

T000035917

보안과제( ), 일반과제(O) 발간번호 11-1541000-000715-01

T000035917

MONO1201213582

혈압 강하에 효과적인 식물추출  
소금의 산업화 기술 개발

(Development of Glasswort-Salt and Plant-Derived Salt That Have  
Ability to Reduce Blood Pressure and Anti-Diabetic Activity)

함초소금 및 식물소금의 제조 기술 개발  
(Development of Glasswort-Salt and Plant-Derived Salt)

목 포 대 학 교

농 립 수 산 식 품 부

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “혈압 강하에 효과적인 식물추출 소금의 산업화 기술 개발에 관한 연구” 과제(협동과제 “합초소금 및 식물소금의 제조 기술 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2010년 12월 19일

주관연구기관명 : 목포대학교  
주관연구책임자 : 함 경 식  
세부연구책임자 : 함 경 식  
연 구 원 : 조 정 용  
연 구 원 : 박 선 영  
연 구 원 : 최 정 근  
협동연구기관명 : (주)태평소금  
협동연구책임자 : 손 일 선

# 요 약 문

## I. 제 목

혈압 강하에 효과적인 식물추출 소금의 산업화 기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

합초소금 및 합초식물소금의 제조 기술을 확립하고 이들 제품의 건강우수성을 검증하여 혈압상승억제 및 항당뇨 효과를 갖는 고품질의 합초소금 제품 개발 및 산업화를 목적으로 한다. 보다 상세하게는 합초소금 및 합초식물소금의 혈압 상승 억제 및 항당뇨 작용 기전 해명, 가장 기능성이 증진된 이들 소금의 제조공정 표준화 기술 개발, 대량생산을 위한 설비개선 및 구축, 그리고 고품질의 제품 생산을 통해 고부가가치를 창출하고자 한다.

본 연구에서는 3가지 종류의 소금을 제조하고자 한다. 즉 1) 합초추출물로 만든 소금, 2) 초미세 합초분말소금 제조, 그리고 3) 합초추출액에 다른 식물추출액 첨가를 통하여 기능성이 향상된 합초식물소금 등이다. 합초에 많이 있는 마그네슘 함량은 소금의 나트륨 배설을 촉진시킬 뿐만 아니라 혈관 확장인자인 prostacyclin을 증가시키고 혈관축소인자인 thromboxane을 감소시켜 혈압을 낮추는 것으로 알려져 있다. 또한 2형 당뇨의 원인이 주로 인슐린 신호전달의 장애 때문인데 마그네슘은 인슐린 신호전달을 도와 2형 당뇨를 개선하는 것으로 알려져 있다.

한편, 소금의 NaCl은 인슐린 신호전달을 저해하여 인슐린저항성을 일으키는 것으로 알려져 있다. NaCl의 인슐린 신호 전달 저해는 NaCl에 의한 산화적 손상에 의해서 일어나는 것으로 알려져 있는데 합초에는 항산화 물질을 많이 함유하고 있어 산화적 손상을 줄여 인슐린 신호 전달에 도움을 줄 것으로 기대된다. 그러므로 합초로 만든 소금은 혈압을 낮추는데 효과가 있는 여러 미네랄을 갖고 있고, 이들은 또한 인슐린 신호전달에 도움이 되기도 하여 소금에 의한 혈압상승억제와 항당뇨 효과가 기대되어 이를 동물실험을 통하여 분석하려고 한다.

또한 본 연구에서는 합초소금에 유용 식물추출물을 첨가하여 혈압강하 혹은 다른 기능성 향상을 위한 식물소금을 제조하려고 하는데 특히 ACE 저해 활성이 높고 혈관 확장을 통해 혈압을 낮추는데 좋은 소재를 혼합하여 합초식물소금을 제조하여 이의 건강기능성에 대해 동물실험을 통하여 분석하려 한다. 한편 식물추출액을 이용하여 소금을 만들 때 열을 가해 증발시켜 만드는 경우가 많은데 이럴 경우 미네랄 손실이 많다. 그러므로 본 연구에서는 가열 농축 방법이 아닌 다른 방법 (예 spray drying)을 사용하여 식물소금을 제조하고자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

합초소금 및 식물소금의 제조 기술을 확립하고 이들 제품의 건강우수성을 검증하여 혈압상승억제 및 항당뇨 효과를 갖는 고품질의 식물소금 제품 개발 및 산업화를 목적으로 한다.

- 식물소금 제조
  - 합초추출물을 이용한 합초소금 제조
  - 초미세 합초분말소금 제조
  - 다른 식물추출액 첨가를 통한 합초소금의 기능성 향상
- 소금 제조 방법조사

이어 합초소금 및 식물소금의 혈압 상승 억제 및 항당뇨 작용 기전 해명, 가장 기능이 증진된 이들 소금의 제조공정 표준화 기술 개발, 대량생산을 위한 설비개선 및 구축, 그리고 고품질의 제품을 생산한다.

- 식물소금이 혈압에 미치는 영향조사 (동물실험)
  - 혈압의 변화조사
  - 혈압에 관련된 생화학적 인자 조사
- 식물소금이 당뇨에 미치는 영향 조사 (동물 및 세포실험)
  - Oral glucose tolerance test
  - glucose uptake에 미치는 영향 조사
  - 인슐린 신호전달에 미치는 영향조사
  - 신호전달 구성성분(예, IRS-1의 serine phosphorylation 등) 활성화 및 유전자 발현

1차년도	2009	제1세부	합초소금 및 합초식물소금의 혈압 상승 억제 및 항당뇨 효과 평가	<ol style="list-style-type: none"> <li>합초 소금 및 합초식물소금의 혈압상승 억제 및 항당뇨 효과 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 혈압 상승 관련 효소 저해 활성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>in vitro</i> 상에서 angiotensin converting enzyme 등의 저해 활성 조사</li> </ul> </li> <li>○ 합초소금 및 합초식물소금의 항당뇨 활성평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- α-glucosidase 저해 활성 조사</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>선발된 합초소금 및 합초식물소금이 혈압 상승 억제 작용에 미치는 영향 <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>in vivo</i> 상에서 salt-sensitive rat에 의한 혈압 상승 억제 효과 조사(수축기 및 이완기 혈압 변화)</li> <li>- 혈장 NO 농도 및 ACE 활성 조사</li> </ul> </li> <li>선발된 합초소금 및 합초식물소금이 인슐린 작용에 미치는 영향 <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>in vivo</i> 상에서 동물실험에 의한 항당뇨 효과 조사</li> <li>- 당흡수(glucose uptake) 및 insulin 농도 조사</li> </ul> </li> </ol>
구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
		제1협동	합초소금 혹은 천연자원을 이용한 합초식물소금의 생산 기술 확립	<ol style="list-style-type: none"> <li>합초소금의 제조 방법 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 합초 착즙액 혹은 열수추출물을 이용한 최적 추출 조건 확립</li> <li>- 결정화 방법 및 분무, 열풍, 동결 등의 최적 건조 방법 조사</li> </ul> </li> <li>초미세 합초분말 제조 및 이를 이용한 응용제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 분쇄기를 이용한 초미세 합초분말 제조 방법 확립</li> <li>- 초미세 합초분말을 혼합한 응용제품개발</li> </ul> </li> <li>혈압 상승 억제에 효과가 있는 천연자원을 이용한 식물소금 제조 방법 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 합초소금 제조 시, 생물소재 추출물의 배합 방법 조사</li> <li>- 결정화 방법 및 분무, 열풍, 동결 등의 적정 건조방법</li> </ul> </li> <li>합초분말소금 제조 및 이를 이용한 응용제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 분쇄기를 이용한 초미세 분말 제조 방법 확립</li> </ul> </li> <li>선발된 합초소금 혹은 합초식물소금의 이화학적 특성 조사 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 총당, 조지방, 조단백질 등의 함량 조사</li> <li>- 식이섬유, 총페놀성 화합물의 함량 조사</li> </ul> </li> <li>합초소금 및 합초식물소금에 함유된 기능성 성분 조사</li> </ol>

2차년도	2010	제1세부	선발된 합초소금 및 기능성 식물소금이 갖는 혈압 상승 억제 및 항당뇨 효과의 작용 기전 해명	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 선발된 합초소금 및 합초식물소금이 정상쥐에서 혈압 상승 억제 작용에 미치는 영향 <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>in vivo</i> 상에서 정상쥐에 의한 혈압 상승 억제 효과 조사</li> <li>- 혈장 NO 농도 및 ACE 활성 조사</li> </ul> </li> <li>2. 염 민감쥐와 정상쥐에서의 혈압 상승 관련인자에 미치는 영향 조사 <ul style="list-style-type: none"> <li>- renin-angiotensin-aldosterone system의 관련 인자의 생화학적 분석</li> <li>- 혈압이완, 수축에 관여 인자(예, prostacyclin)의 생화학적 분석</li> </ul> </li> <li>3. 선발된 합초소금 및 합초식물소금이 정상쥐에서 당뇨에 미치는 영향 <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>in vivo</i> 상에서 동물실험에 의해 항당뇨 효과 조사</li> <li>- 당흡수(glucose uptake) 및 insulin 농도 조사</li> <li>- Oral glucose tolerance test</li> </ul> </li> <li>4. 염민감쥐와 정상쥐에서의 인슐린 신호 전달인자에 미치는 영향 <ul style="list-style-type: none"> <li>- IRS, AKT, GLUT4 등의 생화학적, 분자생물학적 분석</li> <li>- IRS-1의 serine phosphorylation 등의 활성 및 유전자 발현</li> <li>- PTP1B 등의 인슐린 신호 전달에 직간접적으로 미치는 인자들의 생화학적 분석, 분자생물학적 분석</li> </ul> </li> </ol>
구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
		제1협동	합초소금 혹은 식물소금 제품의 생산 공정 표준화	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 공장에서 합초소금 및 합초식물소금의 생산 시설 개선 및 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 합초착즙을 위한 착즙 장치</li> <li>- 합초열수추출물 및 소금의 배합 장치</li> <li>- 분무, 열풍, 동결 등의 최적 건조 장치</li> <li>- 결정화 장치 등</li> </ul> </li> <li>2. 대량생산을 위한 합초소금 혹은 합초식물소금 제품의 제조공정 표준화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료의 최적 배합 비율 조사</li> <li>- 염도 및 주요 미네랄 성분의 함량 조사</li> <li>- 균일 제품의 생산을 위한 합초소금의 표준 물질 결정 및 이 성분의 함량 조사</li> </ul> </li> <li>3. 공장규모에서 합초소금 및 합초식물소금의 시제품 생산</li> </ol>

#### IV. 연구개발결과

함초는 다른 육상식물들과 달리 고염과 함께 다수의 미네랄 성분들을 다량 함유하고 있으며 dicaffeoylquinic acid류 등의 chlorogenic acid계 화합물과 isorhamnetin과 quercetin 등을 포함한 기능성 성분을 함유하고 있다. 또한 이 식물은 항산화, 항당뇨, 항암, 그리고 항비만 등의 다양한 생리활성을 갖고 있다. 그래서 함초로부터 고염도와 함께 다수 미네랄성분들과 기능성 유기성분들이 다량 함유된 함초소금제품을 개발하고 산업화하고자 하였다. 이에 본 연구에서는 함초소금 및 함초식물소금의 제조 기술을 확립하고 이들 제품의 건강우수성을 *in vitro*와 동물실험에 의해 혈압상승억제 및 항당뇨 효과를 조사하였다.

##### 가) 함초소금의 제조 기술 개발

함초소금을 제조하기 위해 선행연구에서 함초를 130℃에서 5 hr동안 추출하여 얻어진 함초고압열수추출물이 90℃에서 1 hr동안 추출한 일반열수추출물에 비해 높은 염도(NaCl, 약 55%)와 다수의 미네랄 성분들이 다량 추출되어짐을 확인하였다. 또한 함초고압열수추출물이 높은 DPPH와 ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging, ACE 저해, α-glucosidase 저해 활성을 보였으며 총페놀성 화합물 함량도 비교적 높았다. 그러므로 높은 기능성 성분 함량을 함유하고 있고 생리활성이 우수한 함초고압열수추출물이 함초소금의 제조에 적합한 소재로 판단되었다.

이에 본 연구에서는 함초소금의 제조 기술을 확립하고자 함초고압열수추출액을 분무, 가열농축, 그리고 동결 등의 건조 방법에 따라 함초소금을 제조하고 이들 소금의 이화학적 특성과 생리활성을 조사하였다. 그 결과, 함초고압열수추출액을 분무건조하여 제조된 함초고압열수분무소금은 연한 녹색을 나타냈으며 짠맛은 천일염 등의 다른 소금들에 비해 약한 느낌이었다. 또한 함초고압열수추출액을 가열 농축하여 제조된 함초고압열수추출농축소금(GHC)은 함초고압열수분무소금(GSD)에 비해 함초가 갖는 고유의 색인 연한 녹색이기 보다는 진한 흑색을 나타냈으며 탄맛이 강하고 함초고압열수분무소금(GSD)과 비슷한 짠맛을 나타냈다. 동결건조된 함초고압열수추출농축소금은 함초고압열수분무소금과 유사한 특성을 보였으나 건조시간이 너무 길고 NaCl 등이 장비의 고장을 자주 일으켜 함초고압열수추출액의 건조방법에는 적합하지 않는 것으로 판단되었다.

또한 함초고압열수추출농축소금(GHC)은 함초고압열수분무소금(GSD)에 비해 총페놀성 화합물 함량이 높고 미네랄성분들의 함량이 낮았으며 DPPH와 ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging에 의한 항산화 활성이 우수한 반면 ACE 및 α-glucosidase 저해

활성은 거의 유사하였다. 그러나 관능평가에 의하면 GSD는 GHC보다 색깔, 단맛, 그리고 전체적인 기호도면에서 높은 점수를 받아 음식의 풍미를 향상시키는 조미료로서의 활용을 고려해 보면 함초고압열수추출액을 분무건조에 의해 제조된 GSD를 더 선호할 것으로 나타났다. 함초소금 제조에 있어 함초고압열수추출액의 분무건조가 함초의 색을 그대로 유지하면서도 가장 효율적이고 경제적인 건조 방법으로 판단되었다. 그러므로 함초고압열수분무소금(GSD) 제품이 함초고압열수가열농축소금(GHC)보다 식품 소재로서의 활용뿐만 아니라 상품화 가능성이 높게 시사되었다.

함초고압열수분무소금(GSD)은 제품 포장을 하거나 조리할 때 쉽게 날려 사용에 불편을 줄 뿐만 아니라 다량의 미네랄 성분 특히 Mg과 Ca 함량이 높아 유통 시 수분 흡습으로 인해 제품의 품질을 떨어뜨릴 우려가 있을 것을 시사되었다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 함초고압열수분무소금(GSD)을 우송대학교 (주)홍삼단의 도움을 받아 환 형태가 아닌 0.5% carboxymethyl cellulose를 첨가하여 유동층코팅기를 이용하여 함초고압열수분무소금원단(GSDT)을 제조하였으며 이들 소금의 이화학적 특성과 생리활성을 조사하였다. 그 결과에 의하면 GSDT는 GSD에 비해 항산화, ACE 저해, 그리고  $\alpha$ -glucosidase저해 활성이 우수함을 알 수 있었으며 기능성 성분 및 미네랄 성분의 함량은 큰 차이를 보이지 않았다. 저장기간 중 GSDT는 GSD에 비해 수분흡수량이 낮게 나타나 함초소금의 제조에 있어 수분 흡습을 방지하기 위한 방법으로 유동 코팅기를 활용하여 함초소금의 수분흡습을 방지하는 것이 상품화에 용이할 것으로 판단되었다. 또한 두 소금 간에 관능적 차이는 거의 없어 0.5% carboxymethyl cellulose를 첨가하여 유동층코팅기에 의해 제조된 함초고압열수분무소금원단(GSDT)이 함초소금 제품으로 가장 적합한 것으로 판단되었다.

한편, 함초고압열수분무소금원단(GSDT) 제품이 시중에 판매되기 위해서는 생산단가와 유효성 등의 문제점들이 제기되었다. 함초고압열수분무소금(GSD)에는 열수에 의해 용출된 함초 유래의 무기성분들과 유기성분들이 고농축된 상태라 할 수 있는데 열수에 용해되지 않는 식이섬유 등의 불용성 기능성 성분들이 다량 소실될 우려가 있다. 또한 함초고압열수분무소금원단(GSDT)은 생산단가가 1 kg당 약 9만원으로 유통 및 판매가는 최소 12만원 이상으로 예상되어 소비자에게는 큰 부담을 줄 수 있다. 그래서 함초소금의 생산단가를 줄이는 위해 함초 그 자체를 미세 분말화하거나, 20  $\mu$ m이하의 초미세분말화한 다음 이들을 유동코팅기를 이용하여 함초미세분말원단(GMT)과 함초초미세분말소금원단(GHT)을 제조하였으며 생리활성을 평가하였다. GMT와 GHMT은 항산화, ACE 저해, 그리고  $\alpha$ -glucosidase저해 활성이 있음을 확인하였다. 이들 소금은 함



초고압열수분무소금원단(GSDT)에 비해 거칠고 짠맛이 약하다는 단점이 있으나 그러나 함초소금의 생산 원가를 낮추는데 효율적인 것으로 판단되었다.

#### 나) 함초식물소금의 제조 기술 개발

함초고압열수추출액을 분무건조하여 제조된 함초소금(GSD)은 항산화, ACE 저해, 그리고  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 나타내면서 미네랄 함량이 높음을 확인하였다. 또한 함초소금을 유동 코팅기를 이용하여 제조된 함초소금원단은 높은 생리활성뿐만 아니라 수분 흡습 억제 효과가 있어 상품화가 가능할 것으로 시사되었다. 이 함초소금에 유용 식물추출물을 첨가하여 혈압강하 혹은 다른 기능이 더욱 향상된 식물소금을 제조하고자 ACE 저해 활성이 높고 혈관 확장을 통해 혈압을 낮추는데 효과가 있는 함초식물소금(GG, GL)을 제조하였으며 이들의 생리활성을 조사하였다. 식물소금 제조 시 함초에 생물소재의 첨가량이 많을수록 총페놀성 화합물의 함량이 증가하고 혈압상승억제, 항당뇨, 그리고 항산화 등의 생리활성이 증가함을 알 수 있었다. 특히, 이들 소금은 혈압상승억제 혹은 항당뇨 활성이 발휘함으로써 식물소금 후보로 판단되었다.

#### 다) 동물실험에서 함초고압열수분무소금원단과 함초식물소금의 항당뇨 및 항산화 효과

혈당강하 효과와 항산화 활성 등의 기능을 나타냈을 뿐만 아니라 관능검사에서 우수한 점수를 받았던 함초고압열수분무소금(GSD)과 함초식물소금(GG)이 염민감쥐에서 항당뇨와 항산화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 이에 앞서 염민감쥐를 이용한 생물소재의 항고혈압 효과에 대한 연구는 다수 보고된 바 있으나 항당뇨에 대한 연구 보고는 거의 없었다. 또한 염민감쥐는 일반쥐보다 10배 이상(약 26-28만원) 비싸고 실험 동물수가 많기 때문에 그 실험비용이 문제가 되어, 본 연구실에서는 예비실험으로 염민감쥐에 8% NaCl의 천일염 및 정제염이 함유된 사료를 섭취시켜 혈압 및 항당뇨 활성을 평가하였다. 천일염이 정제염에 비해 혈압 상승 완화 효과를 나타내, 기존 염민감쥐 및 정상쥐에 행한 실험결과와 일치함을 확인하였다. 그러나 미네랄이 풍부한 소금첨가균인 SS 식이균과 미네랄이 거의 없는 소금첨가균인 RS 식이균은 포도당부하내성 실험 및 glucose uptake에서 유의적인 차이를 나타내지 않아 두 식이균 간의 항당뇨 효과를 확인할 수 없었다. 그러므로 염민감쥐에서 함초고압열수분무소금(GSD)과 함초식물소금(GG)의 혈압상승 억제 효과에 대한 평가는 가능하나 이들의 항당뇨 효과에 대한 평가는 불가능하다고 판단하였다.

먼저 함초고압열수분무소금(GSD)과 함초식물소금(GG)의 항당뇨 및 항산화 효를 평

가하고자, leptin receptor가 결핍되어 과식과 과음으로 인해 자발적으로 비만과 인슐린 저항성이 유발되는 db/db mice에 1% NaCl의 되도록 2% 함초고압열수분무소금(GSD, 50% NaCl)과 함초식물소금(GG, 50% NaCl) 및 1% NaCl의 천일염을 첨가하여 제조된 사료들을 각각 5주 동안 식이 시켰다. 그 결과, 함초고압열수분무소금(GSD)과 함초식물소금(GG)은 식이를 하는 동안 혈당변화와 포도당부하내성실험에서 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 두 식이군의 혈중 insulin 수치는 대조군에 비해 낮고 SS 식이군보다 높았으나 집단 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 또한 함초식물소금(GG)이 함초고압열수분무소금(GSD) 보다 높은 insulin 수치를 보였다. 이들 식이군은 대조군(C)에 비해 혈중 insulin 함량이 적음에도 불구하고 식이 기간 동안 혈당 수치는 대조군과 유사한 것으로 보아, 이들 소금은 인슐린 분비를 촉진할 뿐만 아니라 혈중 인슐린 분해를 지연하거나 인슐린 신호전달 향상에 도움을 주는 인자가 존재하고 있는 것으로 시사된다. 또한 장기간의 혈당 수준 및 당뇨와 합병증의 진단에 지표로 사용되고 있는 혈중 HbA1c 함량의 경우 함초식물소금 식이군(GG)과 함초고압열수분무소금 식이군(GSD)이 대조군과 천일염 식이군에 비해 낮은 수치를 나타내 두 소금은 당화혈색소 형성을 억제한 것으로 해석되어 당뇨 합병증 예방이 기대된다.

함초고압열수분무소금(GSD)과 함초식물소금(GG) 식이가 db/db mice에서 산화적 스트레스(oxidative stress)에 미치는 영향을 알아보고자, 혈액과 간에서 지질과산화 산화물(malondialdehyde, MDA) 함량을 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)법에 의해 조사하였다. 흥미롭게도 간 조직과 혈액에서 함초고압열수분무소금 식이군(GSD)과 함초식물소금 식이군(GG)의 MDA 함량은 대조군(C)에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다( $p < 0.05$ ). 간 조직에서는 함초식물소금 식이군(GG)이 혈액에서는 함초고압열수분무소금 식이군(GSD)이 더 낮은 MDA 함량을 나타냈다. 그러므로 함초와 실험에 사용한 생물소재는 체내에서 활성산소를 제거하거나 지질 산화물 생성을 억제할 수 있는 산화적 스트레스를 줄여 주는 항산화 효과가 있는 것으로 해석되었다. 그에 더하여 이들 함초소금들은 지방조직에서 세포가 사멸되어 생성되는 crown-like structure 형성 수가 적었고 신장 기저막의 두께가 정상쥐인 db/lean mice의 그것과 더 유사함을 알 수 있었다. 따라서 함초소금들은 체내 산화적 손상을 적게 주고 신장, 간, 지방 등의 조직 기능에 긍정적인 영향을 준 것으로 시사되었다.

라) 염민감쥐에서 함초고압열수분무소금과 함초식물소금의 혈압 상승 억제 및 항산화 효과

합초를 이용하여 제조된 합초소금(GSD)과 합초와 건강기능성이 우수한 식물자원과 혼합하여 제조한 합초식물소금(GG)의 식이가 소금 섭취로 인해 자발적으로 혈압이 상승하는 염 민감쥐인 Dahl salt-sensitive rat에서 혈압 상승 억제 효과를 조사한 바에 의하면, 합초와 건강기능성이 우수한 식물자원과 혼합하여 제조한 합초식물소금(GG)은 식이기간 동안 소금섭취로 인해 염 민감쥐의 혈압이 상승하여야 하나, 식이 전보다 약간 상승하였을 뿐 식이전과 거의 유사한 수축기와 이완기 혈압을 나타냈다. 또한 두 합초소금들(GSD, GG)은 천일염(SS)에 비해 낮은 ACE 저해 활성을 보였으며, NO 생성량을 증가시켜 혈압을 낮추는데 관여하는 VEGF의 발현량을 높이고, myosin phosphatase를 저해하여 혈관긴장도(vascular tone)를 높여 혈압을 상승시키는데 관여하는 RhoA 발현량이 낮추어 혈압 상승을 억제하는 것으로 나타났다. 그에 더하여 이들 합초소금들은 혈중의 지질과산화물과 간에서의 단백질 산화물의 함량이 낮아, 과다 소금섭취로부터 오는 산화적 스트레스를 줄여 준 것으로 나타났다. 그리고 지방조직에서 인슐린 신호전달에 negative 조절 인자인 pIRS1<sup>Ser307</sup>의 발현량은, 합초소금 식이군들(GSD, GG)이 천일염(SS) 식이군보다 낮게 나타내 이들 소금이 염 민감쥐에서 인슐린 신호전달 개선에 효과가 있음을 알 수 있었다. 그러므로 합초를 이용한 합초소금(GSD)과 합초에 건강기능성이 우수한 생물자원과 혼합하여 제조된 합초식물소금(GG)은 혈압상승을 억제하고 체내에서 산화적 스트레스를 줄이는 식품소재로 개발이 가능할 것으로 기대된다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구 성과

- 함경식 등. 함초 고압열수추출물 및 일반열수추출물의 생리활성 평가. 한국식품영양학회. P8-121 (학술발표, 2009년)
- 함경식 등. 추출조건에 따른 함초열수추출물의 생리활성 및 유용성분 비교. 한국식품과학회. P09-017 (학술발표, 2010년)
- 태평소금, The 9th International Symposium on Salt, 함초고압열수추출분말, 중국 베이징, 중국염업총공사, (전시회, 2009년)
- 태평소금, 2009 광주국제식품전, 함초고압열수추출분말, 함초소금, 해조금 등, 김대중컨벤션센터, 광주광역시, (전시회, 2009년)
- 태평소금, 2010 국제소금박람회, 함초고압열수추출분말, 함초소금, 해조금 등, 김대중컨벤션센터, 광주광역시, (전시회, 2010년)

### 2. 활용계획

- 혈압 상승 억제 효과가 있는 함초소금의 제조 기술 구축(기술이전, 2011년)
- 혈압 상승 억제 효과가 있는 식물소금의 제조 기술 구축(기술이전, 2011년)
- 혈압 상승 억제 효과를 갖는 함초소금의 작용 기전 해명 (논문투고, 2011년)
- 함초소금과 함초와 생물자원을 혼합하여 혈압상승 억제 효과가 우수한 갖는 함초식물소금의 상품화(2011년)
- 함초고압열수분무소금을 이용한 함초고압열수분무소금원단의 상품화 (2011년)
  - 함초고압열수분무소금 제품의 단점인 수분 흡습 방지
- 함초미세분말과 초미세분말을 이용한 함초미세분말원단과 함초초미세분말원단의 제조 (2011년)
  - 함초고압열수분무소금원단 제품의 고 생산 단가 절감

## SUMMARY

### I. Title

Development of plant-derived salts that are effective in reducing blood pressure

### II. Objectives and significance

○ The best reason people want to reduce dietary salt is because salt increases blood pressure. Therefore, it is necessary to develop a salt that has ability to reduce blood pressure. It is known that minerals including Mg, K, and Ca are important in the reduction of blood pressure. Many plants contain substances (e.g. ACE inhibitors, etc.) that are good in the reduction of blood pressure.

○ Halophytes including glasswort contain high contents of minerals such as Mg, K, and Ca, antioxidants, and angiotensin-converting enzyme inhibitors. Some halophytes contain large quantity of NaCl. The salt made of only halophyte extracts contain about 50-60% NaCl. Thus, the salt made of halophyte extracts and other plant extracts that contain blood pressure-lowering substances may work in the reduction of blood pressure. In this research, we screened plant extracts that contain blood-pressure lowering substances and designed salts that could work in the reduction of blood pressure. Then, the salt was evaluated using various types of rats and mice including salt-sensitive rats and type 2 diabetic mice for the activity in lowering blood pressure and antidiabetic activity.

○ Halophytes grow in flat tide or soil that contains salt. They usually have large quantity of functional substances. People in coastal area have eaten some halophytes for very long time, which solves safety problem when halophytes are used as food resources. Furthermore, many halophytes are very good source of minerals. Recently, mineral deficiency is increasing rapidly especially in developed countries. It is estimated that more than 50%

of adults are suffering from mineral-deficiency. However, there are not many good sources for minerals in traditional agricultural products. Therefore, halophytes must be an item to be investigated further as a food resources.

### III. Research results and suggestions

Among halophytes, glasswort was used in this study as this plant has been studied well and contains large quantities of NaCl, minerals, and health-beneficial substances. The first part was conducted to develop a method to prepare glasswort-derived salt containing high contents of minerals and health-beneficial substances. Then, the salts were evaluated in vitro and in vivo for the blood-pressure-lowering and antidiabetic activities.

#### 1. Preparation of glasswort-derived salt

Glasswort was extracted with water at 130°C for 5 hrs as this condition extracted higher activities of antioxidant, ACE inhibition, and  $\alpha$ -glucosidase inhibition and higher contents of phenolic compounds compared to other conditions tested. The high pressure-hot water extract was used for the preparation of salt. The extract was spray-dried (GSD) or heat-concentrated and freeze-dried (GHC). Glasswort heat-concentrated and freeze-dried salt (GHC) and glasswort spray-dried salt (GSD) had similar NaCl contents and functional activities such as ACE inhibition and  $\alpha$ -glucosidase inhibition activities. However, sensory evaluation showed that GHC gave burning taste, and was not good in color and overall acceptability. Therefore, GSD was used for further experiments.

It is not easy to use GSD in real situation as it is in powder form and easy to absorb moisture. GSD was specially formulated into a particle (GSDT) that was coated with carboxymethylcellulose to prevent moisture absorption. There were no significant differences in sensory evaluation between GSD and GSDT. However, Formulation of GSD into particle is relatively expensive. Thus, we

have produced other type of glasswort-derived salts. Dry glasswort was grinded into fine powder or ultrafine powder (particle size less than 17  $\mu\text{m}$ ) and formulated into particles (termed GMT and GHT, respectively). Both glasswort-derived salts made of powder were evaluated for health-beneficial activities including antioxidant, ACE inhibitory, etc and for taste. Both GMT and GHT showed high health-beneficial activities but were not good in sensory evaluation. Therefore, we have decided to use GSD for further experiments.

