아주던 유미영 박사, 정운주, 권혁이, 귀염둥이 명신이 그리고 이쁜이들인 지혜, 미애, 근령이, 임단이와 오철이를 비롯한 발효공학 실험실 모든 후배들에게도 감사 드립니다.

마지막으로 칠순을 훨씬 넘기신 연세에도 불철주야 자식 걱정

해주시고 저에게 큰 기둥이 되어 주시는 아버님, 어머님, 장인에게 감사의 말씀을 올리고, 멀리 서울과 이국땅 호주에서 성원 해주신 형님들, 누님, 동생 그리고 밤 늦게 귀가 하는 남편을 따뜻하게 반겨주는 사랑하는 아내와, 아들 중현, 딸 진영이와 이 작은 결실의 기쁨을 나누고 싶습니다.