## 2. Preparation of other types of plant-derived salts

We have screened other plant sources that may contain activities for lowering blood pressure. We selected two plants, and prepared extracts. These plant extracts were added to glasswort extracts and formulated into salts. These plant-derived salts showed higher ACE inhibitory, antioxidative activities and higher contents of phenolic compounds compared to GSD. One of plant-derived salts is termed GG.

## 3. Animal experiments using GSD and GG for the evaluation of blood pressure-lowering and antidiabetic activities

GSD and GG were investigated for antidiabetic activity using db/db mouse which is lacking of leptin receptor, eats too much, and becomes type 2 diabetic mouse. The db/db mice were fed 1% mineral-rich solar salt (SS), 2% GSD and GG for 5 weeks that had 50% NaCl contents. There were no significant differences in blood glucose levels and oral glucose tolerance test among the groups. Blood insulin level was higher in control group (fed no salt), but there was no statistically significant differences among the other groups. The level of glycated hemoglobin (HbA1c) was lower in GG and GSD groups than SS and control groups. GG group showed the lowest HbA1c level, indicating that GG group had been exposed to the lowest level of blood glucose. GSD group showed the next lowest level of HbA1c. It is known that the oxidative stress induces most of

metabolic syndromes including diabetes, high blood pressure, and hyperlipidemia, etc.. The oxidation of lipids was determined by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The TBARS values of plasma in GSD and GG groups were lower than those in SS and control groups. GG group showed the lowest TBARS value, indicating that GG group had the lowest oxidative stress.

GSD and GG were investigated for the blood pressure-lowering activity compared to solar salt (SS). Diets containing three different types of salts (GSD, GG, and SS) were fed to Dahl salt-sensitive rats and blood pressure was measured using telemetry blood pressure measurement instrument in which a sensor was put inside body of rat. GSD and SS groups showed gradual increments of systolic and diastolic blood pressures. GSD group showed lower blood pressure than SS group did. Surprisingly, systolic and diastolic blood pressures of GG group did not increase during 5 week period. We never expected that there is a salt that does not increase blood pressure in salt-sensitive rat. The rats fed GSD and GG showed lower ACE activity in plasma than those fed SS. Expression of VEGF (vesicular endothelial growth factor) increased in GSD and GG group compared to that of SS, which was determined by immunoblotting using antibody raised against VEGF. This results partially explain why GSD and GG had lower blood pressure as VEGF induces relaxation of blood vessel and results in lowering blood pressure. Furthermore, Rho A, which is involved in increasing blood pressure, decreased in GSD and GG group

Metabolic profiles of plasma and urine from rats fed SS, GSD and GG were investigated with UPLC-Q-TOF MS and analysed statistically using multivariate analysis. The separations between defined class samples in the metabolite data set were performed with partial least square discriminant analysis (PLS-DA).

Both PLS-DA score plots of plasma and urine showed a clear separation between SS and plant-derived salt (GSD and GG) along the axes corresponding to the first two PLS components. The score plot indicated that GSD and GG group were separated from the SS group, and the S-plot of plasma and urine indicated that each metabolite contributed to separation between SS and modified



salt groups along the axes corresponding to the combined weight ( $w^*$ ) and reliability correlation [ $p(\text{corr})$ ].

## CONTENTS

I. Introduction .....	1
1. Purpose of research .....	1
II. Review .....	4
1. Anti-hypertension .....	4
2. Anti-diabetes .....	5
3. Glasswort .....	7
III. Research content and results .....	9
1. Research approaches .....	9
2. Research contents .....	10
3. Research results .....	11
3-1. The production of glasswort-derived salt using hot water extracts .....	15
A. Materials .....	15
1) Salt manufacturing method .....	15
B. Methods .....	16
1) NaCl content .....	16
2) Moisture content .....	16
3) pH .....	16
4) Color .....	16
5) ACE inhibition assay .....	16
6) $\alpha$ -Glucosidase inhibition assay .....	17
7) Protein tyrosine phosphatase inhibition measurement .....	17
8) DPPH free radical-scavenging activity measurement .....	18
9) ABTS <sup>+</sup> radical-scavenging activity measurement .....	18
10) Determination of total phenolic compound .....	18
11) HPLC analysis of caffeic acid and ferulic acid .....	18
12) Sensory evaluation .....	19
C. Results and Discussion .....	20
1) Physicochemical properties of glasswort salts .....	21
2) Mineral composition of glasswort salts .....	21

3) Agiontensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of glasswort salts .....	22
4) $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activities of glasswort salts .....	23
5) PTP1B inhibitory activities of glasswort salts .....	24
6) DPPH radical-scavenging activities of glasswort salts .....	25
7) ABTS+ radical-scavenging activities of glasswort salts .....	26
8) Total phenolic compounds of glasswort salts .....	27
9) Caffeic acid and ferulic acid contents of glasswort salts .....	28
10) Sensory evaluation of glasswort salts .....	31
3-2. The production of glasswort-salt particles using glasswort hot water extract and glasswort ultra fine powder. ....	32
A. Materials and methods .....	33
1) Manufacturing plant salt .....	33
(1) Preparation of spray dried glasswort-derived salt particle (GSDT) using glasswort hot water extract .....	33
(2) Preparation of a salt (GMT) made of glasswort powder .....	33
(3) Preparation of a salt (GHT) made of glasswort ultra fine powder .....	33
B. Methods .....	33
C. Results .....	36
1) Manufacturing of glasswort spray dried salt particle (GSDT) prepared using glasswort hot water extract .....	36
2) Manufacturing of GMT and GHMT .....	36
3) General composition of glasswort-driven salts .....	37
4) Agiontensin Converting Enzyme (ACE) inhibitory activities of various glasswort-derived salts .....	38
5) $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activities of various glasswort-derived salts .....	39
6) DPPH radical-scavenging activities of various glasswort-derived salts .....	40
7) ABTS+ radical-scavenging activities of various glasswort-derived salts .....	41
8) Total phenolic compound contents of various glasswort-derived salts .....	42
9) Caffeic acid and ferulic acid contents of various glasswort-derived salts .....	43

10) Sensory evaluation of various glasswort-derived salts .....	44
11) Change of moisture content during storage of glasswort-derived salts .....	44
3-3. The manufacturing of glasswort and plant-derived salts and their biological effects .....	46
A. Materials .....	46
1) Manufacturing of glasswort-derived salts .....	46
B. Methods .....	47
C. Results .....	47
1) Physicochemical properties of glasswort and plant-derived salts .....	47
2) Agiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of glasswort and plant-derived salts .....	47
3) $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activities of glasswort and plant-derived salts ..	48
4) Total phenolic compound contents of glasswort and plant-derived salts .....	49
5) Caffeic acid and ferulic acid contents of glasswort and plant-derived salts .....	49
6) Radical-scavenging activity of glasswort salt .....	50
3-4. The effects of lasswort and plant-derived salts on blood pressure and diabetes in Dahl Salt-Sensitive rats .....	52
A. Methods .....	52
1) Animal experiment .....	52
2) Growing condition .....	52
3) Diet preparation and administration methods .....	53
4) Food, water intake, and food efficiency ratio .....	53
5) Animal blood pressure measurement .....	53
6) Oral glucose tolerance test (OGTT) .....	53
7) Glucose uptake .....	53
8) Statistical analysis .....	54
B. Results .....	55
1) Effect of salt on blood pressure in Dahl salt sensitive rats .....	55
2) Effect of salt on diabetic parameters in Dahl salt sensitive rats .....	56

3-5. Effect of glasswort and plant-derived salts on blood pressure and diabetic parameters in Spraque-Dawley rats .....	58
A. Materials and methods .....	58
1) Animal experiment .....	58
2) Experimental Design .....	58
3) Oral glucose tolerance test (OGTT) .....	59
4) Blood samples .....	59
5) Plasma lipid concentration .....	59
6) Blood pressure measurement .....	59
7) Statistical analysis .....	60
B. Results and Discussion .....	61
1) Weight gain and food intake .....	61
2) Glucose tolerance test .....	62
3) Change of blood pressure in rats fed diets containing salts .....	52
4) Serum triglyceride and cholesterol levels .....	65
 3-6. Effect of glasswort and plant derived salts on blood pressure in db/db mice ·	67
A. Materials and methods .....	67
1) Animal experimental and dietary composition .....	67
2) Measurement of blood glucose .....	68
3) Measurement of blood glycated hemoglobin HbA1c .....	68
4) Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) .....	68
5) Sacrifice and sampling methods .....	69
6) Determination of serum insulin .....	69
7) Serum Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) measurement .....	69
8) Western blotting .....	69
9) Histological examination .....	70
10) Data Processing .....	70
B. Results and Discussion .....	71
1) Body weight gain .....	71

2) Water intake .....	72
3) Blood glucose levels .....	73
4) Glucose tolerance test .....	74
5) Serum insulin concentration .....	75
6) Glycated hemoglobin (HbA1c) concentration .....	76
7) Lipid peroxidation contents in blood .....	78
8) Lipid peroxidation contents in liver .....	79
9) Expression level of NF- $\kappa$ B in adipose tissue .....	80
10) Histologic photomicrogram of adipose tissue .....	81
11) Distribution of lipid droplets in liver .....	85
12) Histologic photomicrogram of kidney tissue .....	88
3-7. The effect of glasswort salts on blood pressure and diabetic parameters in Dahl Salt-Sensitive Rats .....	93
A. Materials and methods .....	93
1) Materials and reagents .....	93
2) Animal experiment .....	94
3) Diet preparation .....	94
4) Water intake and food efficiency .....	94
5) Blood pressure measurement .....	96
6) Sacrifice and blood collection .....	96
7) Angiotensin-converting enzyme (ACE) activity measurement .....	97
8) Measurement of plasma lipid peroxide content .....	97
9) Determination of protein carbonyl compounds (PCOs) .....	97
10) Western blotting .....	98
11) Statistical analysis .....	98
B. Results and Discussion .....	99
1) General Characteristics .....	99
2) Blood pressure .....	101
(1) Systolic blood pressure .....	101
(2) Diastolic blood pressure .....	102

3) Plasma ACE activity .....	103
4) Protein expression levels of factors regulating blood pressure .....	105
5) Plasma electrolyte concentration .....	106
6) Mineral composition in urine .....	107
7) Content of serum lipid peroxide .....	109
8) Protein oxidation products in liver .....	110
9) Expression levels of pIRS1ser <sup>307</sup> in adipose tissue .....	111
10) Metabolic profiling .....	112
References .....	118

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	1
1.	연구개발의 목적 .....	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	4
1.	고혈압에 대한 국내외 연구현황 .....	4
2.	항당뇨에 대한 국내외 연구현황 .....	5
3.	함초에 대한 국내외 연구현황 .....	7
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	9
1.	이론적 및 실험적 접근방법 .....	9
2.	연구내용 .....	10
3.	연구결과 .....	13
3-1.	함초고압열수추출물을 이용한 함초소금의 제조 .....	15
가.	재료 및 방법 .....	15
1)	소금의 제조 .....	15
나.	실험 방법 .....	16
1)	NaCl 함량 측정 .....	16
2)	수분 함량 분석 .....	16
3)	pH 변화 측정 .....	16
4)	색도 변화 측정 .....	16
5)	ACE 저해 활성 측정 .....	16
6)	$\alpha$ -Glucosidase 저해 측정 .....	17
7)	Protein tyrosine phosphatase (PTP1B) 저해 활성 측정 .....	17
8)	DPPH free radical-scavenging 활성 측정 .....	18
9)	ABTS <sup>+</sup> radical-scavenging 활성 측정 .....	18
10)	총페놀성 화합물 함량 측정 .....	18
11)	HPLC에 의한 caffeic acid 및 ferulic acid의 분석 .....	18
12)	관능평가 .....	19
다.	실험 결과 .....	20
1)	함초소금의 이화학적 특성 .....	21



2) 함초소금의 미네랄 함량 .....	21
3) 함초소금의 Agiontensin I Converting Enzyme (ACE) 저해 활성 .....	22
4) 함초소금의 $\alpha$ -glucosidase 저해 활성 .....	23
5) 함초소금의 PTP1B 저해 활성 .....	24
6) 함초소금의 DPPH radical-scavenging 활성 .....	25
7) 함초소금의 ABTS <sup>+</sup> radical-scavenging 활성 .....	26
8) 함초소금의 총 페놀성 화합물 함량 .....	27
9) 함초소금의 caffeic acid 및 ferulic acid 함량 .....	28
10) 함초소금의 관능평가 .....	31
3-2. 함초고압추출분말소금과 함초미세분말을 이용한 함초원단의 제조 .....	32
가. 재료 및 방법 .....	33
1) 식물소금의 제조 .....	33
(1) 함초고압열수분무소금(GSD)을 이용한 함초분무소금원단(GSDT)의 제조 ..	33
(2) 함초미세분말원단(GMT)의 제조 .....	33
(3) 함초초미세분말원단(GHT)의 제조 .....	33
나. 실험 방법 .....	33
다. 결과 .....	36
1) 함초고압열수분무소금(GSD)을 이용한 함초분무소금원단(GSDT)의 제조 ..	36
2) 함초미세분말원단(GMT)과 함초초미세분말원단(GHMT)의 제조 .....	36
3) 함초소금원단과 함초분말원단의 이화학적 특성 .....	37
4) 함초소금원단과 함초분말원단의 ACE 저해 활성 .....	38
5) 함초소금원단과 함초분말원단의 $\alpha$ -glucosidase 저해 활성 .....	39
6) 함초소금원단과 함초분말원단의 DPPH radical-scavenging 활성 .....	40
7) 함초소금원단과 함초분말원단의 ABTS <sup>+</sup> radical-scavenging 활성 .....	41
8) 함초소금원단과 함초분말원단의 총페놀성 화합물 함량 .....	42
9) 함초소금원단과 함초분말원단 산가수분해물의 caffeic acid 및 ferulic acid 함 량 .....	43
10) 함초소금원단과 함초분말원단의 관능평가 .....	44
11) 저장기간 중 GSD의 수분함량 변화 .....	44
3-3. 함초와 생물자원을 이용한 함초식물소금의 제조 .....	46
가. 재료 및 방법 .....	46

1) 식물소금의 제조 .....	46
나. 실험 방법 .....	47
다. 결과 .....	47
1) 함초식물소금들의 이화학적 특성 .....	47
2) 함초식물소금들의 ACE 저해활성 .....	47
3) 함초식물소금의 $\alpha$ -glucosidase 저해활성 .....	48
4) 함초식물소금의 총페놀성 화합물 함량 .....	49
5) 함초식물소금의 caffeic acid와 ferulic acid 함량 .....	49
6) 함초식물소금의 항산화 활성 .....	50
3-4. 염 민감쥐에서 함초고압열수분무소금원단 (GSDT)과 함초마늘소금(GG)이 혈압과 당뇨에 미치는 영향 .....	52
가. 실험방법 .....	52
1) 실험동물 .....	52
2) 사육조건 .....	52
3) 사료 제조 및 투여방법 .....	53
4) 사료 및 물 섭취량, 식이효율 .....	53
5) 실험동물 혈압 측정방법 .....	53
6) 포도당 내성검사(OGTT; Oral glucose tolerance test) .....	53
7) 지방조직 및 근육조직에서의 포도당 이용율(glucose uptake) 측정 .....	53
8) 자료처리 .....	54
나. 결과 .....	55
1) 염민감쥐에서 소금이 혈압에 미치는 영향 .....	55
2) 염민감쥐에 소금이 당뇨에 미치는 영향 .....	56
3-5. 정상쥐에서 식물소금들이 혈압과 당뇨에 미치는 영향 .....	58
가. 실험 재료 및 방법 .....	58
1) 실험동물 .....	58
2) 실험계획 .....	58
3) 포도당 내성검사(OGTT; Oral glucose tolerance test) .....	59
4) 혈액 채취 .....	59
5) 혈장 지질 농도 측정 .....	59
6) 혈압측정 .....	59

7) 자료처리 .....	60
나. 결과 .....	61
1) 체중증가량 및 식이섭취량 .....	61
2) 포도당내성실험 .....	62
3) 혈압의 변화 .....	63
4) 혈중 중성지방 및 콜레스테롤 함량 .....	65
3-6. db/db mice에서 식물소금의 항당뇨 및 항산화 효과 .....	67
가. 실험 재료 및 방법 .....	67
1) 실험동물 및 식이 조성 .....	67
2) 혈당(Blood glucose) 측정 .....	68
3) 당화혈색소(HbA1c) 측정 .....	68
4) 포도당 내성검사(IPGTT; Intraperitoneal glucose tolerance test) .....	68
5) 희생 및 채혈 방법 .....	69
6) 혈청에서의 insulin 함량 측정 .....	69
7) 혈청에서의 Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) 측정 .....	69
8) Western blotting .....	69
9) 조직병리학적 검사 .....	70
10) 자료처리 방법 .....	70
나. 결 과 .....	71
1) 체중 증가량 변화 .....	71
2) 물 섭취량 변화 .....	72
3) 혈당 변화 .....	73
4) 포도당 대한 내성 검사 .....	74
5) 혈중 Insulin 함량 .....	75
6) 당화혈색소(Ha1c) 함량 .....	76
7) 혈중 지질과산물 함량 비교 .....	78
8) 간의 지질과산물 함량 비교 .....	79
9) 지방조직에서 NF-kB의 발현량 .....	80
10) 지방조직의 Histological photomicrogram .....	81
11) 간조직에서의 지방구 분포 .....	85
12) 신장조직의 histogram .....	88

3-7. 식물소금들이 염민감쥐에서 혈압 상승 억제에 미치는 영향 .....	93
가. 재료 및 방법 .....	93
1) 재료 및 시약 .....	93
2) 실험동물 및 식이조성 .....	94
3) 물 섭취량 및 식이효율 .....	94
4) 혈압 측정 .....	94
5) 희생 및 채혈 .....	96
6) Angiotensin I -converting enzyme (ACE) 활성 .....	96
7) 혈장에서의 무기질 함량 분석 .....	97
8) 혈장의 지질과산화물 함량 측정 .....	97
9) 단백질 카르보닐화 화합물(PCOs) 함량 측정 .....	97
10) Western blotting .....	98
11) 통계처리 .....	98
나. 결과 및 고찰 .....	99
1) 일반 특성 .....	99
2) 혈압 .....	101
(1) 수축기혈압 .....	101
(2) 이완기혈압 .....	102
3) 혈중 ACE 활성 .....	103
4) 혈압 조절 인자들의 발현량 .....	105
5) 혈장에서의 전해질 함량 .....	106
6) 뇨에서의 미네랄 함량 .....	107
7) 혈중의 지질과산화물 함량 .....	109
8) 간에서의 단백질 산화 화합물 함량 .....	110
9) 조방조직 pIRS1 <sup>ser307</sup> 의 발현량 .....	111
10) Metabolic profiling .....	112
제 4 장  목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	116
제 5 장  연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	117
1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등) .....	117
2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등 .....	117
3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등 .....	117

4. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등 .....	117
제 6 장 참고문헌 .....	118

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 1. 연구개발의 목적

심혈관계 질환은 우리나라에서 주요 사망요인이며 심혈관계 질환의 대표적인 질환인 고혈압은 전체 인구의 10~15%의 유병율을 보이며 단일 사망요인으로서는 4위이다. 또한 세계보건기구(WHO)에 의하면 전 세계 당뇨병 환자의 수가 2000년 약 1억 5천만 명이 고, 2010년에는 약 2억 2천만 명에 이를 것이라고 예측하였다. 우리나라의 경우, 부적절한 생활습관 및 비만인구의 증가로 인하여 당뇨병 환자가 현재 400만 명에 달하여 전체 인구의 약 10%를 차지하고 있다.

소금은 우리 몸에서 신경자극전달, 근육수축, 영양소의 흡수와 수송, 그리고 혈액량과 혈압의 유지 등의 생명유지에 필수 물질이다. 또한 음식의 맛을 내고 삼투압을 이용한 절임용 등의 식품보존제로도 사용되고 있다. 그러나 매일 섭취하고 있는 소금을 과다하게 섭취할 경우 혈압을 상승시키고 인슐린 신호전달에 영향을 주어 인슐린 저항성을 유발시킨다고 알려져 있다. 이 결과들은 염도(NaCl)가 99%이상이고 미네랄이 거의 없는 소금들을 동물에 섭취시켰기 때문으로 추측된다. 그러므로 소금의 주성분인 NaCl이 고혈압 및 당뇨병을 유발시키는 직접적인 원인물질로 판단된다. 이로 인해 WHO/ISH에서는 성인의 소금 일일 섭취량을 5 g이하로, 2000년 Japanese Society of Hypertension에서는 7 g이하로 섭취할 것을 권장하고 있다. 이와 반대로 소금의 제한이 혈압, 심혈관 등에 관련된 근거가 부족하다는 상반된 의견도 있어 소금과 혈압의 상관관계에 관한 논쟁이 지속되고 있다.

소금은 암염, 정제염, 재제염, 천일염 등으로 크게 분류할 수 있으며 소금의 종류에 따라 미네랄 함량이 다른 것으로 알려져 있음. 즉 전 세계 모든 사람이 주로 먹고 있는 암염과 정제염은 NaCl 함량이 99%이상인 반면 K, Ca, Mg과 같은 미네랄 성분이 거의 없으나 우리나라에서 생산된 갯벌천일염은 NaCl 함량이 85%정도인 반면 K, Ca, Mg과 같은 미네랄 성분의 함량이 매우 높게 나타났다. 소금의 주성분인 Na의 과다섭취는 고혈압 및 당뇨의 원인물질로 알려져 있으나 K, Ca, Mg 등의 미네랄 성분은 혈압 상승을 억제시키고 인슐린 신호 전달에 긍정적인 영향을 준다고 보고된 바 있다. 혈압의 경우 K는 NO의 생성을 증가시켜 내피혈관을 이완시키고, Ca은 근육 및 혈관의 이완에 긍정적인 영향을 주며 또한 Mg은 NO 생성 및 혈관구조 등에 변화를 일으켜 혈압 상승 억제에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

최근 Ogihara 등은 NaCl만을 섭취시킨 염 민감쥐의 경우 혈액으로부터 당 흡수에 관여하는 glucose transporter-4 (GLUT4)의 작용을 억제함으로써 인슐린 신호전달을 저해한다고 보고하였다. 그러나 여기에 KCl를 보충하여 섭취시킨 염민감 쥐에서는 인슐린 신호 전달 작용이 정상적으로 이루어진다고 밝혔다. 이는 칼륨이 NaCl로부터 오는 인슐린 신호 전달 작용의 저해를 낮추어 인슐린 저항성을 줄여 준 것으로 판단된다. 최근 목포대학교 천일염생명과학연구소는 인슐린 신호 전달에 있어 미네랄이 거의 없는 NaCl만을 섭취시킨 염 민감쥐의 경우 insulin receptor substrate-1 (IRS-1)의 serine phosphorylation을 증가시켜 인슐린 신호전달이 저해하였으며 미네랄이 풍부한 천일염을 섭취시킨 쥐는 IRS-1의 serine phosphorylation이 감소하여 인슐린신호 전달이 증가하고 glucose uptake가 증가하다는 것을 밝혀지고 있다. 이상의 내용을 살펴보면, Na를 제외한 K, Ca, Mg 등의 미네랄 성분들은 혈압 상승 억제 혹은 인슐린 저항성을 낮추는데 긍정적인 영향을 주는 것으로 시사되었다.

한편 NaCl 농도를 낮추고 다른 미네랄 성분을 인위적으로 첨가한 저염소금 제품도 출시되고 있다. 그러나 미네랄에 따라 다소 차이가 있지만 인체에 이롭고 해로운 미네랄의 농도 범위는 매우 좁으므로 균형 잡힌 미네랄이 함유된 소금의 섭취가 건강에 더 이로울 것으로 판단된다. 최근 많은 과학자들은 당뇨병을 비롯한 비만, 고지혈증, 고혈압 등의 대사성 증후군에 예방 효과가 있거나 치료제 개발을 위하여 고서에 효과가 있다는 한약재 혹은 다양한 생물자원을 대상으로 활발히 조사하고 있다. 또한 이들 대사성 증후군의 발병 원인 및 이들에 효과가 있는 생물자원 혹은 유기물질의 작용 기전을 해명하고 있다. 천연자원에서 얻어진 추출물 혹은 유기물질과 미네랄이 풍부한 소금을 동시에 섭취하였을 때 당뇨 및 고혈압 등에 상승효과가 있을 것으로 기대되나 이와 같은 유기물질과 무기물질 간의 상관관계에 대한 연구는 아직까지 이루지지 않고 있는 실정이다. 더욱이 유용식물 추출물과 소금을 혼합하여 만들어진 식물소금들이 일부 출시되고 있으나 유용생물자원이 갖는 기능성만이 언급되어질 뿐 식물소금이 갖는 기능성에 대한 과학적 근거를 제시한 바 없다.

함초는 혈압상승억제 및 항당뇨 효과를 갖는 식물소금 개발에 적합한 소재로, 다른 식물과 달리 높은 염도에서 성장하며 자체 염도(15%) 또한 높고 바닷물로부터 생명체에 유익한 미네랄을 흡수하여 Ca, K, Mg, Fe, Zn 등의 미네랄 성분을 과량 함유하고 있다고 보고된 바 있다. 이 식물은 명아주과의 통통마디(*Salicornia herbacea* L.)의 한해살이 초본 식물로 칠면초, 해홍나물 등과 함께 우리나라 서해안과 남해안 바닷가에 자생하는 염

생식물이다. 함초는 중국의 <신농본초경>과 일본의 <대화본초>에 고혈압, 암, 당뇨병, 갑상선 기능저하, 피부병, 관절염 등의 치료에 사용하였다는 기록이 있음. 또한 무기질, 필수 아미노산 및 필수 지방산이 다량 함유되어 있을 뿐만 아니라 유용 폐놀성 화합물, 면역기능향상에 영향을 주는 다당체, 간에서 지방 축적 억제에 관여하는 콜린, 그리고 간 기능 보호에 관여하는 베타인 등의 유용성분이 함유되어 있다고 알려져 있다. 최근 항산화, 항비만, 항당뇨, 혈중 콜레스테롤 저하, 간 보호 기능, 면역 조절 기능 상승, 그리고 미백 등의 다양한 생리활성을 갖는다고 과학자들에 의해 밝혀지고 있다. 함초는 자체 높은 염도를 가지므로 인위적으로 소금 첨가 없이 함초소금의 생산이 가능할 것으로 판단된다. 또한 그 외에도 혈압 상승 억제 및 항당뇨 효과가 있는 유용생물자원과 함초를 혼합하여 혈압 상승 억제 및 항당뇨 효과가 높은 다양한 식물소금들의 생산이 가능할 것으로 시사된다.

그래서 본 연구에서는 함초추출물로 만든 소금, 초미세 함초분말소금 제조, 그리고 함초추출액에 다른 식물추출액 첨가를 통하여 기능이 향상된 식물소금 등을 제조하고자 한다. 즉 함초에 많이 있는 마그네슘 함량은 소금의 나트륨 배설을 촉진시킬 뿐만 아니라 혈관 확장인자인 prostacyclin을 증가시키고 혈관축소인자인 thromboxane을 감소시켜 혈압을 낮추는 것으로 알려져 있다. 또한 2형 당뇨의 원인이 주로 인슐린 신호전달의 장애 때문인데 마그네슘은 인슐린 신호전달을 도와 2형 당뇨를 개선할 것으로 기대된다. 또한 본 연구에서는 함초소금에 유용 식물추출물을 첨가하여 혈압강하 혹은 다른 기능성 향상을 위한 식물소금을 제조하려고 한다.

본 연구에서는 함초소금 및 함초식물소금의 제조 기술을 확립하고 이들 제품의 건강우수성을 검증하여 혈압상승억제 및 항당뇨 효과를 갖는 고품질의 식물소금 제품 개발 및 산업화를 목적으로 한다. 보다 상세하게는 함초소금 및 식물소금의 혈압 상승 억제 및 항당뇨 작용 기전 해명, 가장 기능이 증진된 이들 소금의 제조공정 표준화 기술 개발, 대량생산을 위한 설비개선 및 구축, 그리고 고품질의 제품 생산을 통해 고부가가치 창출하고자 하였다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 고혈압에 대한 국내외 연구 현황

최근 생활수준의 향상과 더불어 평균수명이 연장되면서 만성질환으로 인한 사망률이 증가하고 있으며 WHO는 전 세계 사망원인의 60%를 심혈관계 질환, 당뇨병, 비만, 암 등의 만성질환이 차지하고 있다고 보고하였다. 그 중 심혈관계 질환은 우리나라에서 주요 사망요인으로 지적되고 있으며 심혈관계 질환의 대표적인 질환이 고혈압이다. 고혈압은 비정상적으로 혈압이 상승되어 있는 상태를 말하며 심혈관의 병을 악화시켜 사망률을 높이는 주된 원인 중 하나로 수축기 혈압이 140 mmHg 이상, 이완기 혈압이 90 mmHg 이상일 경우 고혈압으로 정의하고 있다. 고혈압의 종류에는 본태성 고혈압과 이차성 고혈압이 있으며 그 중 본태성 고혈압은 원인을 알 수 없는 고혈압으로 고혈압 환자의 80~90%를 차지하고 있다. 본태성 고혈압의 원인은 확실히 밝혀져 있지 않으나 염 민감성(본태성 고혈압 환자의 30~50%를 차지하며 일주일간 고염(200~250 mEq Na<sup>+</sup>/day)을 섭취하였을 경우 혈압의 10%가 증가) 등의 유전적 요인이 크게 작용하며 또한, 스트레스, 비만, 정신적 상태의 변화, 식염의 과다섭취 등의 원인으로도 발생하는 것으로 알려져 있다. 특히, 1954년 Dahl과 Love등은 Na의 양이 혈압에 영향을 미치는 것으로 밝힌 이래 지금까지 소금과 혈압의 관련성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

혈압은 체내에서 renin-angiotensin-aldosterone system에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 즉, renin과 angiotensin I converting enzyme (ACE)의 연차적인 반응에 의해 혈압의 항상성을 유지시키는 중요한 생리적 기작 중 하나이다. ACE는 renin에 의해 angiotensinogen에서 전환된 불활성형인 angiotensin I을 활성형의 angiotensin II로 전환하는 효소로 알려져 있다. 이렇게 생성된 angiotensin II는 강력한 혈관수축 작용을 가지며 aldosterone을 생성하여 혈압을 상승시키는 것으로 보고되고 있다. 또한 혈관 내피층은 혈관의 수축 및 이완을 조절하는 물질을 유리시키는데 이 중 대표적인 내피의존 이완인자(Endothelium derived relaxing factor, EDRF)로 nitric oxide (NO)이다. NO는 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성되고 이것은 cytosolic guanylate cyclase을 활성화시켜 cGMP를 증가시켜 혈관을 이완시킨다고 한다. 또한 혈관확장에 관여하는 prostacyclin은 arachidonic acid의 cyclooxygenase 작용에 의해 생성되는 대사물질로 혈관내피 세포에 의해 지속적으로 혈액내로 분비되고 혈소판 응집 억제 효과와 혈압강하 효과

를 갖으며 이와 반대로 thromboxane은 혈관수축에 관여하는 물질로 혈압 상승을 유발하는 것으로 알려져 있다. 체내 조직에서 G-protein-coupled receptors에 의해 활성화된 중간매개체인 endothelin-1, catecholamines, vasopressin, serotonin, thromboxane 그리고 angiotensin II는 염 의존성에 관련 물질로, 혈압 혹은 조직 손상에 영향을 준다고 많은 연구들이 보고하고 있다.

혈압 상승에 원인되는 주요 성분인 소금은 혈관의 구조의 변화를 유발하고 산화적 스트레스를 유발하여 내피세포의 기능장애 및 심근혈관의 기능저하를 발생하여 혈압을 상승시키는 등 건강에 부정적인 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 이러한 염분섭취에 따른 문제점들로 인하여 과량의 소금섭취를 지양하고 있다. 동물실험에서 혈압 연구에 사용된 소금으로는 미네랄이 거의 없는 소금이었으며, 미네랄이 다량 함유된 소금에 대한 연구는 미비한 실정이었다. 미네랄 중 Na와 K, Ca, Mg 등의 미네랄은 혈압 상승을 억제하는 것으로 알려져 있다. 즉 K는 NO의 생성을 증가시켜 내피혈관을 이완시키며 Ca은 근육 및 혈관의 수축이완에 영향을 주며 고혈압환자의 경우 혈관을 이완시킴으로 혈압을 감소시킨다. 또한, Mg은 NO 생성 및 혈관구조 등에 변화를 일으켜 혈압에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

## 2. 항당뇨에 대한 국내·외 연구 현황

당뇨병은 인슐린이 결핍되거나 인슐린 감수성이 저하되어 혈중의 당을 이용하지 못해 소변으로 포도당을 배출하는 당대사 이상 질환을 말한다. 혈당 조절에 주요한 성분인 insulin은 혈당을 낮추도록 조절하는 호르몬으로, 혈액 내 포도당의 농도가 증가되면 췌장에서 insulin 분비가 증가되어 포도당을 조직 내로 유입시켜 혈액 내에 일정 농도의 포도당 농도를 유지하는 역할을 한다. 정상인의 경우 체내 insulin resistance와 secretion 간의 균형을 이루어 혈당이 항상 정상 범위 내에서 조절되나 insulin이 결핍 혹은 감수성이 저하되면 혈중의 당분을 이용하지 못해 혈액 내 insulin의 농도가 증가한다. Insulin resistance에 의해 체내에 있는 인슐린의 양이 같은 정도이더라도 혈당 강하 작용이 약해지고, 이에 따라 혈당을 정상으로 유지하기 위해서는 더욱 많은 insulin을 필요로 한다. 이에 따라 insulin resistance를 보충하기 위하여 다량의 insulin이 체내에 분비되는 현상을 고인슐린혈증(hyperinsulinemia)이라고 한다. 또한, insulin의 과잉분비는 식욕을 높여 지방합성을 촉진할 뿐만 아니라 지방분해를 억제하여 비만을 유도할 수 있다.

당뇨병은 크게 제1형 당뇨병과 제2형 당뇨병으로 구분된다. 제1형 당뇨병은 인슐린 의존형 당뇨병으로, 인슐린을 분비하는 췌장 베타 세포( $\beta$ -cell)의 손상으로 인하여 인슐린의 생산과 분비가 감소하여 발생한다. 제2형 당뇨병은 인슐린 비의존형 당뇨병으로 혈당이 정상 이상으로 높아진 상태이며, 근육, 지방 및 간 등의 말초조직에서 인슐린 작용의 저하와 췌장에서의 인슐린 분비의 균형이 깨어졌을 때 발생한다. 대부분의 당뇨병 환자는 제2형 당뇨병으로 진행되기 이전에 인슐린 저항성과 고인슐린혈증을 나타낸다. 이를 극복하지 못하면 결국 제2형 당뇨병으로 진행된다. 우리나라의 경우, 최근 10년 동안 제2형 당뇨병 환자의 수가 급증하고 있다.

인슐린 신호전달에 대한 연구는 1985년부터 시작한 이래 현재 다양한 기전이 밝혀졌다. 인슐린이 세포막의 insulin receptor에 결합하면 receptor에 자동인산화작용을 거쳐 insulin receptor substrate(IRS)의 protein tyrosine domain이 결합하여 IRS 단백질의 tyrosine이 인산화한다. 이어 phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate kinase을 활성화하고 Akt를 인산화시킨 다음 glucose transporter-4 (GLUT4)를 세포막으로 translocation시킴으로써 세포내로 포도당을 흡수하여 저장하거나 에너지로 이용하게 됨이 밝혀졌다. 그 외에도 인슐린 신호전달인자들은 단백질 합성과 apoptosis 등의 생리적 기능에 직간접적으로 연계되어 있는 것으로 알려져 있다.

많은 연구자들은 인슐린 분비 촉진 및 인슐린 신호전달인자들의 생화학적 분석을 통하여 식품 및 한약재 등의 생물자원에서부터 항당뇨에 우수한 소재를 발굴하고, 더 나아가 항당뇨 치료제 개발에 그 작용 기전을 설명하고 있다. 현재 당뇨병 및 당뇨성 합병증을 치료하기 위해 설폰요소제 등을 포함한 인슐린 분비 촉진제, 치아졸리딘다이온 등과 같은 인슐린 감작제 또는 알파-글루코시다아제 억제제 등이 이용되고 있으며, 이러한 경구용 약제의 효과가 없을 때 인슐린을 처방하고 있다. 당뇨에 직접적인 관계는 없는  $\alpha$ -glucosidase 억제제는 소장의  $\alpha$ -glucosidase 및 췌장의  $\alpha$ -glucosidase를 억제하여 복합 탄수화물의 소화를 감소시킴으로써 포도당의 흡수를 지연시켜 탄수화물 섭취에 의한 식후 혈당상승을 감소시킬 수 있고, 인슐린 분비를 증가시키지 않아 저혈당의 위험이 없다는 장점이 있다. 또한 항당뇨에 우수한 유용생물자원의 발굴 및 항당뇨 활성 물질 탐색에는 protein tyrosine phosphatase (PTP1B)와  $\alpha$ -glucosidase에 대한 효소 저해 검정법을 널리 이용하고 있다. 특히 PTP1B 효소는 insulin receptor (IR)의 자동 탈인산화 작용에 관여하는 효소로 알려져 있으며, 이를 저해함으로써 세포내 인슐린의 감작성 증가와 IR 자동 탈인산화 작용의 지연 효과가 기대된다.

한편, 순수한 NaCl 또는 식용으로 주로 사용되는 정제염을 이용한 소금과 관련된 연구

들은 소금의 섭취가 인슐린 저항성에 영향을 미친다고 보고하고 있다. 즉, 소금의 과량 섭취는 고혈압 등의 혈관질환을 유발할 수 있고, 당대사와 관련하여 당뇨병 등의 원인이 되는 것으로 보고되고 있다. 앞서 설명한 바와 같이 K와 같은 미네랄이 함유된 소금의 경우 인슐린 신호전달을 향상시킨다고 보고된바 있다.

### 3. 함초에 대한 국내의 연구 동향

중국의 <신농본초경>에는 "함초"로 일본의 <대화본초>에는 "신초(神草) 또는 "복초(福草)" "염초(鹽草)"로 기록되어 있으며, 이 식물은 몸 안에 쌓인 독소와 숙변을 없애고, 압, 고혈압, 당뇨병, 갑상선 기능저하, 갑상선 기능항진, 피부병, 관절염 등의 치료에 사용하였다고 함. 또한 민간요법에서는 시력저하, 소화불량, 위장병, 간염, 신장병 등에 사용되고 있다. 함초의 기능성 연구를 살펴보면 당뇨쥐에 함초를 식이하였을 때 당뇨에 의해 나타나는 체중감소 현상을 억제하고 고혈당 및 고지혈증을 억제하였으며 또한 당뇨에 의해 증가되는 간 glucose 6-phosphatase와 신장 glutathione-S-transferase (GST)의 활성도 등의 항산화 효소 활성을 정상으로 회복시키는 효과가 있다고 보고된 바 있다. 또한 사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)에 의해 간 손상을 준 동물쥐 실험에서 함초를 섭취시킨 쥐는 대조군에 비해 transaminase의 활성을 높이고 albumin 함량이 증가시키는 반면 bilirubin 함량을 감소시키는 효과를 나타내 간 보호 효과가 있음을 알 수 있었다. 함초추출물이 여드름 원인균인 *Propionibacterium acnes*의 생육 억제와 멜라닌 생성 관련 tyrosinase 저해 효과를 나타내고 수렴효과와 더불어 사람 피부 흑색종인 암세포 (SK-MEL-5)의 증식 억제 효과를 나타냈다. 그 외에도 함초는 항당뇨, 혈중 콜레스테롤 저하, 항산화, 항비만, 간 보호 기능, 면역 조절 기능 향상, 그리고 미백 등의 다양한 생리활성이 보고되고 있다. 최근 고전에 기록된 함초가 갖는 약리 효과의 해명 연구가 활발히 진행되고 있다.

함초에 함유된 유용성분 중 미네랄의 경우 건조시료 100 g 당 칼슘 440 mg, 마그네슘 350 mg, 칼륨 930 mg, 철 60 mg, 그리고 망간 6.2 mg으로 주요 성분으로 알려져 있으며 이외에도 요오드, 구리, 니켈, 코발트 등의 다양한 성분들이 함유되어 있다. 또한, 필수지방산중 리놀레산이 50%를 차지하고 있으며 필수 아미노산으로는 발린(valine), 류신(leucine), 프로린(proline), 이소루이신, 트레오닌, 페닐알라닌, 메치오닌, 라이신, 히스티딘의 함량이 총아미산 함량에 약 40%를 차지하고 있다. 함초에 함유된 생리활성 물질에 대한 연구에서는 페놀성 화합물인 isorhamnetin 3-β-D-glucopyranoside, quercetin

3-O-β-D-glucopyranoside 그리고 tungtungmatic acid (3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoyl quinic acid)가 항산화 활성 물질로 밝혀진 바 있다. 특히 isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside는 streptozotocin 유도 당뇨 쥐 조직에서 당뇨 및 백내장에 영향을 주는 aldose reductase와 sorbitol 축적을 억제하여 당뇨 치료 효과가 있다고 보고된 바 있다. 또한 함초로부터 분리한 다당류는 tumor necrosis factor와 interleukin 등과 같은 cytokine 생성을 증가시키는 면역기능 향상에 영향을 준다고 한다. 그 외에도 간에서 지방 축적 억제에 관여하는 콜린, 그리고 간 기능 보호에 관여하는 베타인 등의 유용성분이 함유되어 있음. 그러나 함초에 함유된 생리활성 물질에 대한 구명 연구는 아직 미흡한 실정이다.

함초의 다양한 생리활성 및 유용성분이 밝혀지면서 웰빙식품으로 주목받고 있는데, 자체 생식하거나 나물 등으로 먹고 있으며, 함초발효액, 함초피클, 된장, 간장 등의 각종 발효 식품류, 함초소금, 함초굴비, 함초김, 함초비누, 함초팩 등의 응용제품들이 출시되고 있다. 특히 함초 착즙액 혹은 추출물을 이용한 함초소금의 제조 방법은 특허로 출원된바 있으나 이 소금이 갖는 혈압 상승 억제 및 항당뇨 등의 기능성에 대한 연구는 거의 이루어진 바 없다.

## 제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

### 1. 이론적 및 실험적 접근방법

함초에 많이 있는 마그네슘 함량은 소금의 나트륨 배설을 촉진시킬 뿐만 아니라 혈관 확장인자인 prostacyclin을 증가시키고 혈관축소인자인 thromboxane을 감소시켜 혈압을 낮추는 것으로 알려져 있다. 또한 2형 당뇨의 원인이 주로 인슐린 신호전달의 장애 때문인데 마그네슘은 인슐린 신호전달을 도와 2형 당뇨를 개선하는 것으로 알려져 있다.

또한, 미네랄이 풍부한 소금 즉 갯벌천일염의 경우 미네랄이 거의 없는 소금에 비해 인슐린 신호전달에서 negative 조절인자인 insulin receptor substrate-1 (IRS-1) serine phosphorylation의 발현을 저해한다는 사실을 동물실험을 통하여 밝혀지고 있다. 또한 미네랄이 풍부한 소금이 미네랄이 거의 없는 소금에 비해 glucose uptake도 높게 나타났다. 이는 미네랄이 풍부한 소금이 미네랄이 없는 소금에 비해 인슐린 저항성에 줄이는 것으로 시사되었다. 그러나 적정농도의 미네랄이 함유된 좋은 소금(갯벌천일염)이라 할지라도 소금단독으로는 결국 고혈압, 항당뇨, 그리고 비만 등의 대사성 질환을 줄일 수 있는 한계가 있다. NaCl의 인슐린 신호 전달 저해는 NaCl에 의한 산화적 손상에 의해서 일어나는 것으로 알려져 있는데 함초에는 항산화 물질을 많이 함유하고 있어 산화적 손상을 줄여 인슐린 신호 전달에 도움을 줄 것으로 기대된다. 그러므로 함초로 만든 소금은 혈압을 낮추는데 효과가 있는 여러 미네랄을 갖고 있고 이들은 또한 인슐린 신호전달에 도움이 되기도 하여 소금에 의한 혈압상승억제와 항당뇨 효과가 기대된다.

본 연구에서는 함초소금 및 식물소금의 제조 기술을 확립하고 이들 제품의 건강우수성을 검증하여 혈압상승억제 및 항당뇨 효과를 갖는 고품질의 식물소금 제품 개발 및 산업화를 목적으로 한다. 보다 상세하게는 함초소금 및 식물소금의 혈압 상승 억제 및 항당뇨 작용 기전 해명, 가장 기능성이 증진된 이들 소금의 제조공정 표준화 기술 개발, 대량생산을 위한 설비개선 및 구축, 그리고 고품질의 제품 생산을 통해 고부가가치 창출하고자 한다.

## 2. 연구내용

함초소금을 비롯한 함초식물소금의 제조 기술을 확립하고 이들 제품의 건강우수성을 입증을 통하여 혈압상승억제 및 항당뇨 효과를 갖는 고품질의 식물소금 제품 개발을 목적으로 한다.

- 함초소금 및 식물소금의 혈압 상승 억제 및 항당뇨 작용 기전 해명
- 이들 소금의 제조공정 표준화 기술 개발
- 대량생산을 위한 설비개선 및 구축

연구개발의 목표	연구개발의 내용
함초소금 및 식물소금의 혈압 상승 억제 및 항당뇨 효과 평가	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 함초소금 및 식물소금의 혈압상승 억제 및 항당뇨 효과 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 혈압 상승 관련 효소 저해 활성 평가                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>in vitro</i> 상에서 angiotensin converting enzyme 등의 저해 활성 조사</li> </ul> </li> <li>○ 함초소금 및 식물소금의 항당뇨 활성평가                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- Protein tyrosine phosphatase 저해 활성 조사</li> <li>- <math>\alpha</math>-glucosidase 저해 활성 조사</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>2. 선발된 함초소금 및 식물소금이 혈압 상승 억제 작용에 미치는 영향               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>in vivo</i> 상에서 salt-sensitive rat에 의해 혈압 상승 억제 효과 조사(수축기 및 이완기 혈압 변화)</li> <li>- 혈장 NO 농도 및 ACE 활성 조사</li> </ul> </li> <li>3. 선발된 함초소금 및 식물소금이 인슐린 작용에 미치는 영향               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>in vivo</i> 상에서 동물실험에 의해 항당뇨 효과 조사</li> <li>- 당흡수(glucose uptake) 및 insulin 농도 조사</li> <li>- Oral glucose tolerance test</li> </ul> </li> </ol>

연구개발의 목표	연구개발의 내용
<p>합초소금 혹은 천연자원을 이용한 식물소금의 생산 기술 확립</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 합초소금의 제조 방법 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 합초 착즙액 혹은 열수추출물을 이용한 최적 추출 조건 확립</li> <li>- 결정화 방법 및 분무, 열풍, 동결 등의 최적 건조 방법 조사</li> </ul> </li> <li>2. 초미세 합초분말 제조 및 이를 이용한 응용제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 분쇄기를 이용한 초미세 합초분말 제조 방법 확립</li> <li>- 초미세 합초분말을 혼합한 응용제품개발</li> </ul> </li> <li>3. 혈압 상승 억제에 효과가 있는 천연자원을 이용한 식물소금 제조 방법 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 합초소금 제조 시 생물자원 추출물의 배합 방법 조사</li> </ul> </li> <li>4. 초미세 생물자원분말 제조 및 이를 이용한 응용제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 분쇄기를 이용한 초미세 생물자원분말 제조 방법 확립</li> <li>- 초미세 생물자원분말 및 합초소금을 혼합한 응용제품개발</li> </ul> </li> <li>5. 선발된 합초소금 혹은 식물소금의 이화학적 특성 조사 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 염도 및 미네랄 함량 조사</li> <li>- 총당, 조지방, 조단백질 등의 함량 조사</li> <li>- 식이섬유, 총페놀성 화합물의 함량 조사</li> <li>- 지방산 및 아미노산 함량 조사</li> </ul> </li> <li>6. 합초소금 및 식물소금에 함유된 기능성 성분 조사</li> </ol>
<p>선발된 합초소금 및 기능성 식물소금이 갖는 혈압 상승 억제 및 항당뇨 효과의 작용 기전 해명</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 선발된 합초소금 및 식물소금이 정상쥐에서 혈압 상승 억제 작용에 미치는 영향 <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>in vivo</i> 상에서 정상쥐에 의해 혈압 상승억제 효과 조사</li> <li>- 혈장 전해질(<math>\text{Na}^+</math>, <math>\text{Cl}^-</math>, <math>\text{K}^+</math>, <math>\text{Ca}</math>) 함량 조사</li> <li>- 혈장 NO 농도 및 ACE 활성 조사</li> </ul> </li> <li>2. 염민감쥐와 정상쥐에서의 혈압 상승 관련인자에 미치는 영향 조사 <ul style="list-style-type: none"> <li>· renin-angiotenstion-aldosterone system의 관련 인자의 생화학적 분석</li> <li>· 혈압이완, 수축에 관여 인자(예, prostacyclin)의 생화학적 분석</li> </ul> </li> <li>3. 선발된 합초소금 및 기능성 식물소금이 정상쥐에서 당뇨에 미치는 영향 <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>in vivo</i> 상에서 동물실험에 의해 항당뇨 효과 조사</li> <li>- 당흡수(glucose uptake) 및 insulin 농도 조사</li> <li>- Oral glucose tolerance test</li> </ul> </li> </ol>



연구개발의 목표	연구개발의 내용
<p>선발된 합초소금 및 기능성 식물소금이 갖는 혈압 상승 억제 및 항당뇨 효과의 작용 기전 해명</p>	<p>4. 염민감쥐와 정상쥐에서의 인슐린 신호 전달인자에 미치는 영향</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- IRS, AKT, GLUT4 등의 생화학적, 분자생물학적 분석</li> <li>- IRS-1의 serine phosphorylation 등의 활성화 및 유전자 발현</li> <li>- PTP1B 등의 인슐린 신호 전달에 직간접적으로 미치는 인자들의 생화학적 분석, 분자생물학적 분석</li> </ul>
<p>합초소금 혹은 식물소금 제품의 생산 공정 표준화</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 공장에서 합초소금 및 식물소금의 생산 시설 개선 및 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 합초착즙을 위한 착즙 장치</li> <li>- 합초열수추출물 및 소금의 배합 장치</li> <li>- 분무, 열풍, 동결 등의 최적 건조 장치</li> <li>- 결정화 장치 등</li> </ul> </li> <li>2. 대량생산을 위한 합초소금 혹은 식물소금 제품의 제조공정 표준화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료의 최적 배합 비율 조사</li> <li>- 염도 및 주요 미네랄 성분의 함량 조사</li> <li>- 균일 제품의 생산을 위한 합초소금의 표준물질 결정 및 이 성분의 함량 조사</li> </ul> </li> <li>3. 공장규모에서 합초소금 및 합초식물소금의 시제품 생산</li> </ol>

### 3. 연구결과

소금은 모든 생명체에게 필수적인 물질로 생체내의 신경이나 근육 흥분성을 유지하고 신진대사를 조절하여 체액과 세포의 삼투압에 영향을 준다. 가장 중요한 물질임에도 NaCl이 혈압을 상승시키는 가장 큰 원인으로 보고되면서 고혈압을 유발시키는 등 소금의 종류에 상관없이 모든 소금에 대한 부정적 측면만 강조되었다. 그러나 전라남도과 지역단체, 산학연의 활발한 연구에 의해 천일염의 우수한 미네랄 함량에 의해 정제염에 비해 혈압상승을 억제하며 미네랄이 풍부한 소금 즉 갯벌천일염의 경우 미네랄이 거의 없는 소금에 비해 인슐린 신호전달에서 negative 조절인자인 insulin receptor substrate-1 (IRS-1) serine phosphorylation의 발현을 저해한다는 사실은 물론 미네랄이 풍부한 소금이 미네랄이 거의 없는 소금에 비해 glucose uptake도 높게 나타나 미네랄이 풍부한 소금이 미네랄이 없는 소금에 비해 인슐린 저항성을 더 줄이는 것으로 보고하였다. 즉, 소금이 건강에 미치는 영향은 소금의 양 뿐만 아니라 소금의 종류가 대표적인 원인이 될 수 있음을 시사되었다.

천일염은 미네랄 함량을 다량 함유되어 건강에 좋은 소금으로 알려져 있다. 그러나 소금 단독으로는 고혈압, 항당뇨, 그리고 비만 등의 대사성 질환을 줄일 수 있는 한계가 있으며 아직 까지 소금에 대한 부정적 인식이 강하여 소금의 섭취는 무조건 줄여야 한다는 주장이 지속되고 있는 실정이다.

함초는 일명 '통통마디'라 불리우며, 우리나라의 서해안이나 남해안, 백령도, 제주도, 울릉도 등과 같은 섬지방의 바닷물이 닿는 해안이나 갯벌, 염전 부근에 무리지어 자라는 풀의 일종으로서, 식물학적 분류로는 명아주과 *Chenopodiaceae*에 속하며, 학명은 *Salicornia herbacea* L. 이다. 중국의 의학교서인 신농경본초경에는 맛이 몹시 짜다고 하여 함초 또는 신초로 불리우기도 하였으며, 높이는 10~40cm, 줄기는 마디가 많고, 가지는 2~3번 갈라져서 마주보며, 다육질이고 비대하다. 또한, 6~8월경에는 녹색이었다가 가을이 되면 전체가 붉은 홍자색으로 변화는 외관 특성을 가지는 식물이다. 함초는 천연 미네랄이 풍부하고, 타우린 성분과 함께 소화를 돕는 소화액성분인 베타인을 함유하고 있어 간의 해독작용에 매우 유용한 식물로 알려져 있으며, 이에 따라 간기능 개선, 동맥경화 개선, 당뇨병 개선, 신장병 개선에 좋고, 식이섬유 및 면역력을 향상시키는 기능성 성분이나 미네랄 등이 많이 들어 있어 인체에 매우 유용한 것으로 보고되고 있다. 특히, 염생식물로서 바닷물을 섭취하고 일반적인 식물에 비해 NaCl 함량이 매우 높아 민간에서는 소금대용으로 사용되고 있다.

본 연구에서는 기존에 천일염과 식물추출액을 배합하여 제조한 기능성 소금이 아닌 순수한 식물인 함초를 활용하여 혈압 강하 및 건강에 유익한 소금을 개발하고자 하였다.

### 3-1. 함초고압열수추출물을 이용한 함초소금의 제조

함초에 함유된 NaCl 및 유용성분을 활용하여 식물소금을 개발하고자 제조방법에 따른 기능성 및 품질의 특성을 분석하여 함초소금을 제조 하였다.

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 소금의 제조

함초를 이용한 함초소금의 제조 방법은 Fig. 1과 같다. 본 실험에 사용한 함초는 2008년에 전라남도 증도에서 자생한 것으로, 이를 채취한 후 자연 건조시켜 사용하였다. 건함초(1 kg)를 물 10 L로 130℃에서 5시간을 추출한 다음 여과하여 함초고압열수추출액을 얻었다. 얻어진 함초고압열수추출액을 분무건조, 가열농축, 그리고 동결건조 등의 건조 방법에 따라 함초고압열수분무소금(GSD), 함초고압열수가열농축소금(GHC)을 제조하였다.

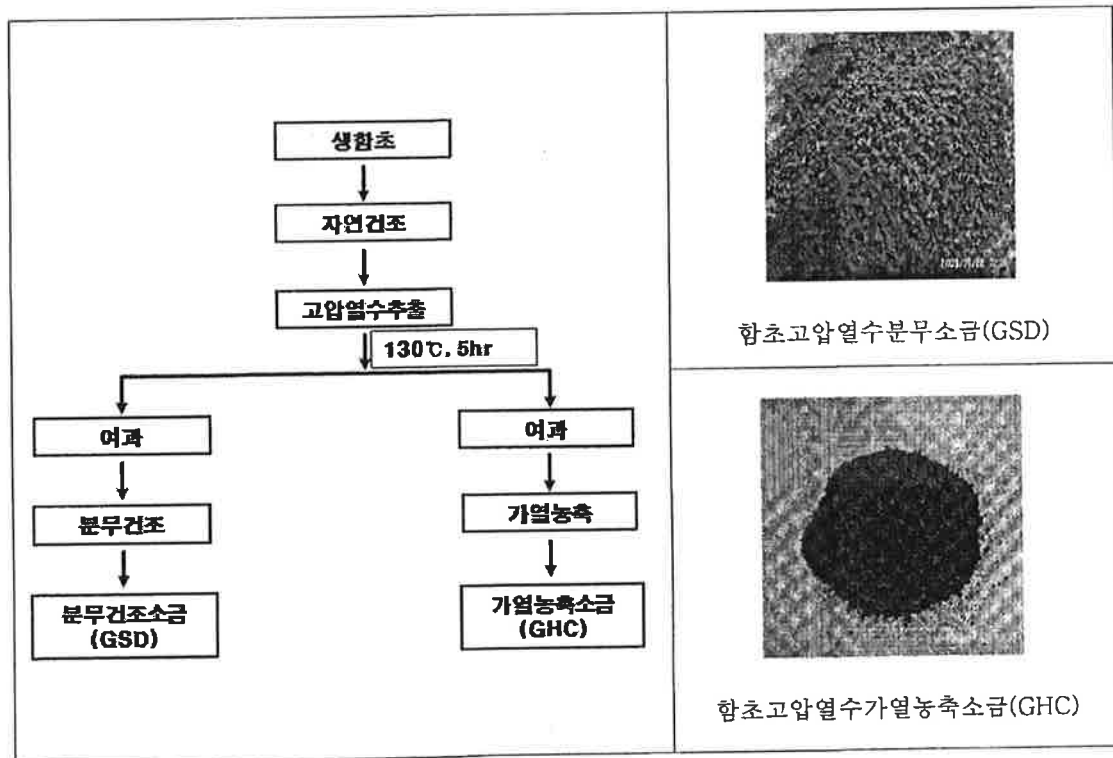


Fig. 1. The manufacturing procedure and products of glasswort-derived salts.

## 나. 실험 방법

### 1) NaCl 함량 측정

NaCl 함량은 식품공전에 따라 Mohr법으로 분석하였다. 시료 1 g을 취하여 100 mL로 정용한 후, 그 중 10 mL를 취하였다. 시료 용액 10 mL에 10% K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> 시약 2~3 방울을 가하고 0.1N AgNO<sub>3</sub> 용액으로 적정하여 계산식에 따라 계산하여 NaCl의 양으로 표시하였다.

$$\text{NaCl}(\%) = 0.00585 \times V \times F \times D \times 100/S$$

V : 0.1 N AgNO<sub>3</sub> 용액의 적정소비량(mL)

F : 0.1 N AgNO<sub>3</sub> 용액의 역가

D : 희석배수

S : 시료채취량(g)

0.00585 : 0.1 N AgNO<sub>3</sub> 용액 1 mL에 해당하는 NaCl의 양(g)

### 2) 수분 함량 분석

수분은 105℃ 상압 건조법에 따라 측정하였다. 약 5~10 g의 시료를 취한 후, 무게를 칭량하고 105℃ 건조기에 5시간 이상 또는 Overnight시킨 후, 데시케이터에서 수기를 방출하고 수기의 무게를 정량하였다.

### 3) pH 변화 측정

pH는 pH meter (Orion 420A, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 측정하였다.

### 4) 색도 변화 측정

색도는 색차계(CM-3500d, Minolta Japan)를 사용하여 L (명도), a (적색도), b (황색도) 값으로 나타내었다.

### 5) Angiotensin I converting enzyme (ACE) 저해 활성 측정

합초분말 및 합초분말의 용매분획물을 대상으로 ACE 저해에 의한 항고혈압 활성을 측정하였다. 각각의 시료 용액 50 µL에 300 mM NaCl이 함유된 0.1 M sodium

borate buffer (pH 8.3) 100  $\mu$ L와 5 mM hyppuryl-histidyl-leucine (Sigma-Aldrich Co.) 용액 50  $\mu$ L를 혼합한 다음, 여기에 ACE 조효소액(lung acetone powder from rabbit (Sigma-Aldrich Co.) 100  $\mu$ L를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 이 반응 용액에 1 N HCl용액 200  $\mu$ L와 ethyl acetate(EtOAc) 2 mL을 넣고 분배한 다음 이를 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 EtOAc층 1.5 mL를 취하였다. 얻어진 EtOAc층을 감압 농축한 다음 1 M NaCl 1 mL로 용해하여 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 합초분말 및 합초분말의 용매분획물들에 대한 ACE 저해 활성은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{ACE 저해 활성(\%)} = [(1 - (A - B) / C)] \times 100$$

A: 시료를 첨가한 실험구의 흡광도

B: 시료를 첨가하고 1M HCl로 반응을 초기에 정지시킨 흡광도

C: 시료대신 증류수만을 첨가한 대조구의 흡광도

#### 6) $\alpha$ -Glucosidase 저해 측정

합초분말 및 합초분말의 용매분획물을 대상으로 효모 유래  $\alpha$ -glucosidase (Sigma, St. Louis, USA)에 의한 혈당 저하 효과를 조사하였다. 즉 시료 용액(10  $\mu$ L, 건조 원재료 1 g 상당량)에 reaction buffer [100 mM phosphate (pH 7.0), 2 g/L bovine serum albumin, 0.2 g/L NaN<sub>3</sub>] 50  $\mu$ L와 효소 용액(최종농도 0.7 U, 10  $\mu$ L)을 가한 다음, reaction buffer에 용해된 *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucoside (5 mM, 50  $\mu$ L)을 가하여 37 $^{\circ}$ C의 incubator에서 5분간 효소반응을 시켰다. 이 반응용액을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.  $\alpha$ -Glucosidase 저해 활성은 시료를 넣지 않고 반응시킨 흡광도에 대한 감소율을 퍼센트로 나타냈다.

#### 7) Protein tyrosine phosphatase (PTP1B) 저해 활성 측정

합초분말 및 합초분말의 용매분획물을 대상으로 protein tyrosine phosphatase에 의한 항당뇨 활성을 측정하였다. 즉 시료 용액(30  $\mu$ L)에 reaction buffer (50 mM citrate pH 6.0, 0.1 M NaCl, 1.0 mM EDTA, 1.0 mM dithiothreitol, 100  $\mu$ L)와 효소 용액(최종농도 1  $\mu$ g, 20  $\mu$ L)을 가한 다음, 물 (800  $\mu$ L)와 *p*-nitrophenylphosphate (20 mM, 20  $\mu$ L)를 가하여 혼합하여 37 $^{\circ}$ C의 incubator에서 30분간 효소반응을 시켰

다. 이 반응용액을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 8) DPPH free radical-scavenging 활성 측정

함초분말 및 함초분말의 용매분획물을 대상으로 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma) radical-scavenging에 의한 항산화 활성을 측정하였다. 즉 시료 농도를 달리한 물 용액(100  $\mu$ L)에 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, 400  $\mu$ L)와 500  $\mu$ M DPPH ethanol 용액(최종농도 100  $\mu$ M, 900  $\mu$ L)을 가하여 vortex mixer로 가볍게 혼합한 다음, 암소에서 30분간 반응시켰다. 이 반응용액을 spectrophotometer (UV-Visible, Varian)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 9) ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging 활성 측정

ABTS<sup>+</sup> 라디칼 용액은 1.0mM의 2,3'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH)을 phosphate-buffered saline (PBS)에 녹인 2.5 mM의 ABST와 혼합하여 70°C의 항온조에서 30분간 반응시켜 만들어 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 PBS는 100mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)로서 150 mM NaCl을 포함한 용매를 사용하였다. 이때 Blue-green ABST radical의 농도는 spectrophotometer를 사용하여 734 nm에서  $0.7 \pm 0.02$ (mean  $\pm$  SD)가 되도록 조정하였다. 각 시료를 20  $\mu$ L씩 취해서 980  $\mu$ L ABST radical용액에 첨가한 다음 37°C에서 일정한 시간동안 반응을 시키면서 734nm에서 감소하는 흡광도 정도를 측정하여 시료의 ABST<sup>+</sup> 라디칼 소거활성능을 조사하였다. 대조군은 시료대신 100% 메탄올 20  $\mu$ L을 첨가하였다.

#### 10) 총페놀성 화합물 함량 측정

함초분말 및 함초분말의 용매분획물의 총페놀성 화합물 함량은 Folin-Ciocalteu의 방법으로 측정하였다. 시료액 20  $\mu$ L에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA)를 100  $\mu$ L 넣고 30초 동안 혼합한 다음, 여기에 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100  $\mu$ L를 가하고 20°C에서 90분간 반응시켰다. 이 반응용액을 UV/VIS spectrophotometer(V-550, JASCO, USA)를 이용하여 735 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도 값은 작성된 caffeic acid 혹은 gallic acid의 표준곡선으로부터 각 시료의 총 페놀 함량으로 환산하였으며 caffeic acid 혹은 gallic acid 당량(mg/L)으로 나타냈다.

#### 11) HPLC에 의한 Caffeic acid 및 ferulic acid의 분석

함초에 함유된 기능성 물질로 알려진 chlorogenic acid류는 quinic acid에 ferulic

acid 혹은 caffeic acid가 결합되어 있으며 이 화합물은 함초의 주요 성분으로 최근에 보고된 바 있다. 함초분말에 함유된 chlorogenic acid의 함량을 간접적으로 알아보고자 산가수분해를 통하여 함초분말에 함유된 ferulic acid 및 caffeic acid에 대한 ODS-HPLC 분석에 의해 측정하였다. 즉, Symmetry C18-column (Waters, 4.6×250 mm, 5  $\mu$ m)이 장착된 HPLC (Younglin, Korea)를 이용하여 분석하였다. 이동상은 0.1% acetic acid가 함유된 35%로 용출하였으며, 유속은 분당 1 mL, 검출기(UV/VIS detector)의 파장은 280 nm, 컬럼 온도는 40°C이었다. 각 성분들의 정성분석은 표준물질의 retention time ( $t_R$ )과 비교하여 동정하였으며, 정량은 표준물질로 검량선을 작성하여 행하였다. 함초분말 5.0 g을 물로 현탁한 후, 2N HCl 용액을 가하여 90°C에서 30분간 가수분해한 다음 냉각시켰다. 이 가수분해한 용액에 EtOAc 100 mL을 가하여 분배하였으며 이를 3회 반복하여 추출하였다. 얻어진 추출물을 감압농축하여 50% MeOH로 용해한 다음 .45  $\mu$ m filter (Millipore, Waters)로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다.

## 12) 관능평가

시료에 대한 관능평가는 관능검사 요원 10명이 5점 평점법으로 각 항목에 대해 점수를 부여하여 비교하였다. 점수는 풋내, 짠맛, 단맛 및 쓴맛의 경우는 아주 약하다 (1점)부터 아주 강하다 (5점)까지, 전체적인 기호도는 아주 나쁘다(1점)부터 아주 좋다 (5점)까지 부여하였다.



## 다. 실험 결과

합초를 열수로 추출하여 합초소금을 제조하기 위해서는 합초에 함유된 NaCl과 미네랄 등의 무기성분 및 생리활성이 우수한 유기성분들이 다량 추출할 수 있는 열수추출조건의 확립이 매우 중요한 인자로 생각되었다. 본 연구실은 선행연구에서 합초의 열수추출조건을 달리하여 즉 130℃에서 5 hr동안 추출한 고압열수추출물과 90℃에서 1 hr동안 추출한 일반열수추출물을 대상으로 총페놀성 화합물 등의 기능성 성분 함량 및 생리활성 평가를 통하여 최적의 열수추출조건을 검토한 바 있다. 그 결과에 의하면, 130℃에서 5 hr 동안 추출한 고압열수추출물의 경우 염도(NaCl)는 약 55%로 90℃에서 1 hr동안 추출한 일반열수추출물과 비슷하였다. 그러나 합초고압열수추출물이 DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> radical에 대한 높은 scavenging 활성을 나타냈으며 ACE 및  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성도 높게 나타났다. 또한 합초고압열수추출물에는 총페놀성 화합물의 함량이 비교적 높았으며 합초의 주요 성분 중 하나인 chlorogenic acid에 결합된 caffeic acid 함량도 높게 나타났을 뿐 아니라, K, Mg, 그리고 Ca과 같은 미네랄들의 함량도 합초고압열수추출물에 더 많이 존재하였다. 즉, 높은 기능성 성분 함량과 우수한 생리활성을 갖는 합초를 130℃에서 5 시간동안 고압열수로 추출한 합초고압열수추출물이 90℃에서 1시간 추출하는 합초일반열수추출물에 보다 합초소금의 제조에 적합한 소재로 판단되었다.

이에 본 연구에서는 합초를 130℃에서 5 시간동안 고압열수로 추출한 합초고압열수추출액을 대상으로 분무, 가열농축, 그리고 동결 등의 건조 방법에 따라 합초고압열수추출물의 분말화를 위한 최적 건조방법을 확립하고자 하였다. 즉 건합초(1.0 kg)에 물 10 L로 130℃에서 5시간을 추출한 다음 여과하여 얻어진 여액을 분무건조에 의해 합초고압열수분무소금(GSD)을 제조하였다(Fig. 1). 이 소금은 연한 녹색을 나타냈으며 짠맛은 천일염 등의 다른 소금들에 비해 약한 느낌이었다. 또한 합초고압열수추출액을 가열 농축하여 제조된 합초고압열수추출농축소금(GHC)은 합초고압열수분무소금(GSD)에 비해 합초가 갖는 고유의 색인 연한 녹색이기 보다는 진한 흑색을 나타냈으며 탄맛이 강하고 합초고압열수분무소금(GSD)과 비슷한 짠맛을 나타냈다. 또한 합초고압열수추출농축소금은 제조과정 중 장시간 동안 가열함으로써 페놀성 화합물의 산화뿐만 아니라 Maillard 반응에 갈변화된 것으로 추측되었다. 따라서 합초소금 제조에 있어 합초의 색을 그대로 유지하면서도 가장 효율적인 건조 방법은 합초고압열수추출액을 분무건조로 판단되었다. 동결에 의한 합초고압열수추출농축소금은 합초고압열수분무소금과 유사한 특성을 보였으나

건조시간이 너무 길고 NaCl 등에 의해 장비의 고장을 자주 일으켜 함초고압열수추출액의 건조방법에는 적합하지 않는 것으로 판단되어, 이하 분석 대상에서 제외시켰다.

### 1) 함초소금의 이화학적 특성

제조된 함초소금인 함초 고압추출 농축소금(이하 GHC)과 함초 고압추출 분말소금(이하 GSD)을 분석한 결과는 Table 1에 나타내었다. 함초를 130℃로 5시간 열수추출하여 얻어진 여액을 분무건조하여 제조된 GSD의 염도는 55.4%이었으며 GHC (49.9%)에 비해 5.5% 높은 염도를 나타냈다. GHC이 함초고압열수분무소금 (GSD)에 비해 낮은 염도를 나타냈던 것은 함초고압열수추출액을 가열·농축하는 과정 중 NaCl의 휘발에 의한 것보다 가열·농축이 완료된 후 함초소금을 회수하는 과정에서 발생하는 손실로 추측된다. 수분 함량의 경우 GSD가 7.0%로 GHC들에 비해 높은 함량을 나타냈다. 산화환원 전위 값에서는 두 소금 모두 - 값을 나타내어 천일염의 140 mV 보다 낮게 나타나 환원력을 지니고 있음을 알 수 있었다. 또한, 두 소금의 색도를 분석한 결과 GHC가 GSD보다 L, a, b 값 모두 높게 분석되었으며 특히, L 값에서 큰 차이를 보여 소금의 색깔에 차이가 있음을 알 수 있었다. 이러한 색깔의 차이는 제조 조건에 의해 발생한 것으로 GSD는 순간적인 고온에 의해 순간 결정이 이루어졌지만 GHC의 경우 지속적으로 고온에 노출되었기 때문으로 판단된다.

Table 1. The general composition of glasswort-derived salts

시료	염도(%)	수분(%)	pH	ORP (mV)	색도		
					L	a	b
GHC	49.9 ± 0.0	4.20 ± 0.00	6.00	-50	5.80	0.09	1.94
GSD	55.4 ± 0.6	7.04 ± 0.18	6.54	-77	4.81	0.02	1.63

GHC: heat-concentrated glasswort salt, GSD: spray-dried glasswort.

### 2) 함초소금의 미네랄 함량

GSD와 GHC의 미네랄 함량을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 두 시료 모두 일반적인 함초 분말에 비해 미네랄 함량이 월등히 높게 나타났다. 하지만 GSD의 미네랄 함량이 GHC보다 Mg을 제외한 모든 시료에서 높은 것으로 분석되었다. GSD 및 GHC의 미

네랄 함량의 차이는 가열 방식에 의한 차이로 볼 수 있다. 가열 농축에 의해 제조된 소금의 경우 일반적으로 K의 함량이 낮은 경향을 보인 것과 유사한 경향을 나타냈다. 이는 가열 농축에 의한 Ca, Fe 등의 미네랄 성분들이 휘발된 것으로 추정되어 아직 정확한 원인은 알 수 없었다.

Table 2. Mineral composition of glasswort-derived salt

Glasswort salts	Mineral content (mg/Kg)					
	K	Mg	Ca	Fe	Zn	Cu
GHC	3,6680	22,350	7,793	189.8	21.8	42.8
GSD	30,636	14,210	21,170	3,371	1,103	520

GHC, heat-concentrated glasswort salt; GSD, Spray-dried glasswort salt

### 3) 함초소금의 Agiontensin I Converting Enzyme (ACE) 저해 활성

우리 몸에서 혈압과 물의 평형을 조절하는 중요한 인자는 Renin-angiotensin-aldosterone system이다. 특히 간에서 angiotensin 전환 효소에 의해 생성된 angiotensin은 renin-angiotensin-aldosterone system에 있어서 혈압을 상승시키는 주된 원인 물질이다. 그러므로 angiotensin 전환 효소를 저해함으로써 우리 몸의 혈압 상승을 억제시킬 수 있을 것으로 기대되었다. 그래서 GHC와 GSD를 대상으로 ACE 저해 활성을 검정하였으며 이에 대한 실험 결과는 Fig. 2에 제시하였다. 함초소금들은 농도 의존적으로 ACE 저해 활성이 증가하였으나 두 집단 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 따라서 함초 고압열수추출액을 분무건조하거나 가열농축에 의해 함초소금들을 제조하더라도 이들 소금의 ACE 저해 활성은 변화하지 않음을 알 수 있었다.

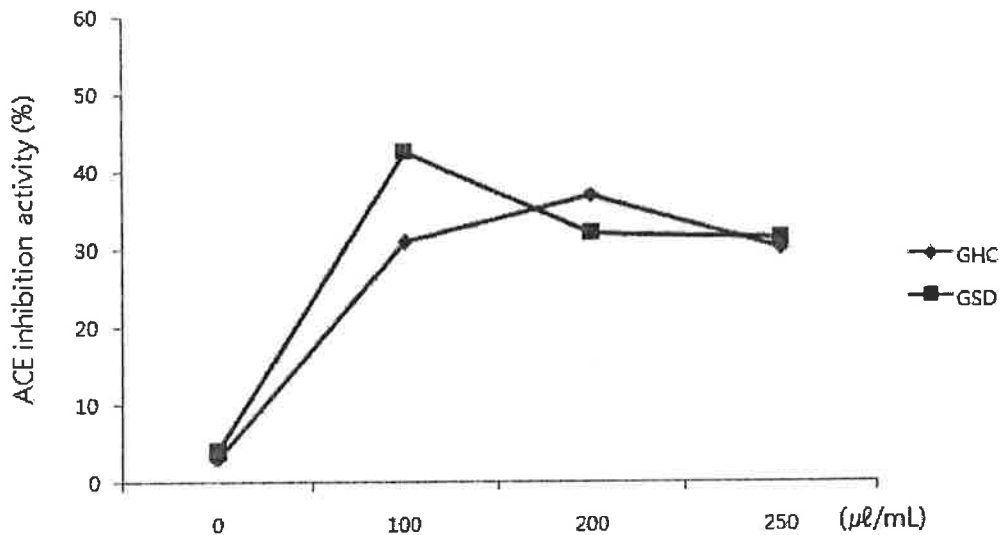


Fig. 2. ACE inhibitory activities of GHC and GSD.

GHC, heat-concentrated glasswort salt; GSD, Spray-dried glasswort salt

#### 4) 함초소금의 $\alpha$ -glucosidase 저해 활성

$\alpha$ -Glucosidase는 소장에서 올리고당 혹은 이당류를 단당류로 가수분해하는 역할을 하는데, 이 효소 활성을 가역적으로 저해함은 장에서 당 소화와 포도당 흡수를 지연시켜 혈당을 낮춤으로써 항당뇨 효과를 기대할 수 있다. 그래서  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성은 항당뇨 활성이 우수한 천연소재의 발굴에 있어 자주 사용되고 있는 검증법 중 하나이다. 제조된 함초소금들을 대상으로  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 검증하였으며 이에 대한 결과는 Fig. 3에 제시하였다. GHC는 17% 정도의 저해활성을 나타낸 반면 GSD는 10% 정도로 낮은 저해활성을 나타냈다. 두 함초소금 모두 positive control 인 acarbose의 활성 (100 µg, 41%)보다 낮게 나타났다. Control로 사용된 acarbose는 강력한  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 나타내 과다 복용 시 메스꺼움, 구토 및 복부 팽만 등의 부작용으로 매우 소량으로 사용되고 있지만 항당뇨 효과를 비교하는 기준물질로 사용된다. 두 함초소금의  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성은 acarbose에 비해 약 25배 낮은 활성을 보였으나 부작용 없이 혈당 강하 효과를 갖는 소금으로의 개발이 가능할 것으로 시사되었다.

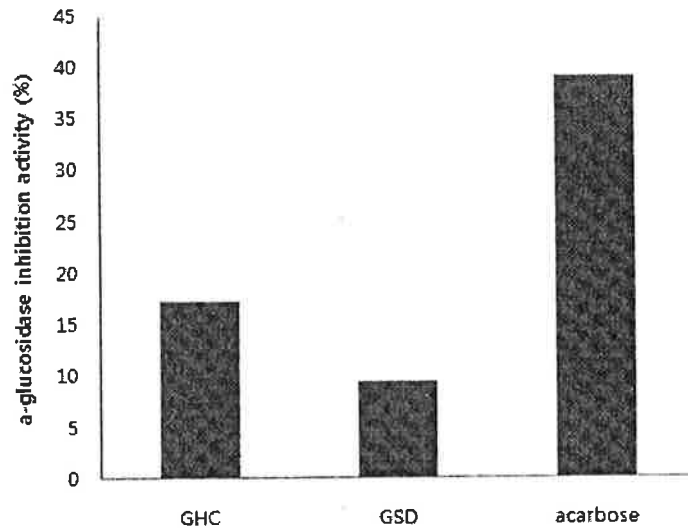


Fig. 3.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activities of GHC and GSD.

GHC, heat-concentrated glasswort salt; GSD, Spray-dried glasswort salt.

#### 5) 함초소금의 PTP1B 저해 활성

Protein tyrosine phosphatase (PTP1B)는 세포내에서 insulin receptor의 탈인산화에 관여하는 효소로, 세포내로 당 흡수를 억제하는 인슐린 신호 전달의 negative regulator로 알려져 있다. PTP1B 저해 활성 검정법은  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성과 함께 항당뇨 활성이 우수한 천연소재의 발굴에 자주 사용되고 있는 검정법 중 하나이다. 특히 천연에 존재하는 페놀성 화합물들이 강한 PTP1B 저해 활성을 갖는다고 하였다. 함초소금에는 함초에 존재하는 다량의 페놀성 화합물을 함유하고 있어 이 물질들이 PTP1B를 강하게 저해하여 insulin 신호 전달을 향상시킬 것으로 예상되었다. 그래서 GHC 및 GSD를 대상으로 PTP1B 저해 활성을 정색법에 의해 평가하고자 하였다. 그러나 함초소금에 방해 물질들이 존재하고 있어 정색법에 PTP1B 저해 활성 측정이 불가능하였다.

## 6) 함초소금의 DPPH radical-scavenging 활성

과다한 스트레스는 체내 지방 및 단백질 등의 세포 구성 성분들을 산화시키고 산화 반응을 촉진시켜 세포를 파괴시키고 염증, 암, 그리고 동맥경화 등의 다양한 질병을 유발시킨다고 알려져 있다. 따라서 항산화 활성이 우수한 식품섭취는 산화적 스트레스로부터 보호할 수 있을 것으로 기대된다. 과다한 소금 섭취는 산화적 스트레스에 영향을 주므로 기존 소금보다 우수한 항산화 활성을 갖는 소금이 개발되어진다면 매우 이상적인 소금이라 할 수 있다. 특히 항산화 활성이 우수하다고 알려진 함초를 이용하여 만든 함초소금의 섭취는 기존 소금에 비해 노화를 억제할 뿐만 아니라 산화적 스트레스로부터 발생하는 질병을 예방할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 체내 산화적 스트레스와 밀접한 관계가 있는 당뇨 및 고혈압을 예방할 수 있을 것으로 생각되었다. 또한 함초에 존재하는 미네랄(K, Mg, Zn, Cr)들은 항산화물질들과 함께 체내에서 산화적 스트레스를 줄여주고 혈압 상승 억제 및 인슐린 신호전달 향상에 도움 줄 것으로 생각된다. 그래서 함초 고압열수추출액을 건조방법을 달리하여 제조된 함초소금들의 항산화 활성에 영향을 주었는지 알아보려고 GSD와 GHC를 대상으로 DPPH (최종농도, 100  $\mu$ M) radical-scavenging 활성을 조사하였다. 그 결과(Fig. 4), 두 소금 모두 농도 의존적으로 DPPH radical-scavenging 활성이 증가하는 경향을 보였다. 그리고 GHC가 소거능력이 GSD보다 높은 DPPH radical-scavenging 활성을 나타내었다. 또한 이들의 radical-scavenging 활성으로부터 50% DPPH radical을 scavenging하는 농도(SC<sub>50</sub>)를 구한 결과(표 3), GHC는 211 $\mu$ g으로 GSD (389  $\mu$ g)에 비해 약 1.9배 높은 활성을 보였다. 두 소금 제조에 사용한 함초고압열수추출액은 동일한 원료이고 건조방법만이 차이가 있음에도 불구하고 가열농축에 의해 제조된 GHC가 분무건조에 의해 제조된 GSD보다 높은 DPPH radical-scavenging 활성을 보였던 것은 가열농축과정 중 함초에 함유된 염화나트륨의 강한 이온 반응성에 의해 항산화 활성물질들이 새롭게 생성된 것으로 추측되었다.

Table 3. DPPH radical-scavenging activities of glasswort-derived salts

Salts	DPPH radical-scavenging 활성(SC <sub>50</sub> , µg)
GHC	211
GSD	389
Trolox	9.01

GHC, heat-concentrated glasswort salt; GSD, Spray-dried glasswort salt.

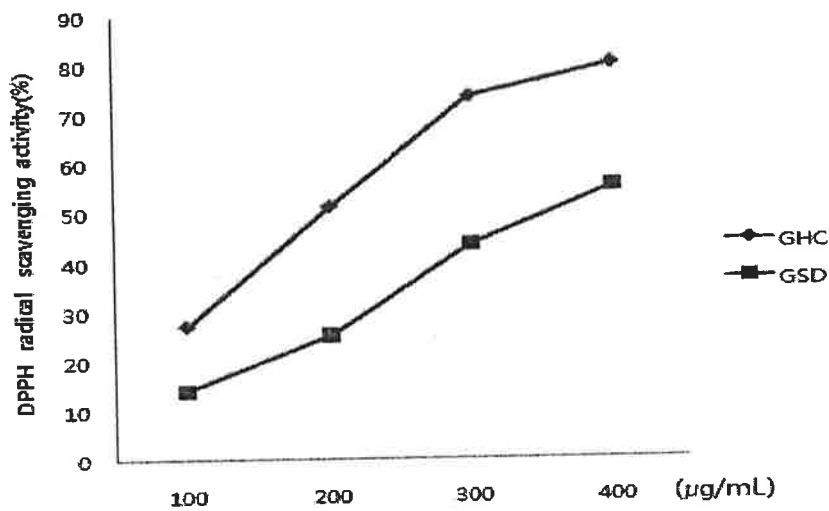


Fig. 4. DPPH radical-scavenging activities of GHC and GSD.

GHC, heat-concentrated glasswort salt; GSD, Spray-dried glasswort salt.

#### 7) 함초소금의 ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging 활성

또한 GSD와 GHC를 대상으로 ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging 활성을 검정한 결과(Fig. 5), 두 함초소금들은 DPPH radical-scavenging 결과와 유사한 경향을 보였다. 즉 두 함초소금 모두 농도 의존적으로 ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging 활성이 증가하는 경향을 보였다. 특히 GHC가 GSD보다 유의적으로 높은 ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging 활성을 나타냈다. 이상의 실험결과를 종합해 보면 GHC가 GSD보다 높은 radical-scavenging을 갖고 있음을 알 수 있었다.

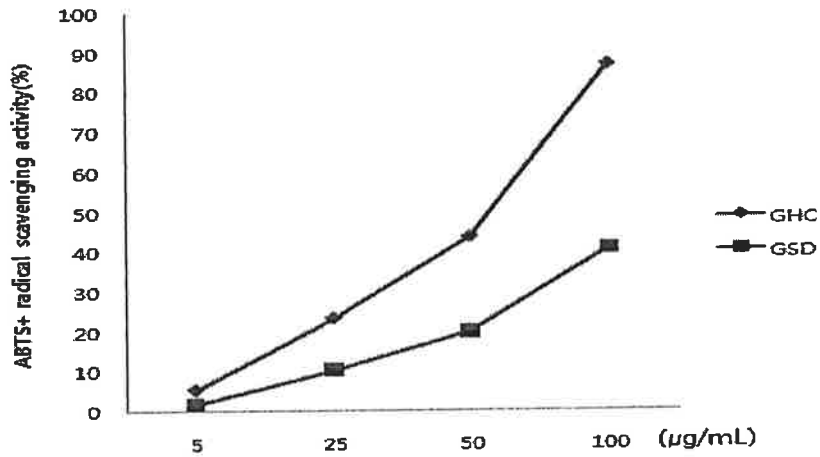


Fig. 5. ABTS + radical scavenging activities of GHC and GSD.

GHC, heat-concentrated glasswort salt; GSD, Spray-dried glasswort salt.

#### 8) 함초소금의 총페놀성 화합물 함량

총페놀성 화합물은 체내에서 항산화 작용에 의해 산화적 손상을 막아 관상동맥질환 등의 다양한 질병의 유발을 줄이고 콜레스테롤 함량을 낮추는 등의 다양한 생리활성이 보고되고 있다. 이에 제조된 함초소금들을 대상으로 총페놀성 화합물의 함량을 Folin-Ciocalteu's 방법에 의해 측정하였다. 그 결과(Fig. 6), GHC의 총페놀성 화합물 함량은 41 mg/g으로 GSD보다 높게 나타났으며 항산화 능력에 대한 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 그러므로 이들 소금의 총페놀성 화합물 함량은 항산화 활성에 직접적인 영향을 준 것으로 시사되었다.



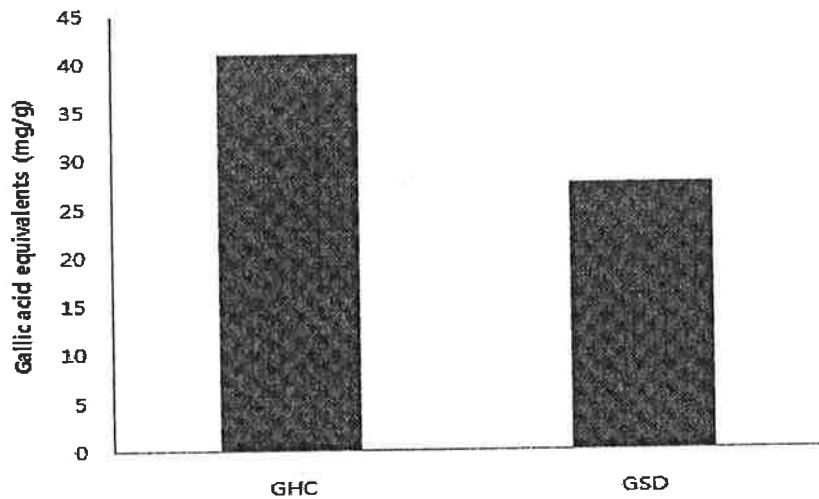


Fig. 6. Total phenolic contents of GHC and GSD.

GHC, heat-concentrated glasswort salt; GSD, Spray-dried glasswort salt.

#### 9) 함초소금의 caffeic acid 및 ferulic acid 함량

Caffeic acid는 항산화, 항암 등의 생리활성이 우수한 물질로, 함초에 존재하는 주요 성분인 chlorogenic acid와 dicaffeoylquinic acid류의 구성성분으로 보고된 바 있다. 또한, 지금까지는 밝혀지지 않았지만 chlorogenic acid류의 quinic acid에 caffeic acid 및 dehydroxycaffeic acid외에도 ferulic acid가 결합되어 있을 가능성이 강하게 시사되었다. 또한 함초에는 caffeic acid와 ferulic acid가 배당체 혹은 기타 화합물과 에스테르 결합한 형태로 존재하고 있을 가능성도 높게 시사되었다. 먼저 GHC와 GSD를 산가수분해한 다음 이 분해물을 ODS-HPLC 분석에 의해 caffeic acid와 ferulic acid 배당체 화합물의 정성 및 정량을 행하였다. 그러나 함초소금의 산분해산물의 HPLC chromatogram 상에(Fig.7)는 caffeic acid ( $t_R$  7.9 min)와 ferulic acid ( $t_R$  13.5 min)에서 관측되었으며 이들은 표준물질들의 HPLC retention time과 정확히 일치함을 확인하였다. 따라서 함초소금에는 caffeic acid와 ferulic acid가 배당체 혹은 기타 화합물과 에스테르 결합한 형태로 존재하고 있음을 알 수 있었다. 그러나 산가수분해하지 않는 식물소금에서는 이들 화합물이 검출되지 않았으며 식물소금에는 유리형의 caffeic acid 및 ferulic acid가 없거나 있더라도 그 함량이 매우 적은 것으로 판단되었다. 함초소금에 존재하는 caffeic acid와 ferulic acid를 정량하고자, 표준물질인 caffeic acid 및 ferulic acid의 표준곡선

을 작성하였으며 또한 이들 화합물의 검출 한계는 0.02 µg이었다. 식물소금의 산가수분 해물로부터 caffeic acid 및 ferulic acid의 함량을 정량한 결과(Fig. 8), 이들 화합물들은 GHC가 GSD보다 높은 함량을 나타냈다. 특히 그 성분들은 분무보다 가열농축에 의해 산화 혹은 분해가 더 잘 되어 GSD가 GHC보다 더 낮은 함량을 나타냈었으며 그 정확한 원인은 알 수 없었다.

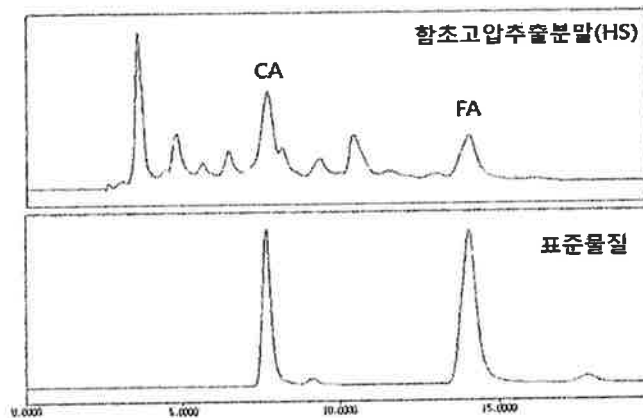


Fig. 7. HPLC chromatograms of acidic hydrolysates of glasswort-derived salts.

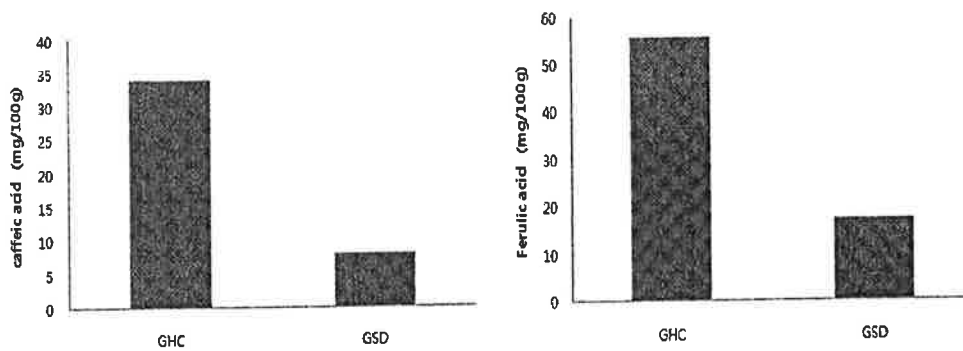


Fig. 8. Caffeic acid and ferulic acid contents of GHC and GSD.

GHC, heat-concentrated glasswort salt; GSD, Spray-dried glasswort salt.

앞서 언급한 바와 같이 함초에는 chlorogenic acid와 dicaffeoylquinic acid류가 주요성분을 함유하고 있고 최근 신규 dicaffeoylquinic acid를 포함한 다수의 chlogogenic acid들이 분리된 바 있다(Fig. 9). 특히 caffeic acid는 이들 화합물과 에스테르 결합을 하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 caffeic acid는 함초에 배당체 혹은 기타 화합물과 에테르 결합된 형태의 화합물 외에도 에스테르로 결합된 다양한 형태의 화합물들로 존재하고 있을 것으로 제기되었다. 함초소금에 존재하는 caffeic acid를 보다 정확하게 조사하기 위해서는 산가수분해산물과 알카리분해를 모두 실시하여 함초소금의 caffeic acid 혹은 ferulic acid 함량에 대한 정확한 정량이 요구된다.

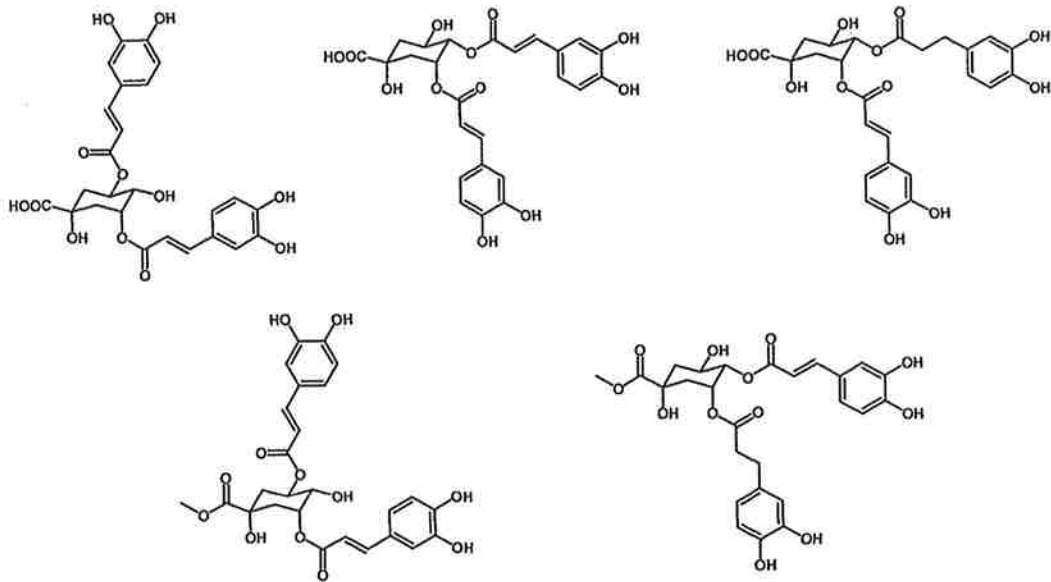


Fig. 9. Structure of dicaffeoylquinic acids isolated from glasswort.

#### 10) 함초소금의 관능평가

GHC와 GSD을 대상으로 관능검사를 실시하였다. 그 결과(Table 4), GHC는 쓴맛과 짠맛에서 높은 점수를 받았다. GHC와 GSD의 염도는 거의 유사함에도 불구하고 GHC가 GSD보다 더 짠맛을 강하게 느낀 것은 지속적인 가열 농축에 의해 강한 쓴맛에 의해 짠맛도 강하게 느낀 것으로 추정된다. 반면에 GSD는 색깔과 단맛에서 높은 점수를 받았는데 이는 짠맛보다 단맛 혹은 색상에 좋아 전체적 기호도에서 높은 점수를 받은 것으로 판단되었다.

Table 4. Sensory evaluation of glasswort-derived salts

시료	관능평가 항목					
	색깔	꽃내	짠맛	단맛	쓴맛	전체기호도
GHC	1.5	2.1	3.3	2.2	3.8	3.1
GSD	4.3	1.9	2.9	4.0	2.0	4.2

GHC, heat-concentrated glasswort salt; GSD, spray-dried glasswort salt.

이상의 결과를 종합해 보면 GHC는 GSD에 비해 총페놀성 화합물 함량이 높고 DPPH와 ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging에 의한 항산화이 우수한 반면 미네랄 함량이 높음을 알 수 있었다. 두 소금 모두 염도는 유사하였으며 ACE와  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성은 유사하였다. 그러나 GSD는 GHC보다 관능평가에서 높은 점수를 받았다. 기능성에 대한 측면을 강조하게 될 경우 함초고압열수추출액을 가열 농축하여 제조된 GHC이 선정되어야 하나 추후 개발하고자 하는 함초소금의 경우 현대인에게 부족한 미네랄 섭취 원 및 음식의 풍미를 향상시키는 조미료로서의 활용을 고려해 볼 때 소비자는 함초고압열수추출액을 분무건조에 의해 제조된 GSD를 더 선호할 것으로 판단되었다. 또한 경제적 면에서도 함초를 이용한 함초소금 제조에 있어 분무건조에 의해 제조된 GSD가 가장 적합한 것으로 시사되었다.

### 3-2. 합초고압추출분말소금과 합초미세분말을 이용한 합초원단의 제조

제 3-1에서 언급한 바와 합초소금 제조를 위해 합초고압열수추출액을 가열농축, 분무 건조 등의 건조방법을 달리하여 합초고압열수분무소금(GSD)과 합초고압열수가열농축소금(GHC)을 제조하였고, 이들의 이화학적 특성, 기능성, 그리고 관능검사를 실시하였다. 그 결과, 합초고압열수분무소금(GSD) 제품이 합초고압열수가열농축소금(GHC)보다 식품소재로서의 활용뿐만 아니라 상품화 가능성이 높게 시사되었다. 그러나 이 소금은 제품포장을 하거나 조리에서 사용할 때 쉽게 날려 사용에 불편을 줄 뿐만 아니라, 다량의 미네랄 성분 특히 Mg과 Ca 함량이 높아 유통 시 수분 흡습으로 인해 제품의 품질을 떨어뜨릴 우려가 있을 것으로 판단되었다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 합초고압열수분무소금(GSD)에 우송대학교 (주)홍삼단의 도움을 받아 합초환 형태가 아닌 0.5% carboxymethyl cellulose를 첨가하여 유동층코팅기를 이용하여 합초고압열수분무소금원단(GSDT)을 제조하였다

한편, 합초고압열수분무소금의 상품화에 있어 몇 가지의 문제점들이 제기되었다. 즉 합초고압열수분무소금(GSD)에는 합초에 존재하는 무기성분들과 유기성분들을 열수로 추출하여 이용한 형태이다. 따라서 이들 합초소금들에는 열수에 의해 용출된 합초 유래의 무기성분들과 유기성분들이 고농축된 상태라고 할 수 있다. 그러나 이들 소금 제조 과정에서 합초에 존재하는 다양한 성분들 중 열수에 용해되지 않는 식이섬유 등의 불용성 성분들이 다량 소실될 것으로 시사되었다. 또한 원가에 대한 문제점으로 합초고압열수추출분말소금의 경우 1Kg당 12만원에 공급이 되며 조미료인 소금으로 활용하기에는 소비자의 가계에 큰 부담을 줄 수 있다는 의견이 제기되었다. 더욱이 합초고압열수추출분말의 경우 매우 미세한 분말에 의해 분말의 날림 현상으로 유실이 많았으며 시간의 경과에 따라 분말의 특성에 의해 케이킹(caking) 현상이 발생하여 품질이 저하하는 특성을 나타내었다. 이에 합초 그 자체를 다양한 식품소재로 활용을 위한 일환으로 합초를 미세 분말화하거나 20  $\mu\text{m}$ 이하의 초미세분말화한 다음 이들을 유동코팅기를 이용하여 합초미세분말원단(GMT)과 합초초미세분말소금원단(GHT)을 제조하고자 하였다.

이에 본 장에서는 상품화를 위한 원가의 문제점의 고려와 품질 향상을 위한 가공특성을 개발하여 합초소금 제조 공정을 확립하고자 하였다.

## 가. 재료 및 방법

### 1) 식물소금의 제조

#### (1) 함초고압열수분무소금(GSD)을 이용한 함초분무소금원단(GSDT)의 제조

제 3-1에서 선정된 GSD의 문제점을 보완하기 위해 우송대학교 (주)홍삼단의 도움을 받아 함초환 형태가 아닌 0.5% carboxymethyl cellulose를 첨가하여 유동충코팅기를 이용하여 함초고압열수분무소금원단(GSDT)을 제조하였다(Fig. 10).

#### (2) 함초미세분말원단(GMT)의 제조

함초미세분말원단(GMT)은 건함초를 일반분쇄기에 의해 230 mesh 이하로 분쇄하여 미세분말을 얻은 다음 이를 0.5% CMC를 첨가하고 유동충코팅기를 이용하여 함초미세분말원단(GMT)을 제조하였다(Fig. 11).

#### (3) 함초초미세분말원단(GHT)의 제조

함초초미세분말원단은 초미세 분쇄기로 분쇄하여 20  $\mu\text{m}$ 이하의 초미세분말을 유동충코팅기로 함초초미세분말원단(GHT)을 제조하고자 하였다. 건함초를 초미세 분쇄기로 분쇄한 결과(Fig. 12), 얻어진 함초초미세분말의 입자 크기는 평균 17.97  $\mu\text{m}$ 로 나타났다. 이를 0.5% carboxyl methyl cellulose (CMC)을 첨가한 다음 유동충코팅기를 이용하여 함초초미세분말원단(GHT)을 제조하였다.

## 나. 실험 방법

본 장에서 사용된 실험 방법은 3-1에서 제시된 방법과 동일하게 실행하였다.

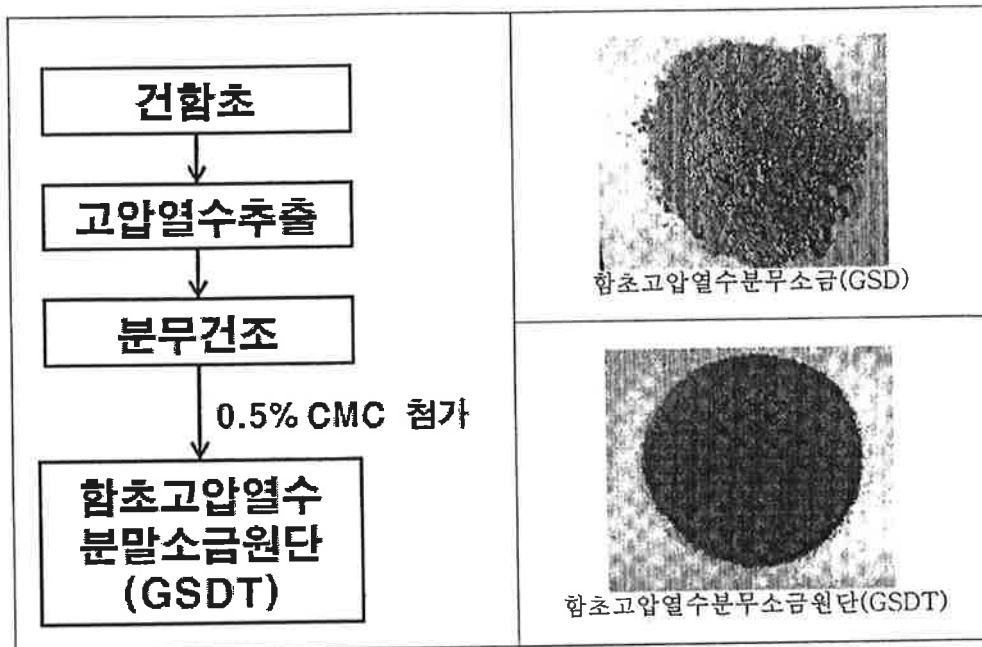


Fig. 10. The manufacturing of spray dried glasswort salt particle (GSDT) using the glasswort hot water extract.

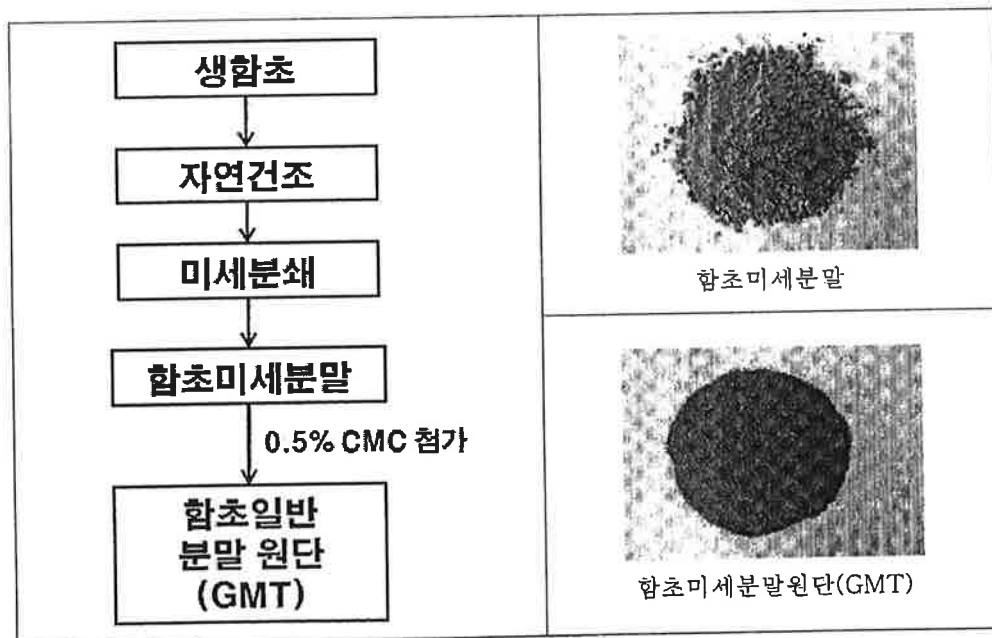


Fig. 11. Preparation of GMT using glasswort salt powder.

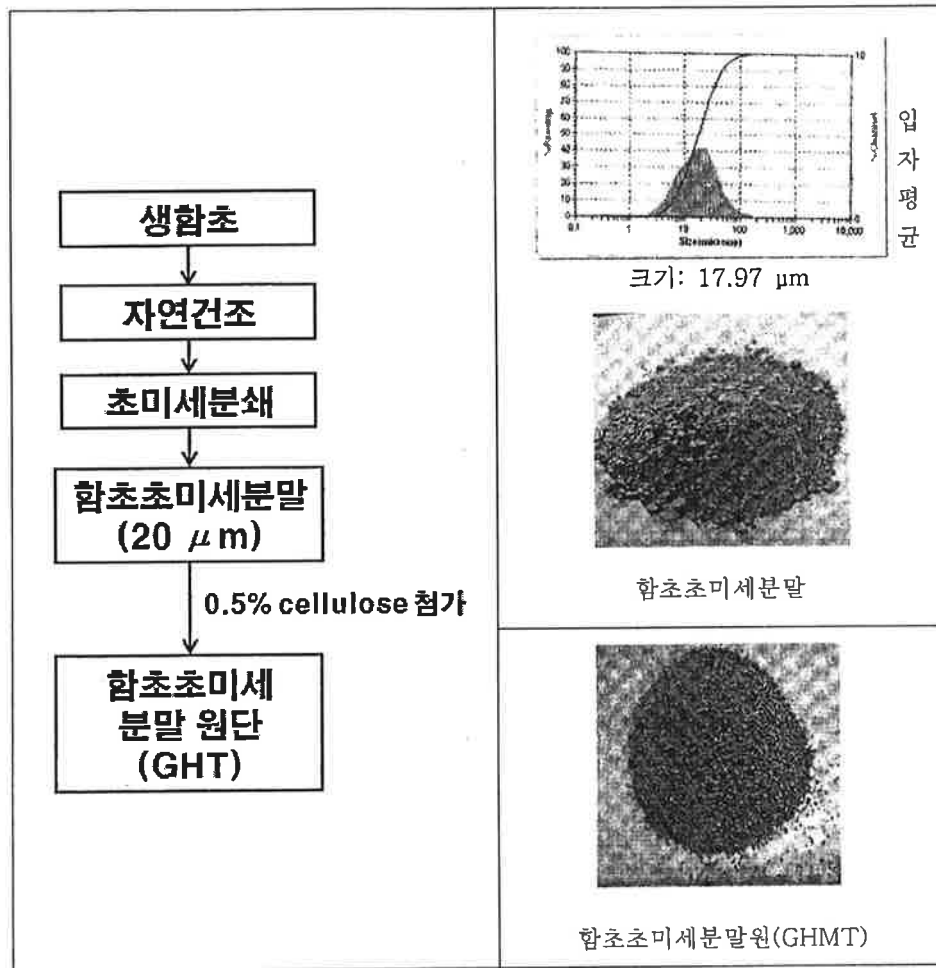


Fig. 12. The manufacturing of GHMT using glasswort ultra fin powder.



## 다. 결 과

### 1) 함초고압열수분무소금(GSD)을 이용한 함초분무소금원단(GSDT)의 제조

함초고압열수분무소금(GSD)에 우송대학교 (주)홍삼단의 도움을 받아 함초환 형태가 아닌 0.5% carboxymethyl cellulose를 첨가하여 유동층코팅기를 이용하여 함초고압열수분무소금원단(GSDT)을 제조하였다(Fig. 10). 함초분무소금원단(GSDT)은 은단형태의 고운 입자이며 부드러운 촉감을 나타냈다. 그러므로 함초고압열수분무소금(GSD)을 이용한 함초고압열수분무소금원단(GSDT)의 제품은 조리 시 사용이 용이하고 유통 혹은 개봉하여 사용 시 수분 흡습을 억제해 줄 것으로 기대된다.

### 2) 함초미세분말원단(GMT)과 함초초미세분말원단(GHMT)의 제조

함초미세분말원단(GMT)은 건함초를 일반분쇄기에 의해 230 mesh 이하로 분쇄하여 미세 분말을 얻은 다음 이를 0.5% CMC를 첨가하고 유동층코팅기를 이용하여 함초미세분말원단(GHT)을 제조하였다(Fig 11). 이는 제품을 포장하거나 조리 시 사용이 용이할 것으로 판단되나 함초고압열수분무소금원단(GSDT)과 같이 은단형태의 고운 입자이기보다는 과립 형태에 가까웠다. 또한 함초미세분말원단(GMT)을 먹었을 때 불용성 성분이 많아 함초고압열수분무소금원단(GSDT) 보다 거친 촉감과 짠맛 또한 약하게 느껴졌다.

함초미세분말원단(GMT)을 섭취하였을 때 거친 촉감이 있어 이를 줄이기 위하여 초미세 분쇄기로 분쇄하여 20  $\mu\text{m}$ 이하의 초미세분말화하여 유동층코팅기로 함초초미세분말원단(GHT)을 제조하고자 하였다. 건함초를 초미세 분쇄기로 분쇄한 결과(Fig. 12), 얻어진 함초초미세분말의 입자 크기는 평균 17.97  $\mu\text{m}$ 로 나타났다. 이를 0.5% carboxyl methyl cellulose (CMC)을 첨가한 다음 유동층코팅기를 이용하여 함초초미세분말원단(GHT)을 제조하였다. 제조된 함초초미세분말원단(GHT)은 함초미세분말원단(GMT)에 비해 입안에서 거친 촉감이 약하게 느껴졌다. 또한 함초초미세분말을 이용하여 함초초미세분말원단(GHT)을 제조함으로써 함초초미세분말에 발생하기 쉬운 수분 흡습성을 방지해 줄 것으로 기대된다. 그러나 함초초미세분말원단(GHT)은 함초 입자를 20  $\mu\text{m}$ 이하로 초미세분말화하기 위한 시간 등의 가공비가 함초분무소금원단에 비해 약 3배정도 많이 든다는 단점이 있다.

### 3) 합초소금원단과 합초분말원단의 이화학적 특성

가공 방법에 따른 합초소금원단의 이화학적 특성은 Table 5에 나타내었다. 합초고압열수분무소금 (GSD)을 이용하여 제조된 합초고압열수분무소금원단 (GSDT)의 염도는 53%로 합초고압열수분무소금 (GSD, 55%)에 비해 낮게 나타났다. 이는 GSDT의 제조과정 중 0.5%의 carboxymethyl cellulose의 첨가에 의한 것으로 보인다. 건합초를 미세 혹은 초미세 분말을 이용하여 제조된 GMT와 GSDT의 염도는 각각 25.5%와 23.5%로 합초고압열수추출소금들에 비해 약 2배정도 낮음을 알 수 있었다. 수분 함량의 경우 GSDT는 GSD보다 약간 낮은 수분 함량을 나타내 원단 제조과정 중 가열과정을 거치면서 약간의 수분감소가 발생한 것으로 생각된다. GMT와 GHMT의 수분함량은 각각 3.9%와 3.2%임을 알 수 있었다. pH 값의 경우 GSDT가 가장 낮았으며 수분의 함량은 GSD가 가장 높게 나타나 각 종류에 따라 이화학적 특성이 다르다는 사실을 알 수 있었다. 합초고압열수추출액을 이용하여 제조된 합초소금들의 산화환원전위는 건합초를 분말화하여 제조된 합초분말원단들에 비해 낮음을 알 수 있었다. GSDT는 GSD보다 Hunter a 와 b 값은 높았고 Hunter L 값은 낮았다. 산화환원전위력의 경우 GSD가 가장 높았다.

Table 5. Physicochemical properties of various glasswort-derived salts.

sample	NaCl (%)	Moisture (%)	pH	ORP (mV)	Color		
					L	a	b
GSD	55.4±0.6	7.0±0.2	6.5	-77	4.81	0.02	1.63
GSDT	53.0±1.2	4.5±0.0	5.9	-21	3.41	0.42	2.50
GMT	25.5±0.4	3.9±0.1	6.2	3	7.28	-0.35	1.52
GHMT	23.5±0.4	3.2±0.1	6.4	-9	5.01	-0.05	0.27

GSD; 합초고압열수분무소금, GSDT; 합초고압열수분무소금원단, GMT; 합초초미세분말원단, GHMT; 합초초미세분말원단

#### 4) 함초소금원단과 함초분말원단의 ACE 저해 활성

함초소금원단과 함초분말원단들을 대상으로 ACE 저해 활성을 분석한 결과는 Fig. 13과 같다. 모든 함초원단에서는 ACE 저해 활성을 나타냄을 확인하였다. GSD는 GSDT보다 높은 ACE 저해 활성을 나타냈다. GSD를 이용하여 원단을 제조한 GSDT는 가공과정 중 가열에 의해 ACE 저해 활성 물질들이 분해되어 그 함량이 감소로 인해 낮은 저해 활성이 보인 것으로 시사되었다. GMT 및 GHMT는 유사한 ACE 저해 활성을 나타냈으며 GSD와 GSDT에 비해 상대적으로 높은 활성을 보였다.

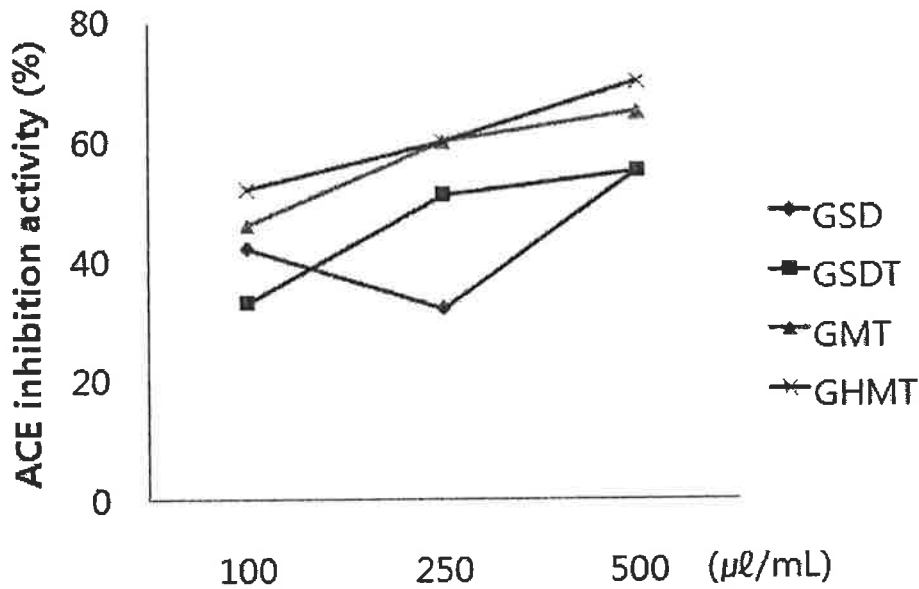


Fig. 13. ACE inhibitory activities of various glasswort-derived salts.

GSD; 함초고압열수분무소금, GSDT; 함초 함초고압열수분무소금 원단,  
GMT; 함초미세분말원단, GHMT; 함초초초미세분말원단.

5) 함초소금원단과 함초분말원단의  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성

함초소금원단과 함초분말원단들을 대상으로  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 검정하였다. 그 결과(Fig. 14), 함초원단은 control 인 acarbose에 비하여 낮은 활성을 보였다. 함초원단들 중 GSDT가 가장 높은  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 나타냈으며 시료 간에 유의적인 차이를 나타내었다. 함초분말원단들(GMT, GHMT)은 유사한  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 나타내었다.

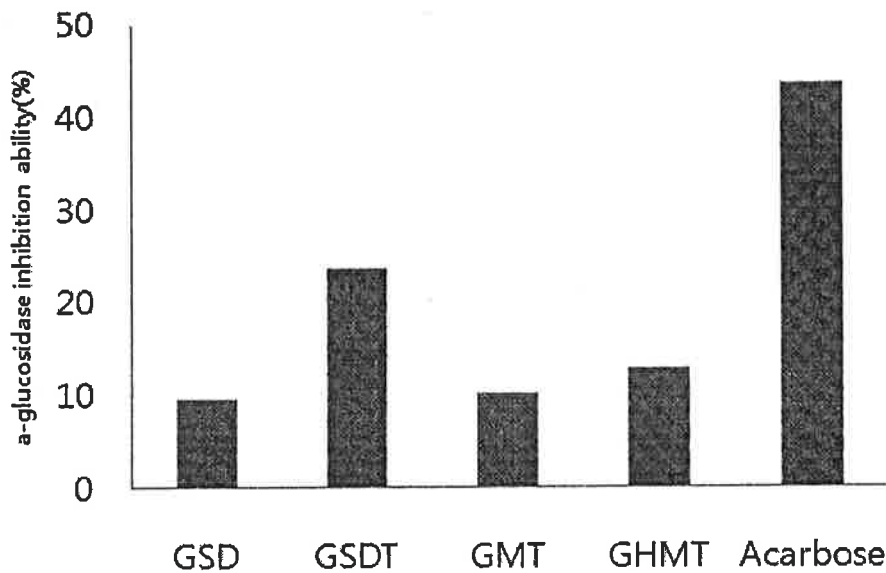


Fig. 14.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activities of various glasswort-derived salts.

GSD; 함초고압열수분무소금, GSDT; 함초 함초고압열수분무소금 원단,  
GMT; 함초미세분말원단, GHMT; 함초초초미세분말원단.

6) 함초소금원단과 함초분말원단의 DPPH radical-scavenging 활성

함초소금원단과 함초분말원단에 대한 DPPH radical-scavenging 활성을 분석한 결과는 Fig 15와 같다. 함초소금원단과 함초분말원단들은 농도 의존적으로 DPPH radical-scavenging 활성이 증가하는 경향을 보였다. 특히 GSDT가 GSD에 비해 높은 scavenging 활성을 나타냈다. 함초분말원단들(GMT, GHMT)은 유사한 DPPH radical-scavenging 활성을 나타내었다.

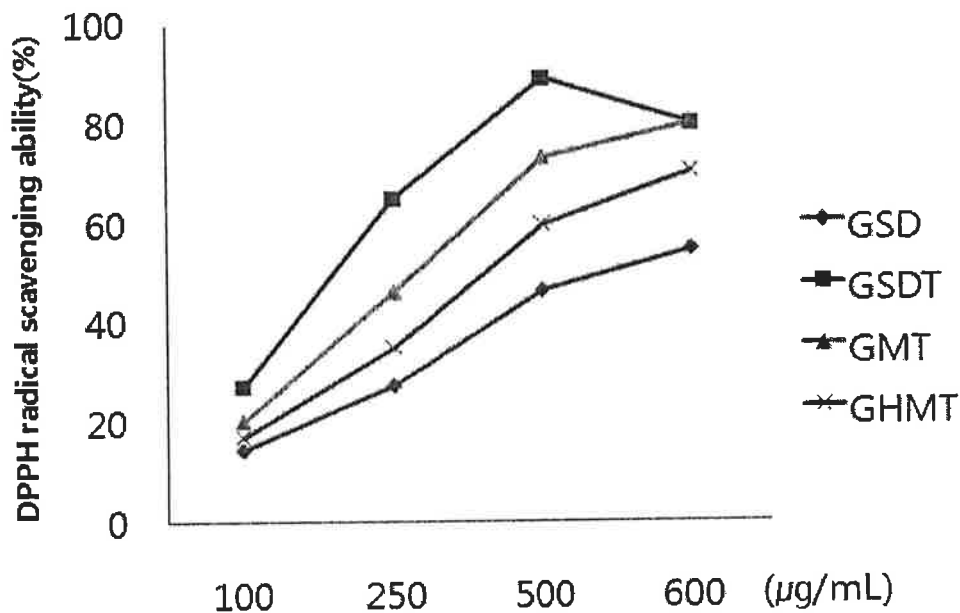


Fig. 15. DPPH radical-scavenging activities of various glasswort-derived salts.

GSD; 함초고압열수분무소금, GSDT; 함초 함초고압열수분무소금 원단,

GMT; 함초미세분말원단, GHMT; 함초초초미세분말원단.

7) 함초소금원단과 함초분말원단의 ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging 활성

함초소금원단과 함초분말원단에 대한 ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging을 측정 한 결과는 Fig 16과 같다. 함초소금원단과 함초분말원단들의 ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging은 DPPH radical-scavenging 활성과 마찬가지로 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 특히 GSDT가 GSD에 비해 높은 scavenging 활성을 나타냈다. 함초분말원단들(GMT, GHMT)은 유사한 ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging 활성을 나타내었다. 각 함초소금원단 간의 유의적인 차이는 나타내지 않았으며 GSDT가 다른 시료에 비하여 비교적 높은 소거활성을 보였다.

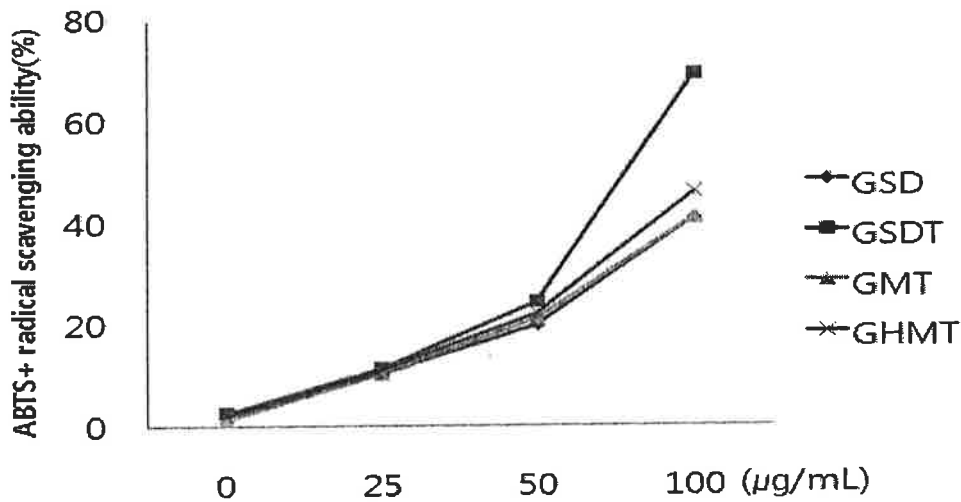


Fig. 16. ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging activities of various glasswort-derived salts.

GSD; 함초고압열수분무소금, GSDT; 함초 함초고압열수분무소금 원단,  
GMT; 함초미세분말원단, GHMT; 함초초초미세분말원단.

8) 합초소금원단과 합초분말원단의 총페놀성 화합물 함량

합초소금원단과 합초분말원단에 대한 총페놀성 화합물의 함량은 Fig 17과 같았다. GSD, GMT, GHMT의 총페놀성 화합물량은 약 23~27 mg/g으로 큰 차이를 보이지 않았으나 GSĐT는 약 42 mg/g으로 유의적인 차이를 나타내었다. 실질적인 GSD를 원료로 하여 GSĐT를 제조하여 두 시료간의 유의적인 차이를 보이지 않을 것으로 사료되었으나 DPPH radical 소거 활성의 기능성 분석에서 GSĐT가 높게 분석되었다.

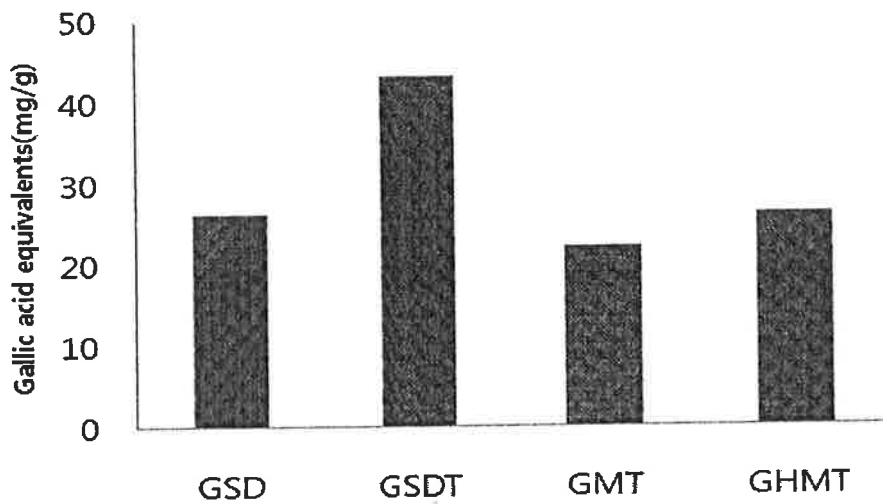


Fig. 17. Total phenolic compounds of various glasswort-derived salts.  
GSD; 합초고압열수분무소금, GSĐT; 합초 합초고압열수분무소금 원단, GMT;  
합초미세분말원단, GHMT; 합초초초미세분말원단

9) 함초소금원단과 함초분말원단 산가수분해물의 caffeic acid 및 ferulic acid 함량

가공 방법에 따른 Caffeic acid 및 ferulic acid의 함량을 분석한 결과는 Fig. 18과 19에 나타내었다. caffeic acid 와 ferulic acid 모두 유사한 경향을 나타냈으며 모든 식물 소금 중 GSDT의 함량이 caffeic acid와 ferulic acid 각각 48.63 mg/100g, 97.17 mg/100g으로 가장 높게 나타났다. 이는 총페놀성 화합물 및 항산화 능력을 통해 분석한 결과와 유사하게 나타났다

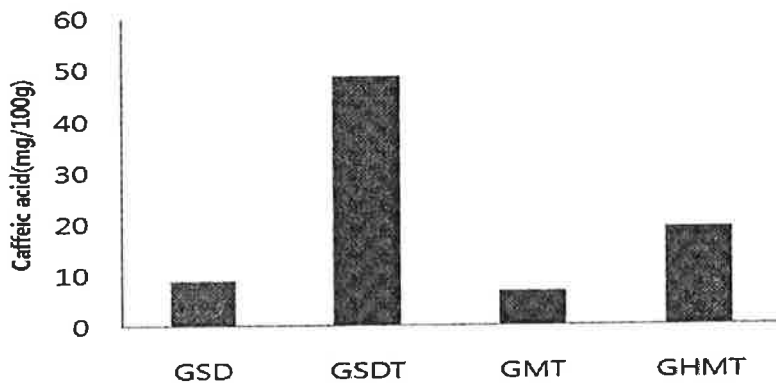


Fig. 18. Caffeic acid contents of various glasswort-derived salts. GSD; 함초고압열수분무소금, GSDT; 함초 함초고압열수분무소금 원단, GMT; 함초미세분말원단, GHMT; 함초초초미세분말원단.

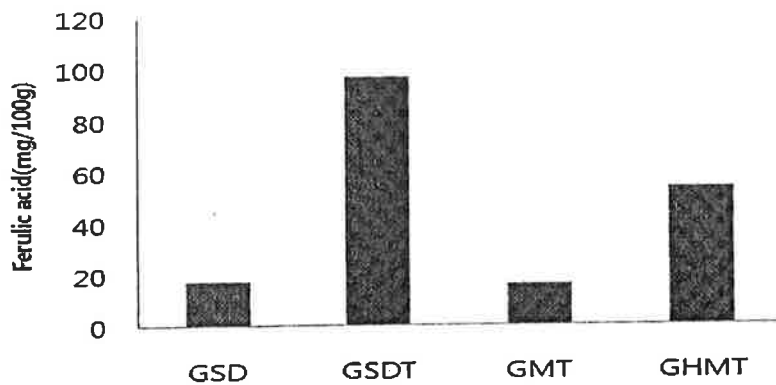


Fig. 19. Ferulic acid contents of various glasswort-derived salts. GSD; 함초고압열수분무소금, GSDT; 함초 함초고압열수분무소금 원단, GMT; 함초미세분말원단, GHMT; 함초초초미세분말원단.



10) 함초소금원단과 함초분말원단의 관능평가

가공 방법에 따른 식물소금의 관능평가를 분석한 결과는 Table 6과 같았다. 전체적인 기호도면에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 짠맛 및 단맛에서는 다소 차이를 보였으며 이는 제조 공정 중 열처리에 의해 식물소금의 관능적 차이가 발생한 것으로 사료되었다.

Table 6. Sensory evaluation of various glasswort-derived salts.

시료	관능평가 항목				
	푼내	짠맛	단맛	쓴맛	전체기호도
GSD	1.9	2.9	4.0	2.0	4.2
GSDT	1.9	3.0	3.8	2.2	4.0
GMT	2.2	2.2	3.1	2.0	4.0
GHMT	2.1	2.5	3.6	2.5	4.1

GSD; 함초고압열수분무소금, GSDT; 함초 함초고압열수분무소금 원단, GMT; 함초미세분말원단, GHMT; 함초초초미세분말원단

11) 저장기간 중 GSD의 수분함량 변화

저장기간 중 함초소금들의 수분함량을 분석한 결과를 Table 7에 제시하였다. GSD는 상대적으로 표면적이 넓고 미네랄 함량이 높아 수분의 흡습이 진행되어 서로 뭉치는 현상이 발생하였다. 이를 해결하기 위해 원단의 형태로 제조하였으며 원단 제조에 따른 함초소금의 수분함량을 분석한 결과 GSD보다 모든 식물소금에서 수분함량이 낮은 것으로 분석되었다. 이들을 25℃, 습도 70%의 조건에서 56일간 수분흡수량을 조사한 결과 GSD는 최종 56일째 10.1%로 초기보다 약 3%의 수분흡수량이 증가하였다. 그 외 원단들은 1% 미만의 수분흡수량을 보였다. 그러므로 함초소금의 제조에 있어 CMC 처리에 의한 원단 제조는 수분 흡습을 방지하는 효과적인 방법 중 하나임을 알 수 있었다.

Table 7. The change of moisture content during storage of various glasswort-derived salts.

(day)	Moisture (%)			
	GSD	GSDT	GMT	GHMT
0	7.02	4.1	3.9	3.2
14	7.8	4.2	4.0	3.3
28	8.3	4.3	4.0	3.5
42	9.8	4.3	4.1	3.6
56	10.1	4.6	4.6	4.1

GSD; 함초고압열수분무소금, GSDT; 함초 함초고압열수분무소금 원단, GMT; 함초미세분말원단, GHMT; 함초초초미세분말원단

이상의 결과에 의하면, GSDT가 GSD 및 GMT, GHMT보다 항산화, ACE 저해, 그리고  $\alpha$ -glucosidase저해 활성이 우수함을 확인하였다. 또한 함초소금의 제조에 있어 수분 흡습을 방지하기 위한 방법으로 유동코팅기를 활용하여 함초소금의 수분흡습을 방지하는 것이 상품화에 용이할 것으로 판단되었다. 함초식물소금들 간에 유의적인 관능적 차이는 없었으며 기능성 성분에 의한 차이에 의해 함초식물소금의 제조 방법 및 제조 공정은 GSDT 의 방식으로 결정하였다. 그러나 함초소금의 생산 원가 측면에서는 GMT와 GHMT가 낮은 생산비를 보였다.

### 3-3. 합초와 생물자원을 이용한 합초식물소금의 제조

앞에서 언급한 바와 같이 합초를 고압 열수 추출한 다음 얻어진 여액을 분무 건조하여 제조된 합초소금(GSD)은 항산화, ACE 저해, 그리고  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 나타내면서 미네랄 함량이 높음을 확인하였다. 또한 이 소금은 관능평가에서도 높은 점수를 얻었으며 경제적 측면에서도 GSD가 가장 적합한 합초소금으로 판단되었다. 합초소금을 유동코팅기를 이용하여 제조된 합초소금원단은 높은 생리활성뿐만 아니라 수분 흡습 억제 효과가 있어 상품화가 가능할 것으로 시사되었다. 앞서 살펴본 바와 같이 항산화, ACE 저해, 그리고  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 갖는 합초소금에 유용 식물추출물을 첨가하여 혈압강하 혹은 다른 기능성이 더욱 향상된 식물소금을 제조하고자 하였다. 특히 농산물들 중 특정 식품원료에는 다른 식물들보다 혈압을 낮추는데 기여하는 ACE 저해 활성이 높다고 보고된 바 있다. 이들 생물자원과 합초를 혼합하여 항고혈압, 항산화성을 보완한 기능성이 우수한 합초식물소금들을 제조하고자 하였다.

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 식물소금의 제조

건합초에 생물자원의 첨가량을 달리하여 혼합한 다음 물 10 L로 130°C에서 5시간을 추출한 다음 여과하여 얻어진 여액을 분무건조하여 합초식물소금(GG)을 제조하였다(Fig 20). 또한 GL소금은 GG소금의 제조방법과 동일한 방법으로 제조하였다.

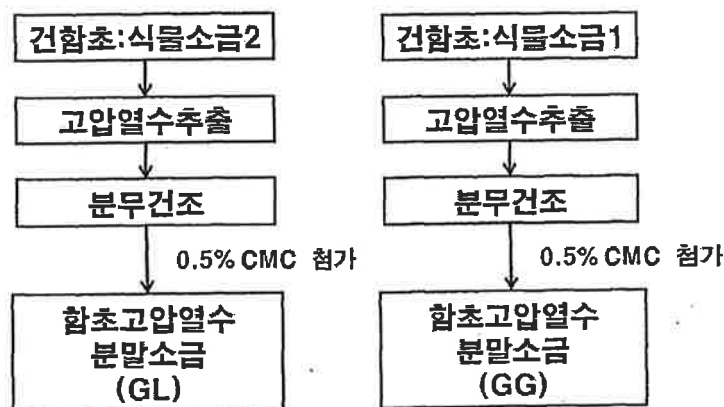


Fig. 20. Manufacturing process of glasswort and plant-derived salts

#### 나. 실험 방법

본 장에서 사용된 실험 방법은 3-1장에서 진행한 방법과 동일하게 실행하였다.

#### 다. 결과

##### 1) 함초식물소금들의 이화학적 특성

생물소재들을 혼합하여 제조된 함초식물소금들의 이화학적 특성을 분석한 결과는 Table 8과 같다. GG소금(GG91, GG73)의 pH 범위는 4.34~4.48이었으며 생물소재 첨가량이 증가할수록 pH가 약간 상승하였으나 산화환원력(ORP)은 감소하였다. 또한 염도의 경우 생물소재 첨가량이 많을수록 약간 감소하는 경향을 나타냈다. GL소금(GL91, GL73)의 pH 범위는 4.83~5.54로 GG소금보다 약간 높았으며 생물소재 첨가량이 증가할수록 pH가 약간 상승하였음 생물소재 첨가량이 증가할수록 ORP는 감소한 반면 염도는 약간 감소하는 경향을 나타냈다.

Table 8. Physicochemical properties of glasswort-plant derived salts

Sample	pH	ORP (mV)	NaCl(%)
GL91 (9:1, w/w)	4.83	162	46.0
GL73 (7:3, w/w)	5.54	139	45.0
GG91 (9:1, w/w)	4.34	193	38.0
GG73 (7:3, w/w)	4.48	167	35.5

##### 2) 함초식물소금들의 ACE 저해활성

생물소재들을 혼합하여 제조된 GG소금과 GL소금을 대상으로 ACE 저해활성을 측정 한 결과(Table 9), 식물소금 중 GG소금 7:3 w/w (GG73)가 67.11%로 가장 높은 저해 활성을 나타냈다. 함초에 식물소재 첨가량이 증가할수록 ACE 저해 활성의 감소를 나타내 다시마보다는 함초에 ACE 저해 활성이 더 높은 것으로 추측된다. 그러나 GG소금의 경우도 생물소재 첨가량이 증가할수록 ACE 저해 활성의 증가를 나타냈다. 이 생물소재

는 높은 ACE 저해 활성을 갖고 있어 이들 유래의 ACE 저해 물질들에 의해 그 활성이 증가한 것으로 시사되었다.

Table 9. ACE inhibitory activities of glasswort and plant-derived salts

Samples	ACE inhibition activity (%)
GL91 (9:1, w/w)	63.26
GL73 (7:3, w/w)	54.62
GG91 (9:1, w/w)	60.00
GG73(7:3, w/w)	67.11

### 3) 함초식물소금의 $\alpha$ -glucosidase 저해활성

함초식물소금들을 대상으로  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성 검정에 의해 해당농도 활성을 평가하였다. 그 결과(Fig. 20), 식물소금 중 GG소금 7:3 w/w (GG73)이 가장 높은  $\alpha$ -glucosidase 활성을 보인 반면 GG소금 9:1 w/w (GG91)이 가장 낮은 저해 활성을 보였다. ACE 저해 활성과 마찬가지로 생물소재 첨가량이 많을수록  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성이 증가를 나타내 이 생물소재는  $\alpha$ -glucosidase 저해 물질이 함초보다 많이 함유하고 있는 것을 추측되었다.

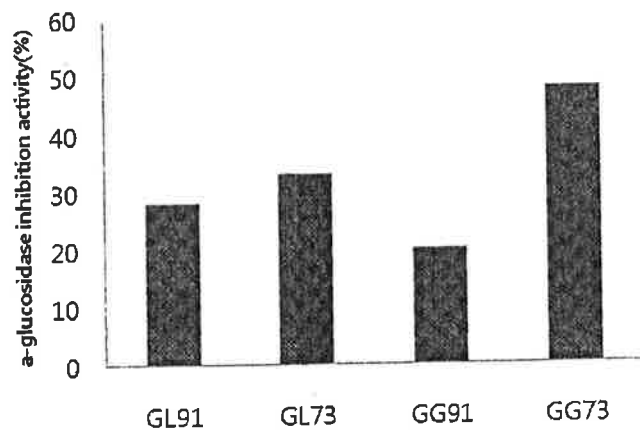


Fig. 20.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activities of glasswort and plant-derived salts.

#### 4) 합초식물소금의 총페놀성 화합물 함량

GG소금과 GL소금을 대상으로 총페놀성 화합물 함량을 측정한 결과(Fig. 21), GL소금의 경우 생물소재 첨가량이 많을수록 그 함량이 증가하는 경향을 보였다. 합초는 다른 식물에 비해 높은 페놀성 화합물을 함유하고 있으나 이 생물소재가 더 많은 함량을 함유하고 있는 것으로 시사되었다. GG소금의 경우 생물소재 첨가량이 많을수록 이 또한 총페놀성 화합물 함량이 높게 나타났으며 합초와 생물의 배합비가 7:3 (w/w)인 GG73에서 가장 높은 함량을 보였다.

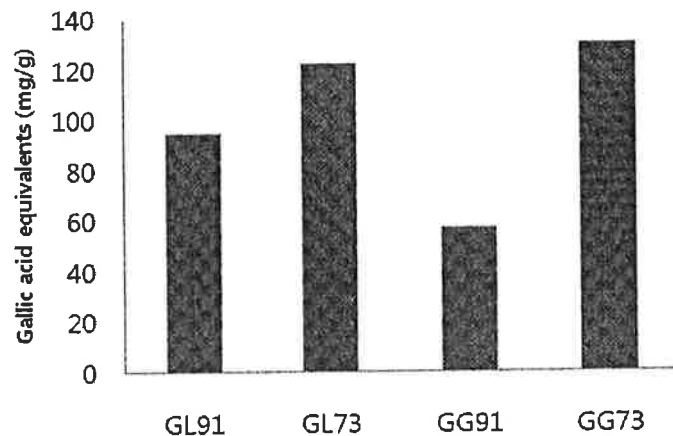


Fig. 21. The total phenolic contents of glasswort and plant-derived salts.

#### 5) 합초식물소금의 caffeic acid와 ferulic acid 함량

GL소금에 함유된 기능성 물질인 caffeic acid와 ferulic acid 함량을 알아보하고자, 소금을 산가수분해한 다음 이를 ODS-HPLC 분석을 행하였다. 그 결과(Table 10). GL소금에서는 caffeic acid가 ferulic acid보다 높은 함량으로 존재하였다. 생물소재 첨가량이 많을수록 이들 성분의 함량이 증가하는 경향을 나타내 합초에 존재하는 caffeic acid 외에 생물소재에도 다량 존재하고 있는 것으로 시사되었으나 본 실험에서는 생물소재고압열수추출물에 대한 caffeic acid와 ferulic acid의 함량을 조사하지 않아 현재의 결과로 알 수 없었다. GG소금의 경우 HPLC chromatogram상에 ferulic acid 및 caffeic acid의 머무름값에 다수의 peak들이 존재하고 있어 이들 성분의 정성 및 정량은 불가능하였다.

Table 10. Caffeic acid and ferulic acid contents of glasswort and plant-derived salts.

Samples	(mg/100g)	
	caffeic acid	ferulic acid
GL91 (9:1, w/w)	14.59	0.94
GL73 (7:3, w/w)	57.48	2.43

#### 6) 합초식물소금의 항산화 활성

합초식물소금들을 대상으로 DPPH과 ABTS<sup>+</sup> 자유 라디칼 소거 활성 검정에 의해 항산화 활성을 평가하였다. GG소금 및 GL소금들의 DPPH과 ABTS<sup>+</sup> 자유 라디칼 소거 활성은 ACE와  $\alpha$ -Glucosidase 저해 활성의 결과와 유사한 결과를 얻었다. 식물소금 중 GG소금 7:3 w/w (GG73)이 가장 높은 활성을 보인 반면 GG소금 9:1 w/w (GG91)가 가장 낮은 저해 활성을 보였다(Fig. 22, Fig. 23). 또한 생물소재 첨가량이 많을수록  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성이 증가를 나타내 생물소재도 합초에 radical-scavenging 활성이 더 높은 것으로 시사되었다.

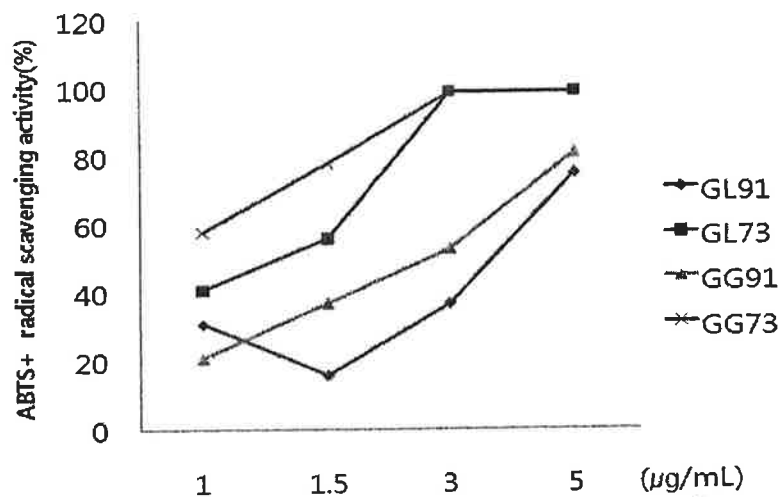


Fig. 22. DPPH radical scavenging activities of glasswort and plant-derived salts.

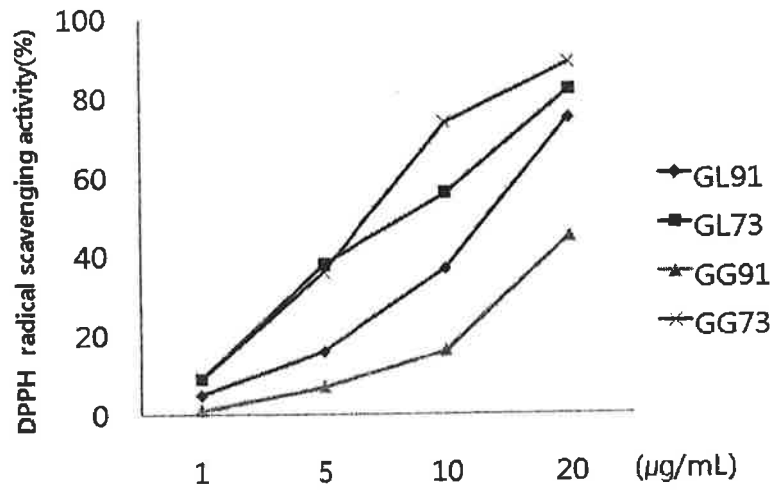


Fig. 23. ABTS+ radical-scavenging activities of glasswort and plant-derived salts.

이상의 연구 결과를 종합해 보면, 식물소금 제조 시 함초에 생물소재의 첨가량이 많을수록 총페놀성 화합물의 함량이 증가하고 혈압상승억제, 항당뇨, 그리고 항산화 등의 생리활성이 증가함을 알 수 있었다. 특히, 이들 가공은 혈압상승억제 혹은 항당뇨 효과가 강화된 식물소금의 후보로 판단되었다. 이들 식물소금이 실제 동물실험에서 혈압상승억제 혹은 항당뇨 효과가 있는지 전임상실험으로 그 기능을 해명하고자 하였다.



### 3-4. 염 민감쥐에서 합초소금들과 합초식물소금이 혈압과 당뇨에 미치는 영향

합초소금을 제조하기 위하여 합초고압열수추출액을 이용하여 제조된 합초고압열수분무소금(GSD)과 합초고압열수가열농축소금(GHC), 합초고압열수분무소금을 이용하여 제조된 합초고압열수분무소금원단(GSDT), 그리고 건합초를 미세 혹은 초미세 분말을 이용하여 제조된 합초미세분말원단(GMT)과 합초초미세분말원단(GSDT)을 제조하였으며, 이들 합초소금은 *in vitro*상의 실험결과에서 혈압상승억제, 항당뇨, 그리고 항산화 활성 등의 기능성을 나타냈다. 또한 합초소금이 갖는 생리활성에 식물을 첨가하여 혈압상승억제 효과가 보다 강화된 합초식물소금을 제조하였다. 특히 합초고압열수분무소금원단(GSDT)과 합초식물소금(GG)이 혈압상승억제, 항당뇨, 그리고 항산화 활성 등의 기능성을 나타냈을 뿐만 아니라 관능검사에서도 우수한 점수를 받았다.

이상과 같은 결과에 따라 염 민감쥐를 이용하여 합초고압열수분무소금(GSD)과 합초식물소금(GG)의 항고혈압 및 항당뇨 효과를 평가하고자 하였다. 이에 앞서 염민감쥐를 이용한 선행 연구를 조사해 본 결과, 염 민감쥐를 이용한 생물소재의 항고혈압 효과에 대한 연구는 다수 보고된 바 있으나 항당뇨 효과에 대한 연구는 보고된 바가 없었다. 또한 염 민감쥐는 일반쥐보다 10배 이상(약 26-28만원) 비싸고 실험 동물수(최소 40마리)가 많기 때문에 그 동물실험비가 매우 많이 소요될 것을 생각되었다. 그래서 본 실험을 행하기 전에 적은 수의 염 민감쥐로 예비 실험을 실시하였다. 본 연구실에서는 예비실험으로 염 민감쥐에 8% NaCl의 미네랄이 풍부한 소금(SS, 천일염) 및 미네랄이 거의 없는 소금(RS)이 함유된 사료를 섭취시켜 혈압 및 항당뇨 활성을 평가하고자 하였다.

#### 가. 실험 방법

##### 1) 실험동물

본 연구에 사용한 실험동물은 9 주령(240 g 내외)의 Sprague-Dawley rat을 피드랩(주)(한국)으로부터 구입하였다.

##### 2) 사육 조건

사육환경은 온도 21~24℃, 습도 50~60%가 되도록 유지하였고, 명암은 12시간(day light 06:00~18:00)을 주기로 하여 사육 케이지당 2마리씩 넣어 2주일간 환경에 적응

시킨 후 실험을 수행하였다.

### 3) 사료 제조 및 투여방법

모든 식이군의 사료에 NaCl 함량을 8% 기준으로, 8%의 미네랄이 풍부한 소금(천일염) 식이군(SS) 및 8%의 미네랄이 거의 없는 소금 식이군(RS)으로 구분하였으며, 대조군군(Control, C)에는 정상 식이를 실시하였으며, 물과 함께 자유롭게 9주 동안 섭취하도록 하였다.

### 4) 사료 및 물 섭취량, 식이효율

각 시료군을 대상으로 쥐의 체중증가량은 안정화 기간이 끝난 시점을 초기체중으로 하여 주 1회 총 9주간 측정하였다. 식이섭취량은 식이공급량에 대한 잔량 및 흘린 양을 제외하고 계산하였고, 물 섭취량은 주 1회 총 9주간 측정하였다. 식이효율(food efficiency ratio: FER)은 체중증가량에 대한 식이섭취량으로 나누어 계산하였다.

### 5) 실험동물 혈압 측정방법

모든 실험동물의 수축기와 이완기 혈압은 tail-cuff 방법으로 측정하였다. 실험동물의 혈압측정 시스템 적용을 위하여 2주 동안 실제 측정 시스템과 똑같은 환경에서 적응 훈련을 시킨 후, tail-cuff 방법에 의해 측정하였다. 실험쥐의 움직임을 최소화하기 위해 혈압측정용 홀더에 넣어 Pressure meter(Panlab, Spain)의 30°C heating chamber에서 10 여분동안 안정시킨 다음 꼬리에 cuff를 끼워 수축기와 이완기 혈압을 측정하였다. 혈압은 식이기간 동안 주 1회로 하여 5회 이상 측정하여 얻어진 혈압의 평균을 데이터로 사용하였다.

### 6) 포도당 내성검사(OGTT; Oral glucose tolerance test)

식이 9주 후, 희생 1일전에 12시간 절식시킨 후 혈당을 측정한 다음, 5% 포도당(4 g/Kg)용액을 경구 투여하였으며 이후 30, 60, 120, 180분에 꼬리 정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈당은 혈당측정기(지닥터, 녹십자, 한국)를 이용하여 측정하였다.

### 7) 지방조직 및 근육조직에서의 포도당 이용율(glucose uptake) 측정

실험하기 12시간 전 절식시킨 후 ethyl ether로 마취시켜 희생한 다음 복부지방(400 mg)을 취하여 시료로 사용하였다. 채취된 조직을 즉시 Krebs Henseleit buffer로

세척하여 24 well plate에 넣어 37°C에서 15분간 전배양 하였다. 전배양 후 인슐린이 첨가 혹은 무첨가된 배양액으로 나누어 2-deoxy-D-glucose를 가한 다음 37°C에서 30분간 배양하였다. 반응이 끝난 후 0.9 % 생리식염수로 세척한 다음 액체질소로 급속 냉동시켜 -70°C에서 보관하면서 분석에 사용하였다. 보관된 시료에서 20 mg의 지방조직을 취하여 0.1 N HCl 400  $\mu$ L와 함께 homogenizing하여 95°C에서 15분간 가열한 다음, 동량의 0.1 N NaOH와 0.5 M TEA (triethanolamine, pH 8.1) 200  $\mu$ L를 첨가한 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이어 반응액 50  $\mu$ L에 assay cocktail (Diaphorase-NADP amplifying system) 150  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 90분간 반응시켜 fluorescence (excitation 530 nm, emission 590 nm)를 이용하여 측정하였다. 표준곡선은 2-deoxy-D-glucose를 이용하여 작성하였다.

#### 8) 자료처리

본 실험결과와 통계처리는 SPSS (v 18.0)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었다. 모든 결과는 반복 측정법(repeated measure)을 사용하였으며 각 시간에 따른 집단 간 차이는 One-way ANOVA와 사후검정(Duncan's test)을 실시하였으며 분석 시 유의수준은  $\alpha=0.05$ 로 설정하여 측정하였다.

## 나. 결과

### 1) 염 민감쥐에서 소금이 혈압에 미치는 영향

SS 식이군 및 RS 식이군을 9주간 식이한 후, 각 식이군의 수축기 혈압과 이완기 혈압을 측정하였다. 그 결과(Fig. 24), 수축기 혈압의 경우 정상식이군은 140 mmHg로 고식염식이군에 비해 혈압 상승이 적었다. 그러나 SS 식이군은 175 mmHg, RS 식이군은 242 mmHg로 큰 폭으로 상승하였으며 두 집단 간의 유의적인 차이를 나타냈다. 또한 SS 식이군은 RS 식이군보다 약 70 mmHg 정도의 낮은 혈압 상승이 억제효과를 보였으며 이 결과는 선행연구의 결과와 일치 하였다. 이완기 혈압 또한 수축기 혈압과 유사한 경향을 보였으며 두 집단 간의 유의적 차이를 나타냈다. 그러므로 염 민감쥐에서 미네랄이 풍부한 소금(천일염)의 섭취는 미네랄이 거의 없는 소금보다 혈압상승 억제 효과가 있음이 확인되었다.

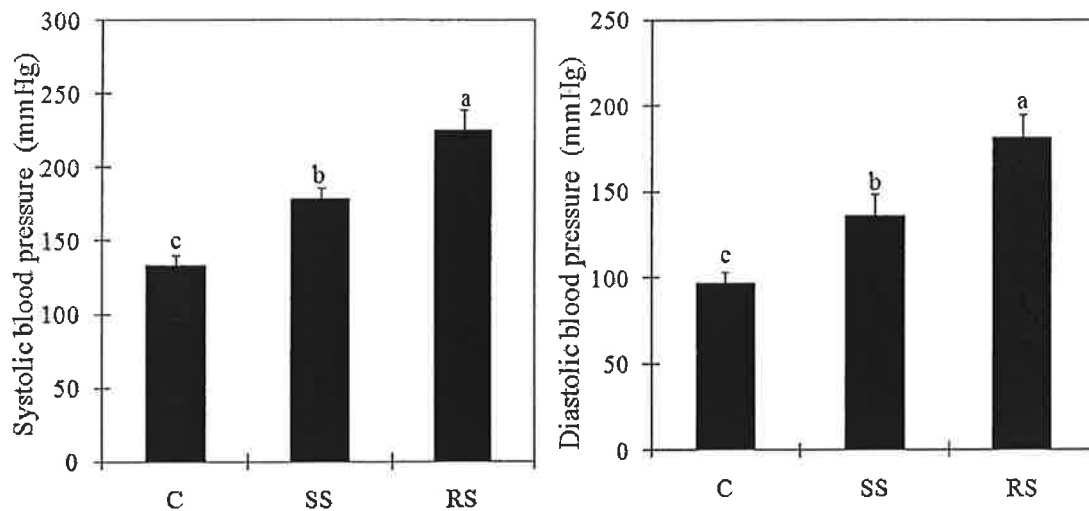


Fig. 24. Systolic and diastolic blood pressure in Dahl salt-sensitive rats fed diet containing 8% salt.

C, control; SS, Dahl salt-sensitive rats fed diet 8% Mineral-rich salt; RS, Dahl salt-sensitive rats fed diet 8% reagent salt.

## 2) 염민감쥐에 소금이 당뇨에 미치는 영향

SS 식이군 및 RS 식이군을 9주간 식이한 후, 각 식이군에 대한 포도당 부하 내성 검사를 행하였다. 그 결과, 두 집단 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Fig. 25). 또한 희생 후 각 식이군의 근육 및 지방조직을 채취한 다음 이들에 대한 glucose uptake를 조사한 결과 (Fig. 26), 지방조직과 근육조직에서는 SS 식이군이 RS 식이군보다 glucose 함량이 높게 나타났으나 두 집단 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

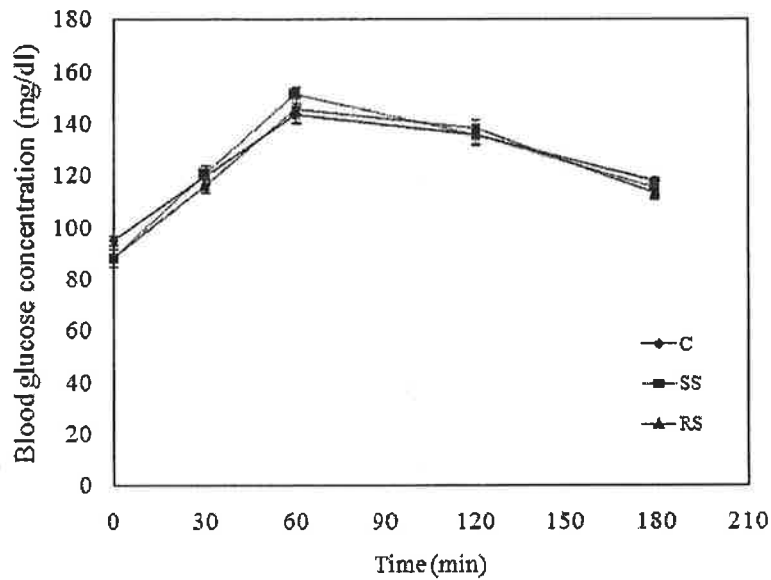


Fig. 25. Glucose tolerance test in Dahl salt-sensitive rats fed diet containing 8% salt. C, control; SS, Dahl salt-sensitive rats fed diet 8% Mineral-rich salt; RS, Dahl salt-sensitive rats fed diet 8% reagent salt.

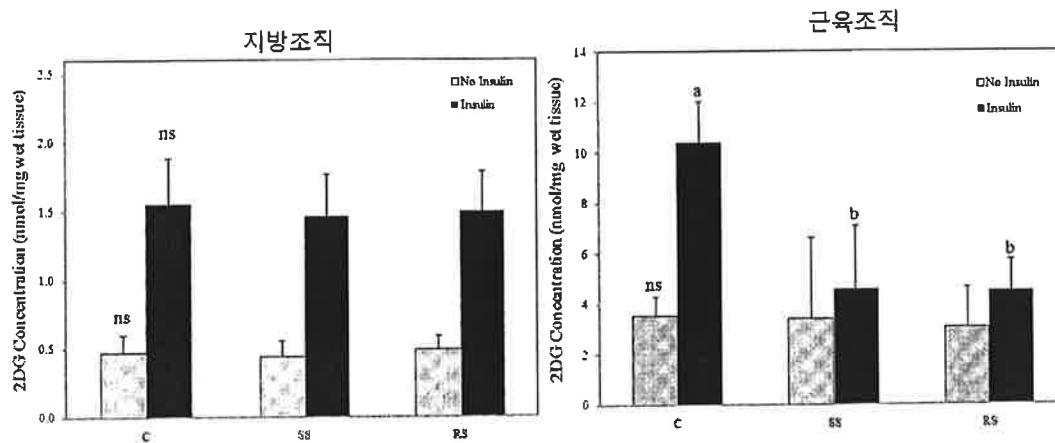


Fig. 26. Glucose uptakes in adipose tissue and skeletal muscle of Dahl salt-sensitive rats fed diet containing 8% salt.

C, control; SS, Dahl salt-sensitive rats fed diet 8% Mineral-rich salt; RS, Dahl salt-sensitive rats fed diet 8% reagent salt.

이상의 결과로부터, 미네랄이 풍부한 소금이 미네랄이 거의 없는 소금에 비해 혈압 상승 완화 효과를 나타내, 기존 염 민감쥐 및 정상쥐에 행한 실험결과와 일치함을 확인하였다. 그러나 미네랄이 풍부한 소금과 미네랄이 거의 없는 소금은 포도당부하내성검사 및 glucose uptake에서 유의적인 차이를 나타내지 않아 두 소금이 당뇨에 미치는 영향 차이를 확인할 수 없었다. 그래서 염 민감쥐에서 함초고압열수분무소금(GSD)과 함초식물소금(GG)의 혈압상승 억제 효과에 대한 평가는 가능하나 이들의 항당뇨 효과에 대한 평가는 불가능할 것으로 판단되었다.

### 3-5. 정상쥐에서 식물소금들이 혈압과 당뇨에 미치는 영향

제 3-4에서 언급한 바와 같이 예비실험으로 염 민감쥐에 천일염과 정제염을 식이하여 혈압 상승 억제 및 항당뇨 효과를 평가한 바에 의하면 염 민감쥐에서는 천일염 식이군이 정제염식이군에 비해 혈압 상승 완화 효과를 확인할 수 있었으나, 천일염 식이군과 정제염 식이군은 포도당부하내성검사 및 glucose uptake에서 유의적인 차이를 나타내지 않아 이들 소금간의 항당뇨 효과에 대한 분명한 차이를 확인할 수 없었다. 그러므로 염 민감쥐에서 함초소금들의 혈압상승 억제 효과에 대한 평가가 가능할 것으로 생각되나 이들의 항당뇨 효과에 대한 평가는 불가능할 것으로 판단되었다.

최근 본 연구실에서는 정상쥐(Sprague-Dawley rat)에서 미네랄이 풍부한 천일염이 미네랄이 거의 없는 소금에 비해 인슐린 저항성을 줄여 주고 혈압 상승을 억제하고 과다 소금 섭취로부터 오는 산화적 스트레스를 줄여 주는 효과를 밝혔다. 그래서 정상쥐로부터 함초를 이용하여 제조된 함초고압열수분무소금 (GSD), 건함초를 초미세 분말을 이용하여 제조된 함초초미세분말원단 (GHP), 그리고 함초소금이 갖는 생리활성에 건강기능성을 강화시키려는 목적으로 제조된 생물자원을 혼합하여 제조한 GG소금과 GL소금 섭취에 따른 항고혈압 및 항당뇨 효과를 평가하고자 하였다.

#### 가. 실험 재료 및 방법

##### 1) 실험동물

실험동물은 9주령의 Sprague-Dawley 수컷 쥐를 다물 사이언스로부터 구입하였으며 케이지당 2마리씩 넣어 사육하였다. 사육환경은 온도 21~24℃, 습도 50~60%가 되도록 유지하였고, 명암은 12시간(day light 06:00~18:00)을 주기로 하여 2주일간 환경에 적응시킨 다음 실험을 수행하였다.

##### 2) 실험계획

2주간 환경 적응을 마친 실험쥐는 난괴법에 의해 각 그룹당 8마리씩, 정상군과 당뇨군으로 나누고, 당뇨군은 다시 대조군과 함초소금 식이군들(GG, GL, GSD, GHP)로 구분하였다. 정상군의 사료는 AIN-93G에 의해 제조된 일반사료를 공급하였고, 당뇨군의 사료는 2형 당뇨 유발을 목적으로 과량의 NaCl(4%)을 첨가하였다. 즉, 당뇨 대조군에

는 4% NaCl을 첨가하였고, 합초소금 식이군들의 경우, 본 실험에 사용된 합초소금들의 NaCl 함량이 약 50%인점을 감안하여, AIN-93G에 NaCl 3.5%와 합초소금 1%를 첨가 (총 NaCl 함량 4%)하여 사료를 제조하였다. 이때, 사료와 물은 자유롭게 섭취할수 있도록 하였으며, 4주간의 실험기간동안 섭취한 사료와 물의 양은 매일, 체중은 주 1회 측정하였다.

### 3) 포도당 내성검사(OGTT; Oral glucose tolerance test)

식이 4주 후, 희생 1일전에 12시간 절식시킨 후, 혈당을 측정하고 곧바로 5% 포도당 (2g/Kg)용액을 경구 투여하여 30, 60, 120, 180, 240분에 꼬리 정맥으로부터 채혈한 혈액을 채취하였으며 혈당은 혈당측정기(지닥터, 녹십자, 한국)를 이용하여 측정하였다.

### 4) 혈액 채취

식이 4주 후 희생한 쥐의 심장으로로부터 혈액을 채취하여 헤파린이 처리된 용기에 넣어 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 얻었으며 얻어진 혈장은 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 5) 혈장 지질 농도 측정

혈장에서의 중성지방, 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤의 함량은 효소정량법에 의한 kit(아산제약, 한국)를 이용하여 측정하였다. 여기서 구해진 값을 이용하여 아래의 식에 의해 LDL 콜레스테롤의 함량을 계산하였다.

$$\text{LDL 콜레스테롤} = \text{총콜레스테롤} - \text{HDL 콜레스테롤} - (\text{중성지방}/5)$$

(중성지방 < 400 mg/dL일 경우)

### 6) 혈압 측정

실험동물의 혈압측정 시스템 적응을 위하여 2주 동안 실제 측정 시스템과 똑같은 환경에서 적응 훈련을 시킨 후, tail-cuff 방법에 의해 측정하였다. 실험쥐의 움직임을 최소화하기 위해 혈압측정용 홀더에 넣어 Pressure meter(Panlab, Spain)의 30℃ heating chamber에서 10 여분동안 안정시킨 다음 꼬리에 cuff를 끼워 수축기와 이완기 혈압을 측정하였다. 혈압은 식이기간 동안 주 1회로 하여 5회 이상 측정하여 얻어진 혈압의 평균을 데이터로 사용하였다.



#### 7) 자료 처리

본 실험결과의 통계처리는 SPSS (v 18.0)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었다. 모든 결과는 반복 측정법(repeated measure)을 사용하였으며 각 시간에 따른 집단 간 차이는 One-way ANOVA와 사후검정(Duncan's test)을 실시하였으며 분석 시 유의수준은  $\alpha=0.05$ 로 설정하여 측정하였다.

## 나. 결과

### 1) 체중 증가량 및 식이 섭취량

식물소금들을 4% NaCl와 함께 Spraque-Dawley 쥐에 4주간 식이하였다. 식이 4주 후 정상식이군(N)의 체중은 약 110 g으로 증가하였으나 과량의 소금을 섭취시킨 대조군(C)과 식물식이군들(GG, GL, GSD, GHP)은 정상식이군보다 낮은 체중 증가율을 보였다 (Fig. 27). 제조된 식물소금들을 5주 섭취하는 동안 식이 섭취량은 집단 간의 거의 차이가 없었다 (Fig. 28). 그럼에도 불구하고 소금이 함유된 사료를 섭취시킨 대조군(C)의 체중 증가율이 가장 낮았으며 식물소금식이군들은 이보다 높은 체중 증가율을 보였다. 이는 과량의 소금을 섭취시킨 정상쥐나 염민감쥐의 체중 증가율과 일치하는 결과를 얻었다. 따라서 과다 소금 섭취는 혈압 상승 및 인슐린 저항성 등을 유발시키고 체내 산화적 스트레스에 영향을 주고 혈중 지방 함량을 낮춘다고 보고된 바 있어 아로 인해 체중 증가율이 낮았던 것으로 시사되었다. 그러나 식물소금식이군들에 따라 체중 증가율이 차이를 보였으나 이들 모두가 대조군보다 높은 체중 증가율을 보였던 것은 함초가 체내 산화적 스트레스를 적게 주고 혈중 지방 대사를 정상적으로 이루어지도록 도움을 주는 인자가 있는 것으로 시사되었다.

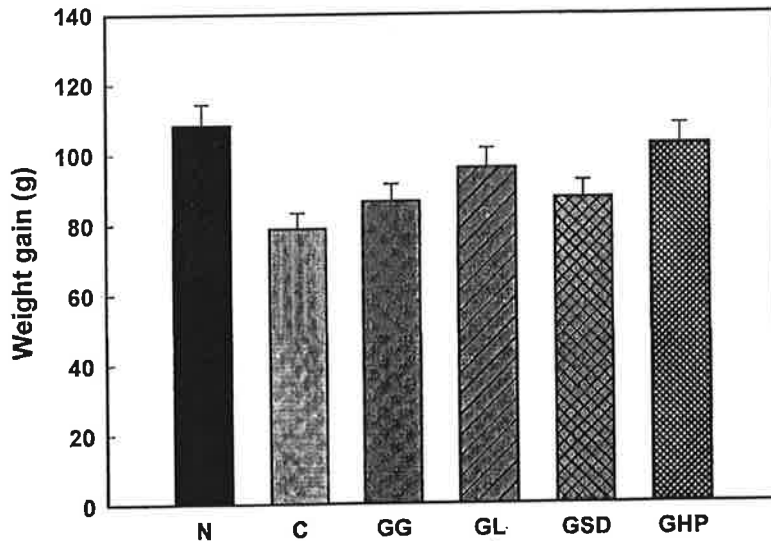


Fig. 27. Body weight gain of rats fed various glasswort-derived salt.

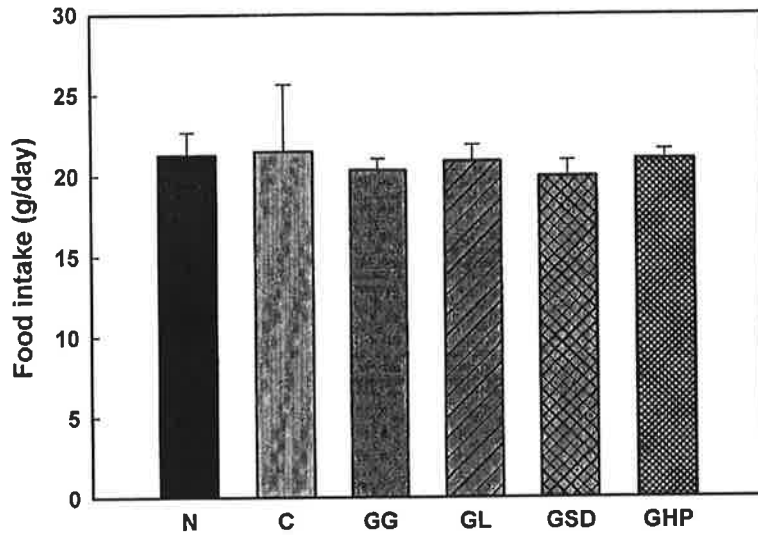


Fig. 28. Food intake of rats fed various glasswort-derived salt.

## 2) 포도당 내성 실험

포도당경구투여내성실험은 희생 전 12시간 이상 절식시킨 후 5% 포도당(2g/Kg)을 복강투여한 다음, 일정 간격으로 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 정상쥐인 lean (N)은 복강 투여 후 120분까지 지속적으로 증가하다가 이후 감소를 나타냈다. 그러나 식물소금들을 섭취시킨 식이군에 따른 복강투여 후 30에서 120 분까지 다양하게 혈당이 상승한 다음 혈당이 감소하는 경향을 나타냈다. 그러나 GSD 식이군과 GG 식이군을 포함한 각 집단 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

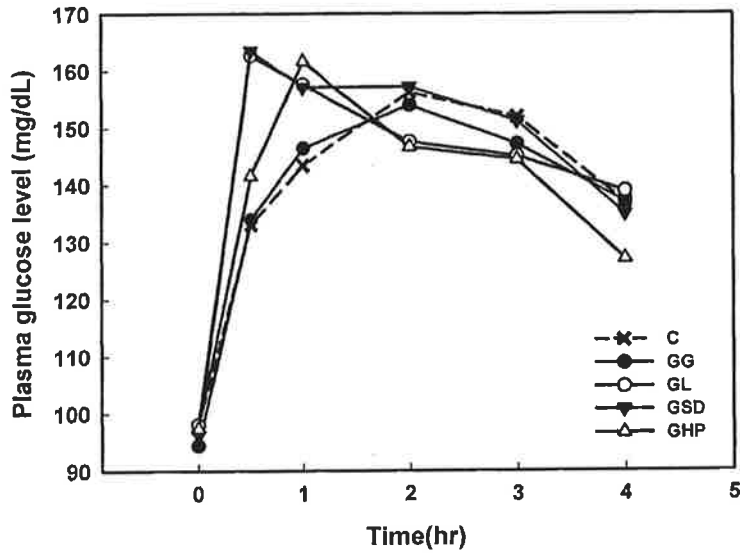


Fig. 29. Glucose tolerance of rats fed various glasswort-derived salt.

### 3) 혈압의 변화

다양한 식물소금들을 4% NaCl와 함께 Spraque-Dawley 쥐에 섭취시키면서 3주와 4주에 수축기와 이완기의 혈압을 측정하였다(Fig. 30). 그러나 모든 식이군에서 수축기와 이완기의 혈압간의 일관성 있는 경향이 보이지 않아 신뢰할 수 없는 결과를 얻었다. 본 실험에 실험대상이 너무 많고 또한 혈압측정이 tail-cuff법으로 측정할 때 장시간 소요되어 쥐에 많은 스트레스를 주었기 때문에 결과에 대한 신뢰도는 매우 낮은 것으로 판단되었다.

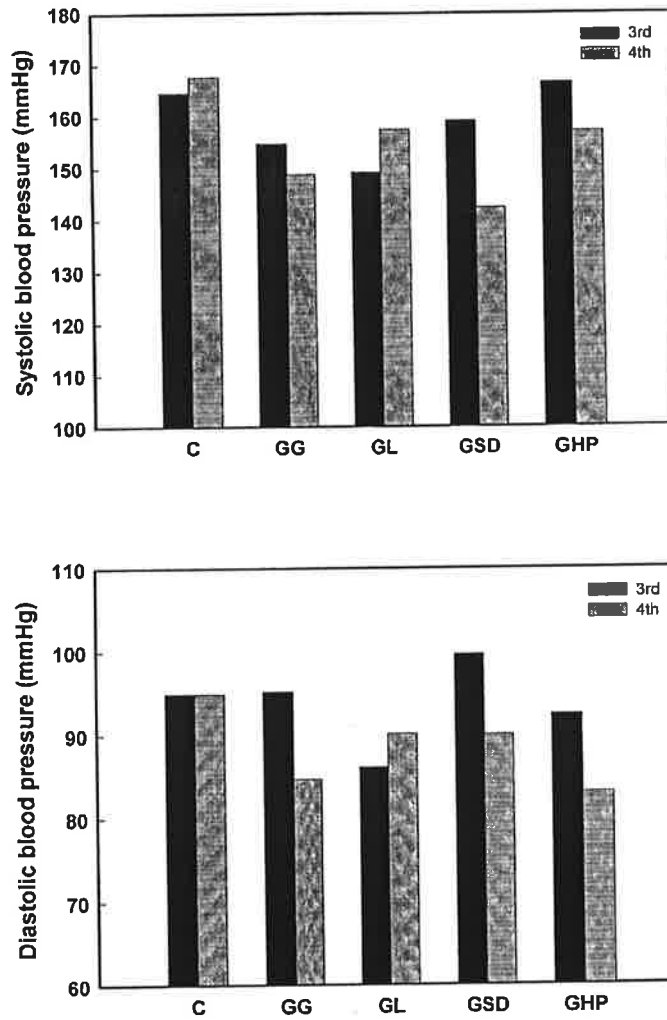


Fig. 30. Systolic and diastolic blood pressure of rats fed various glasswort-derived salt(3 and 4 weeks).

#### 4) 혈중 중성지질 및 콜레스테롤 함량

식물소금들을 식이한 4주 후 희생시킨 쥐의 혈액으로부터 분리한 혈장에서 중성지질, 총콜레스테롤(CHOL), LDL-C, 그리고 HDL-C의 농도를 조사하였다. 혈중 중성지질 함량의 경우 정상군 120 mg/dl로 나타났으나 소금을 섭취한 식이군들은 정상군에 비해 매우 낮은 수치를 나타냈다(Fig. 31). 이는 과다 소금을 섭취하였을 때 중성지질 함량이 감소한다는 결과와 일치하였다. 이에 비해 식물소금식이군들 중 GG 식이군과 GHP 식이군은 중성지질 함량이 높게 나타난 반면 GL 식이군과 GSD 식이군은 대조군과 유사하였다. 총콜레스테롤의 농도는 모든 식이군들이 유사하였으나 GHP 식이군만 높은 콜레스테롤 함량을 나타냈다. LDL-C 농도는 총콜레스테롤의 농도와 같은 경향을 보였다. HDL-C의 농도 또한 집단 간의 유의적인 차이는 보이지 않았으나 GG 식이군이 높은 함량을 나타냈다.

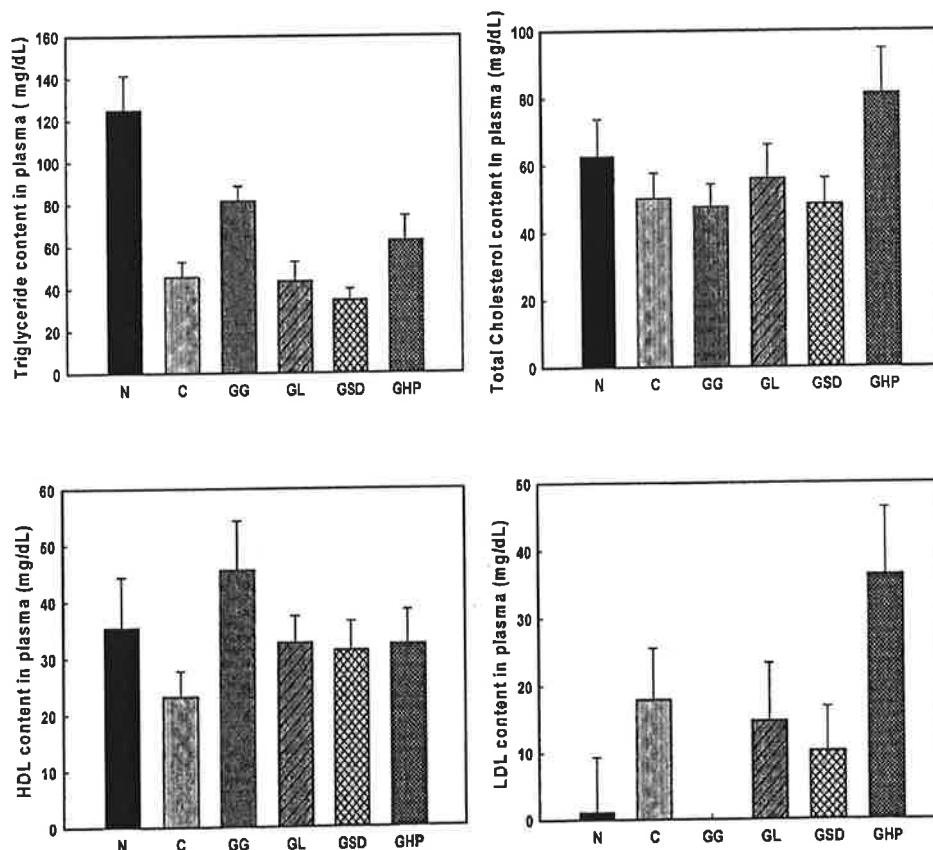


Fig. 31. Triglyceride and cholesterol contents in bloods of rats fed various glasswort-derived salts for 4 weeks.

이상의 결과를 종합해 보면, 식물소금들은 DPPH과 ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging, angiotensin converting enzyme 저해, 그리고  $\alpha$ -glucosidase 저해 등의 다양한 생리활성을 갖고 있음을 밝혀 식물소금들이 정상쥐인 Male Sprague-Dawley rat에서 항당뇨 및 항산화 효과를 평가하였다. 그러나 식물소금들은 포도당 내성 검사와 지방 및 근육 조직에서의 glucose uptake 등의 항당뇨 활성 및 혈압상승 억제에서 대조군과 식물소금식이군들 간의 별다른 차이를 나타내지 않았다. 또한 대조군의 경구투여 포도당 내성 검사 및 혈압의 결과는 선행연구에서 얻어진 결과와 매우 다르다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 이유는 정확한 원인을 알 수 없었으나 동물을 사육하는 동안 특히 혈압 측정 시 실험쥐에 외부로부터 강한 스트레스를 주었기 때문에 좋은 결과를 얻지 못한 것으로 판단되었다.

그래서 이들 식물소금 중 함초만을 이용하여 제조된 함초고압열수분말소금(GSD)과 함초와 건강기능성이 우수한 생물소재를 혼합한 함초식물소금(GG)을 대상으로 leptin receptor가 결핍되어 과식과 과음으로 인해 자발적으로 비만과 인슐린 저항성이 유발되는 db/db mice에서 항당뇨 효과를, 소금 섭취로 인해 자발적으로 혈압이 상승하는 염민감쥐인 Dahl salt-sensitive rat에서 혈압 상승 억제 효과를 평가하고자 하였다.

### 3-6. db/db mice에서 식물소금의 항당뇨 및 항산화 효과

앞 장에서 언급한 바와 같이 식물소금들을 Male Sprague-Dawley rat에 섭취시켜 항당뇨 및 항산화 효과를 평가하였으나 좋은 결과를 얻지 못한 것으로 판단되었다. 그래서 leptin receptor 결함으로 인한 과식과 과음으로 인해 자발적으로 비만과 인슐린 저항성이 유발되는 db/db mice에서 식물소금들의 항당뇨 및 항산화 활성을 평가하고자 하였다. 즉 2% 함초식물소금들(GSD, GG의 NaCl 함량: 50%)을 각각 첨가하여 제조된 사료들을 각각 5주 동안 섭취시키면서, 식이 기간 동안 체중, 물섭취량, 그리고 혈당의 변화를, 희생 후 혈액, 신장, 간, 근육조직 등을 분리하여 생화학적 특성을 조사하였다.

#### 가. 실험 재료 및 방법

##### 1) 실험동물 및 식이 조성

본 연구에 이용된 실험동물은 5주령의 C57BLKS/J db/db mice 수컷과 C57BLKS/J db/lean mice 수컷을 중앙실험동물(주)(서울, 한국)로부터 구입하여, 케이지당 2마리씩 넣어 사육하였다. 사육환경은 온도 21~24℃, 습도 50~60%가 되도록 유지하였고, 명암은 12시간(day light 06:00~18:00)을 주기로 하여 2주일간 환경에 순화시킨 후 실험을 수행하였다. 실험군은 정상군(db/lean mice)과 당뇨군(db/db mice)으로 구분하였고, 당뇨군은 다시 난괴법에 의해 대조군(C), 천일염군(SS), 함초고압열수분말소금군(GSD), 그리고 함초식물 소금군(GG)으로, 총 5개의 실험군(n=6)로 분류하였다. 정상군과 당뇨 대조군은 일반식이인 AIN-93G를 급여하였고, 나머지 3개 시료 처리군의 경우 GSD와 GG에 함유된 NaCl 함량이 약 50%인 점을 고려하여, AIN-93G에 NaCl 1% 함량을 기준으로, SS군에는 1% 천일염, GSD군에는 2% 함초고압열수분말소금, GG군에는 2% 함초-식물 소금을 첨가하여 제조(Table 11)한 후, 5주 동안 물과 함께 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.



Table 11. Composition of AIN-93G diet

Composition	AIN-93G (g/kg)	SS (g/kg)	GSD (g/kg)	GG (g/kg)
Casein	200.000	198.000	196.000	196.000
Corn starch	397.486	393.511	389.536	389.536
Dextrose	132.000	130.680	129.360	129.360
Sucrose	100.000	99.000	98.000	98.000
Cellulose	50.000	49.500	49.000	49.000
Soybean oil	70.000	69.300	68.600	68.600
<i>t</i> -Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014
Mineral mix	35.000	34.650	34.300	34.300
Vitamin mix	10.000	9.900	9.800	9.800
L-Cystine	3.000	2.970	2.940	2.940
Choline bitartrate	2.500	2.475	2.450	2.450
Solar salt (1%)	-	10.000	-	-
GSD (2%)	-	-	20.000	-
GG (2%)	-	-	-	20.000
Total	1,000	1,000	1,000	1,000

AIN-93G; the American Institute of Nutrition recognized diet for gestating and growing rodents in 1993. SS, 천일염; GSD, 함초고압열수분말소금; GG, 함초식물 소금. GSD와 GG 50% NaCl 함유.

## 2) 혈당(Blood glucose) 측정

혈당은 시료식이 전과 개시 후부터 주 1회로 12시간 절식시킨 다음 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당측정기(지닥터, 녹십자, 한국)를 이용하여 측정하였다.

## 3) 당화혈색소(HbA1c) 측정

당화혈색소는 시료식이 5주 후 혈액을 채취한 다음 NycoCard kit (AXIS-SHIELD PoC AS, Norway)를 이용한 NycoCard reader II에 의해 측정하였다.

## 4) 포도당 부하 내성 검사(IPGTT; Intraperitoneal glucose tolerance test)

포도당 부하 내성 검사를 위해 시료식이 5주 후 12시간이상 절식시킨 후, 5% 포도

당(2 g/kg)을 복강 투여한 다음, 0, 30, 60, 120, 180분 간격으로 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 혈당은 앞서 설명한 '(2) 혈당 측정'과 동일한 방법으로 측정하였다.

#### 5) 희생 및 채혈 방법

실험동물은 희생 전 12시간 절식시켜, 에테르로 마취한 후, 경추분리에 의해 희생하였다. 동물의 복부에서부터 흉부까지 개복하고 심장박동이 유지되고 있는 상태로 심장에서 직접 채혈하였다. 채혈된 혈액 샘플은 lithium heparin 튜브에 넣고 3000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈장을 취하고, 신장, 간, 지방 조직을 분리한 다음, 액체질소를 이용해 급냉 시킨 후, -70℃에서 보관하며 시료로 사용하였다.

#### 6) 혈청에서의 insulin 함량 측정

시료를 5주 동안 식이한 다음 혈액에 함유된 insulin 함량을 알아보기 위하여 채취된 혈액을 원심분리하여 혈장을 얻었다. 얻어진 혈장에서의 insulin 함량은 혈장 10 µL를 Mouse Insulin Elisa Kit (TMB, Shibayagi, Japan)에 가하여 반응시킨 다음 450 nm와 620 nm로 설정된 ELISA reader를 이용하여 측정하였다.

#### 7) 혈청에서의 Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) 측정

혈액으로부터 분리한 혈장 100 µL에 20% trichloroacetic acid (TCA) 500 µL와 1 M thiobarbituric acid (TBA) 300 µL를 혼합한 다음 90~95℃에서 20분간 반응시켰다. 이후 방편한 반응용액을 *n*-butanol 800 µL로 분배하고 원심 분리하여 malondialdehyde (MDA)-TBA 반응물이 함유된 *n*-butanol 층을 얻었다. 얻어진 *n*-butanol 층을 대상으로 532 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이 때 사용된 표준용액 MDA는 시료용액과 동일한 방법으로 반응시켜 표준곡선을 작성하여 혈장에 함유된 MDA 함량을 구하였다.

#### 8) Western blotting

지방조직을 lysis buffer [1% Triton X-100, 50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 10 mM NF, 10 mM EDTA, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/mL pepstatin, 1 µg/mL leupeptin, 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 0.1 mg/mL aprotinin]와 함께 균질화한 후, 4℃에서 2시간 동안 용해시켜 원심분리(15,000 rpm,

4°C, 15 min)하고, 원심분리된 상등액은 Bradford assay에 의한 단백질을 정량하였다.

이중 400 µg의 단백질 용액을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동한 후 polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membrane에 1시간 40분 동안 전이시켰다. 전이된 membrane을 3% bovine serum albumin (BSA)이 함유된 0.05% Tween-20 (TBST) buffer에서 1시간동안 blocking한 후, primary antibody로 Anti-NFκB p65 (polyclonal antibody, Upstate, USA)에 처리하여 overnight 시켰다. Secondary antibody로는 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (Millipore, CA, USA)를 사용하여 1시간동안 반응시킨 후 세척하여 luminol이 함유된 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액과 반응시켜 필름에 현상하였다.

#### 9) 조직병리학적 검사

각 식이군으로부터 채취한 지방, 신장, 그리고 간을 각각 2% paraformaldehyde와 2% glutaldehyde 고정액이 함유된 0.1 M PBS 버퍼를 이용하여 고정하였고, OsO<sub>4</sub>의 사용 유무에 따라 2차 고정을 한 시료들과 이를 행하지 않은 시료들로 각각 나누었다. 이들 시료를 PBS buffer와 중류수로 세척한 다음, 에탄올로 탈수과정을 거쳐 LR white 레진에 포맷하였다. 포맷한 조직을 초박 절편기를 이용하여 500-1000 nm 두께로 자른 다음 광학 현미경으로 관찰하였고, 또한 50-70 nm 두께로 초박 절편된 조직들을 투과 전자 현미경(TEM)으로 관찰하였다. 이 때 광학 현미경으로의 관찰할 경우 시료들을 toluidine blue액으로 60-80°C의 Hot plate 에서 약 1-2분 염색 한 다음, 200배에서 조직의 구조를 관찰하였다. 또한 투과 현미경으로 관찰하기 전 2% uranyl acetate를 10분 lead citrate를 5분 처리하였고, 파라필름 위에 50 µL씩 점적한 후, 그리드(150 메시)를 뒤집어서 염색한 다음, 수세하여 관찰하였다.

#### 10) 자료처리 방법

본 실험결과의 통계처리는 SPSS (v 18.0)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었다. 모든 결과는 반복 측정법(repeated measure)을 사용하였으며 각 시간에 따른 집단 간 차이는 One-way ANOVA와 사후검정(Duncan's test)을 실시하였으며 분석 시 유의수준은 p<0.05로 설정하여 측정하였다.

나. 결 과

1) 체중 증가량 변화

db/db mice의 실험 기간 동안의 체중의 변화는 Fig. 32에 나타내었다. db/db mice에 섭취시킨 모든 식이군들은 식이기간 5주 동안 지속적으로 체중이 증가하였으나 정상쥐(Lean, N)보다는 체중 증가 폭이 적었다. 대조군(C)과 GSD 식이군은 GG 식이군과 SS 식이군에 비해 그 체중 증가는 낮았으나 집단 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

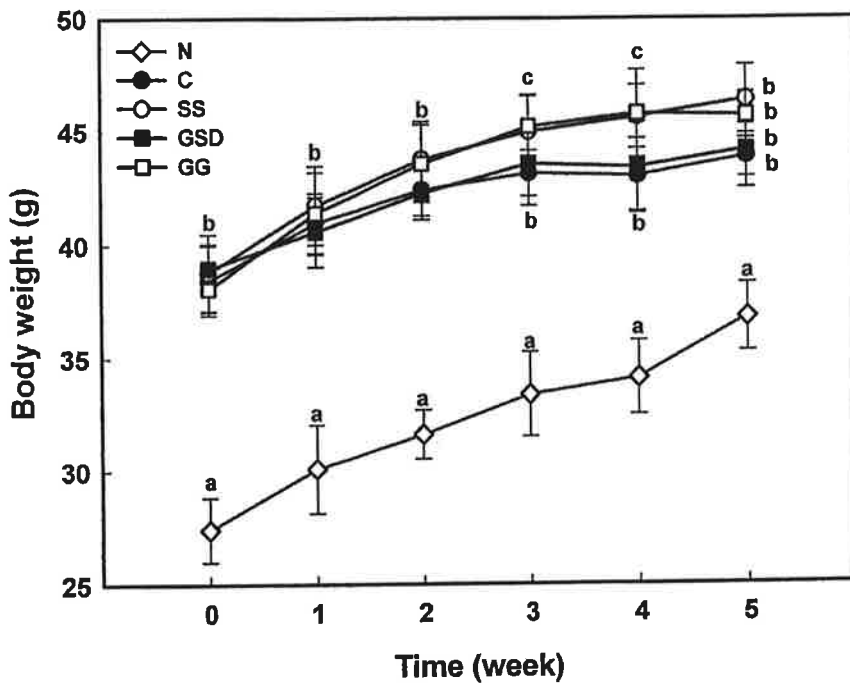


Fig. 32. Change of body weight of mice fed glasswort and plant-derived salt. N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 합초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 합초식물소금 식이군.

## 2) 물 섭취량 변화

GSD 식이군과 GG 식이군의 물 섭취량 변화는 Fig. 33과 같다. 정상쥐(N, Lean)의 물 섭취량은 식이기간 동안 거의 변화가 없었다. 그러나 db/db mice에 섭취시킨 모든 식이군들은 식이기간 동안 물 섭취량이 많음을 알 수 있었다. db/db mice는 leptin receptor가 결핍되어 있어 다식 및 다음을 계속적으로 하게 되는데 이로 인해 비만이 유발되고 insulin 저항성이 일어나 최종적으로 당뇨가 유발되는 것으로 알려져 있다. db/db mice에서 물 섭취량이 매우 높았던 것은 다식 및 다음 현상인 당뇨가 유발되어진 것으로 보인다. 또한 소금의 경우 NaCl 함량이 높을수록 높은 물 섭취량을 보인다고 보고된 바 있다. 그러나 동일한 NaCl 함량을 섭취시킴에도 불구하고 GSD 식이군과 GG 식이군이 다른 식이군에 비해 높은 물 섭취량을 나타냈다. 함초열수추출물은 소금 외에도 물 섭취를 높이는 요인이 있는 것으로 사료된다.

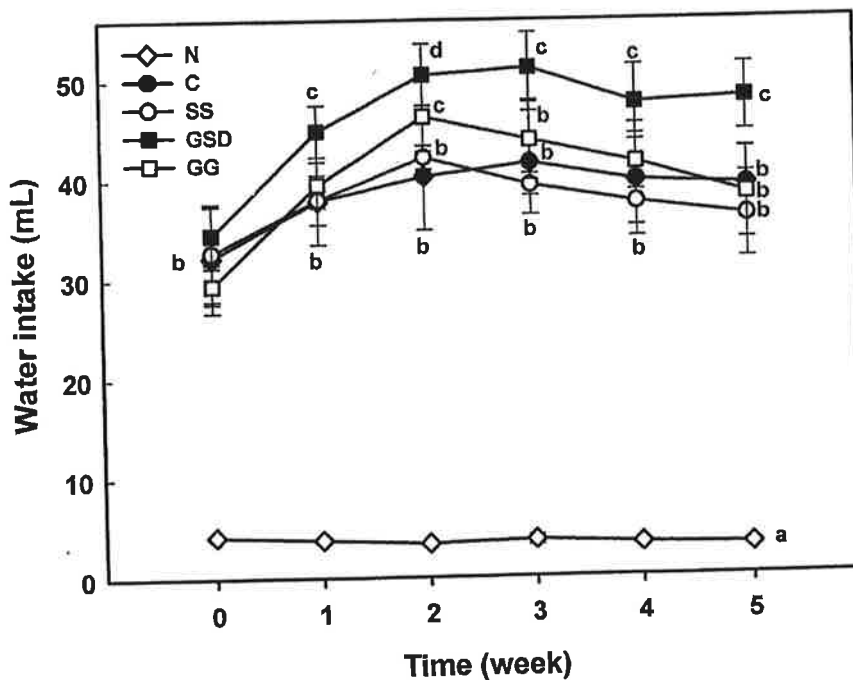


Fig. 33. Change of water intake of mice fed glasswort and plant-derived salt. N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.

### 3) 혈당 변화

db/db mice에 GG와 GSD를 섭취시키는 5주 동안 주 1회 혈당을 측정하였다. 그 결과, 정상쥐인 Lean (N)의 경우 혈당은 약 150 mg/dL 정도로 5주 동안 거의 변화가 없이 그대로 유지되고 있었다. db/db mice의 경우 식이기간 4주까지 지속적으로 증가하다가 5주째부터 감소하는 경향을 보였다(Fig. 34). 혈당의 지속적인 상승은 물 섭취량과 일치되는 결과로 비만과 함께 당뇨가 유발되었음이 확인되었다. 정 등(대한수의학회지, 2008)은 식이기간 4주까지 지속적으로 증가하다가 5주째부터 감소한다는 결과와 일치하였다. 그러나 GSD 식이군과 GG 식이군을 포함한 각 집단 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그러므로 5주 동안 실시한 본 연구에서는 GSD 식이군과 GG 식이군의 식이가 혈당강하에 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 함초고압열수분무소금(GSD)과 함초식물소금(GG)의 혈당강하 효과를 확인하기 위해서는 장기간 식이에 의한 조사가 요구된다.

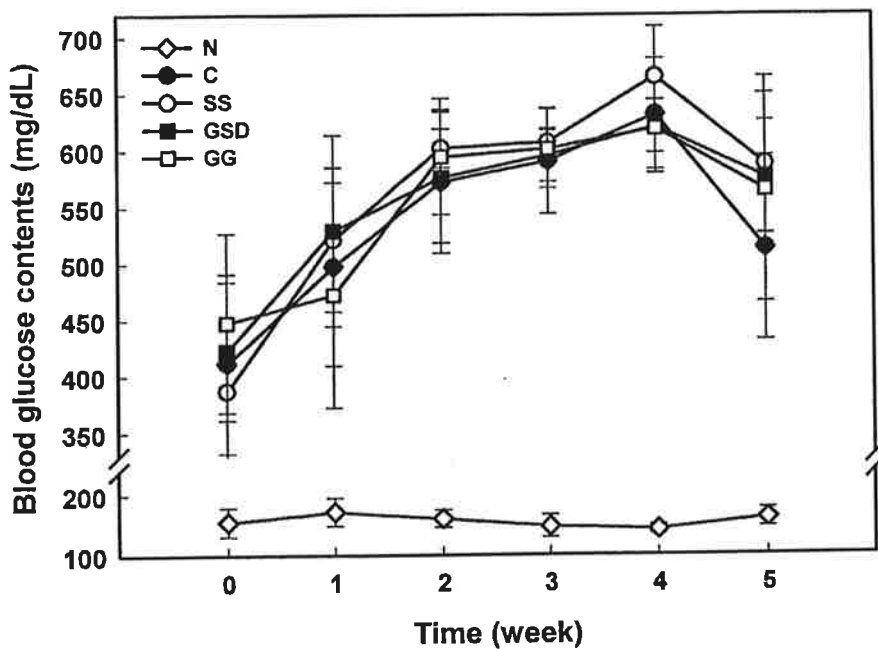


Fig. 34. Change of blood glucose contents of mice fed glasswort and plant-derived salt.

N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.

#### 4) 포도당 내성 검사

포도당 내성 검사는 식이 5주 후 12시간 이상 절식시킨 후 5% 포도당(2g/Kg)을 복강투여한 다음, 일정 간격으로 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 정상 쥐인 db/lean (N)은 복강 투여 60분 이후 감소를 보였으며 지속적인 감소를 나타냈다. 그러나 db/db mice에서 정상식이군인 대조군(C)의 경우 복강투여 120분 이후부터 혈당이 감소하는 경향을 나타냈다. 그러나 GSD 식이군과 GG 식이군을 포함한 각 집단들 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

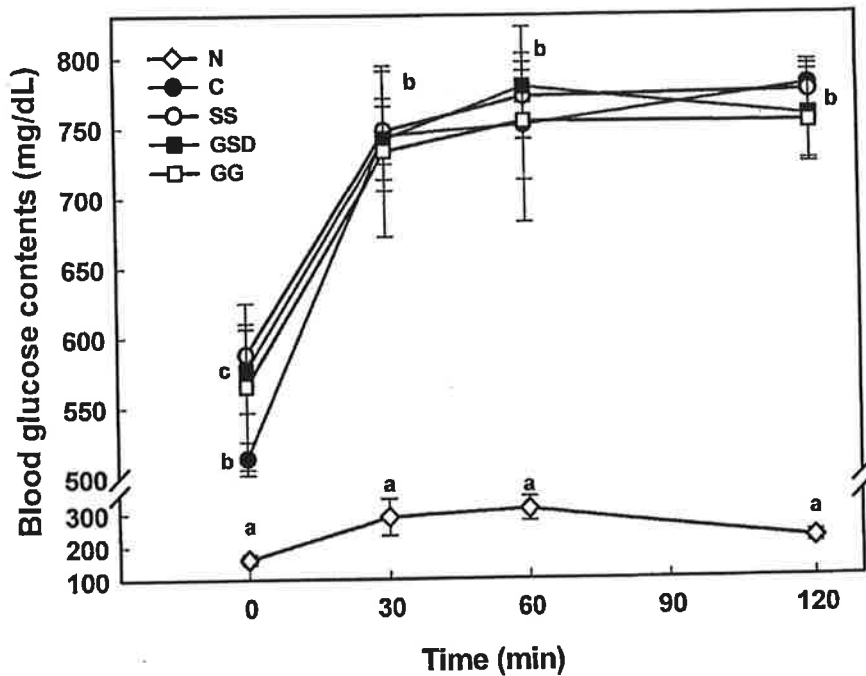


Fig. 35. Intraperitoneal glucose tolerance test of mice fed glasswort and plant-derived salts.

N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.

##### 5) 혈중 Insulin 함량

합초고압열수분무소금균(GSD)과 합초식물소금균(GG)을 실험 5주 후, 희생하여 얻어진 혈청에서의 insulin 함량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 36), db/db mice에서 정상식이군인 대조군(C)의 insulin 함량은 정상쥐인 lean (N) 보다 높은 수치를 나타냈다. db/db mice는 다식을 통하여 체내 당 흡수와 혈당이 높기 때문에 체장에서 인슐린 분비를 많이 한 것으로 여겨진다. 대조군(C)에 비해 과량의 소금을 섭취한 천일염식이군(SS)은 대조군(C)보다 낮은 혈중 insulin 수치를 나타내 과다 소금 섭취는 혈중 insulin 수치가 낮아진다는 선행연구의 결과와 일치하였다. 그러나 GSD 식이군과 GG 식이군은 천일염식이군(SS)보다 높은 혈중 insulin 수치를 보였으나 집단 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그러므로 소금 섭취로부터 혈중 insulin 수치가 감소하는데 합초가 insulin 분비를 촉진하여 GSD 식이군이 GG 식이군보다 높은 혈중 insulin 수치를 보인 것으로 생각된다. 또한 GG식이군의 insulin 함량은 GSD식이군보다 더 높은 수치를 나타내 식물이 합초보다 insulin 분비를 더욱 촉진한 것으로 시사되었다. 일부 천연 항당뇨 생물소재는 인슐린 분비를 촉진하여 혈당 수치를 낮추는 효과를 갖는다는 보고들이 있어, 합초 또한 인슐린 분비를 촉진하는 인자를 함유하고 있는 것으로 추정된다. 흥미롭게도 앞서 설명한 바와 같이 GSD 식이군과 GG 식이군은 대조군(C)에 비해 혈중 insulin 함량이 적었음에도 불구하고 식이하는 동안 혈당 수치는 대조군과 유사한 결과를 얻었다. 이는 합초고압열수분무소금과 합초식물소금은 인슐린 분비를 촉진할 뿐만 아니라 혈중 인슐린 분해를 지연하거나 인슐린 신호전달 향상에 도움을 주는 인자의 존재 등의 다른 요인들에 의한 것으로 추측된다. 이에 대한 보다 상세한 연구는 추후 요구된다.



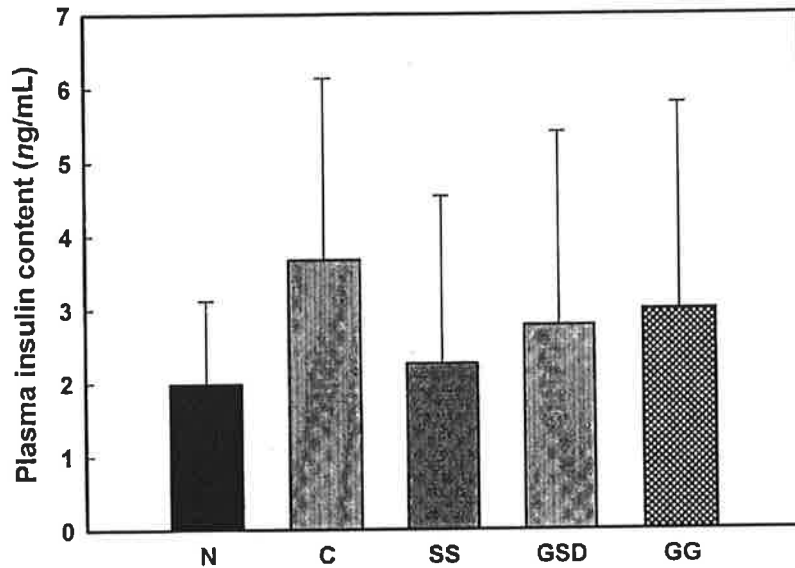


Fig. 36. plasma insulin content of mice fed glasswort and plant-derived salt.  
 N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.

#### 6) 당화혈색소(HbA1c) 함량

우리 몸의 적혈구내에 있는 hemoglobin은 산소를 운반하는 매우 중요한 역할을 한다. 이 헤모글로빈은 혈액 내의 포도당과 비가역적으로 결합하면서 당화혈색소를 형성하는데, 혈색소는 적혈구가 살아있는 2-3개월 동안 존재하게 된다. 당화혈색소 함량(%)은 적혈구가 포도당에 노출된 기간과 혈액 내 포도당 농도에 의해 결정되며 당뇨병자는 정상인보다 고탄당으로 그 수치가 매우 높다고 한다. 특히 혈당은 음식 조절 등의 채혈 환경에 따라 그 함량 변화의 폭이 매우 크나 당화혈색소는 단시간의 외부 요인에 의해 변화되지 않고 장시간에 걸쳐 형성된다. 그러므로 당뇨병자의 경우 혈당 측정만으로는 전반적인 혈당 상황을 판단하기 어렵다. 그러나 당화혈색소(HbA1c) 검사는 장기간의 혈당 수준을 알 수 있어 당뇨와 그로 인한 합병증의 진단에 이용되고 있다.

그래서 함초고압열수분무소금과 함초식물소금이 db/db mice에서 당화혈색소 형성 억

제에 영향을 주었는지 알아보고자, 식이 5주 후 혈액을 채취하여 당화혈색소 함량을 측정하였다. 그 결과(Fig. 37), 정상쥐인 lean (N)의 HbA1c 함량은  $4.6 \pm 0.19\%$ 로 정상 수치를 나타낸 반면 db/db mice의 대조군 (C)은  $12.1 \pm 0.69\%$ 로 당뇨고위험군에 해당하는 수치를 나타냈다. db/db mice에 식이한 식이군들의 HbA1c 함량을 살펴보면 GG식이군이 가장 낮았으며 GSD식이군이 그 다음으로 낮았다. 함초가 혈액 내 포도당 농도를 낮추어 당화혈색소 형성을 억제한 것으로 해석되었다. 혈액내의 높은 당화혈색소 함량은 신장병증과 망막병증 등과 같은 당뇨 합병증의 유발과 관련이 있다고 알려져 있다. 그러나 혈중 1%의 당화혈색소를 줄이게 되면 질환에 따라 다르나 심근경색, 백내장, 미세혈관질환, 그리고 말초혈관질환 등의 질병을 감소시키고 최종적으로 당뇨로 인한 사망률이 21%정도 감소하였다고 보고된 바 있다. 한편, 함초 추출물은 Streptozotocin으로 유도된 제 1형 당뇨쥐에서 수정체 알도즈 환원효소(Rat Lens Aldose Reductase) 및 솔비톨 축적(Sorbitol Accumulation)을 저해하는 활성을 나타내 백내장과 같은 합병증을 방지하여 항당뇨 효과를 갖는다고 보고한 바 있다. 따라서 당뇨 환자의 경우 함초는 당화혈색소 형성을 감소시켜 당뇨 합병증 특히 백내장 발병율을 감소시킬 것으로 기대된다.

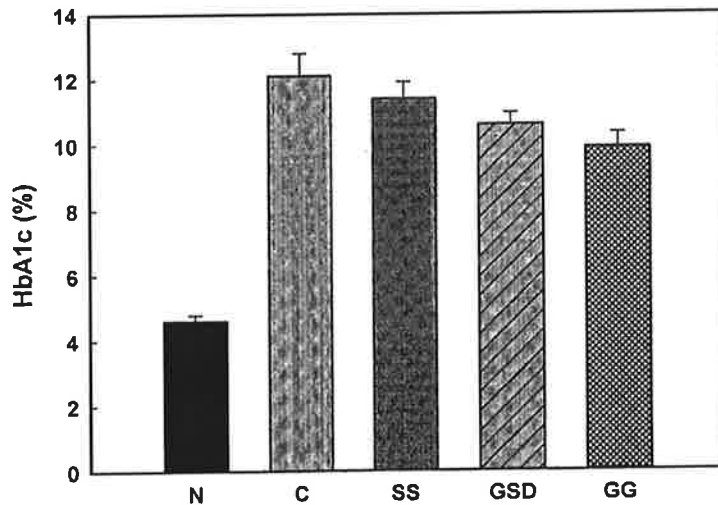


Fig. 37. Glycated hemoglobin (HbA1c) content of mice fed glasswort and plant-derived salt.

N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.

## 7) 혈중 지질과산화물 함량 비교

우리 몸에서는 외부 스트레스 인자에 의해 과잉의 활성산소가 생성되는데, 이 활성산소들은 지질, 단백질, DNA 등의 세포구성성분들을 손상시켜 암, 동맥경화증, 당뇨병, 뇌졸중, 심근경색증, 간염, 신장염, 아토피, 그리고 파킨슨병 등 다양한 질병을 유발시킨다고 입증되고 있다. 체내에서는 활성산소를 제거하기 위해 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSHPx) 등의 항산화효소가 존재하여 산화적 손상으로부터 방어 기능을 하고 있지만 과량의 활성산소의 존재할 경우 체내에서 항산화 방어 기능이 현저히 떨어지게 된다. 이러한 산화적 손상을 줄이기 위해서는 항산화 기능성이 우수한 식품을 외부로부터 공급되어야 하며 이러한 식품소재를 발굴하려는 노력이 활발히 진행되고 있다. 이 중 함초는 항산화 활성뿐만 아니라 항암, 그리고 면역 조절 기능 향상 등의 다양한 생리활성을 갖고 있어 유용 식품 소재로 소비자에게 관심을 받고 있다.

이에 함초고압열수분무소금(GSD)과 함초식물소금(GG) 식이가 db/db mice에서 산화적 스트레스(oxidative stress)를 감소시키는지 알아보고자, 혈중에서 지질과산화물(malondialdehyde, MDA) 함량을 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 법에 의해 조사하였다. 그 결과(Fig. 38), db/db mice에서 대조군(C)의 MDA 함량은 23.6 nmol/dL로 정상쥐인 lean군(C)의 그것과 매우 비슷하였다. 흥미롭게도 db/db mice에서 GSD식이군과 GG식이군의 MDA 함량이 대조군(C)에 비하여 약 2배정도 유의적으로 낮게 나타났다 ( $p < 0.05$ ). GG식이군이 GSD식이군보다 더 낮은 MDA 함량을 나타냈다. 함초와 함초에 첨가된 식물은 체내에서 산화적 스트레스에 의해 생성되는 활성산소 혹은 지질 산화물 등을 제거할 수 있는 항산화 효과를 가지고 있는 것으로 해석되었다.

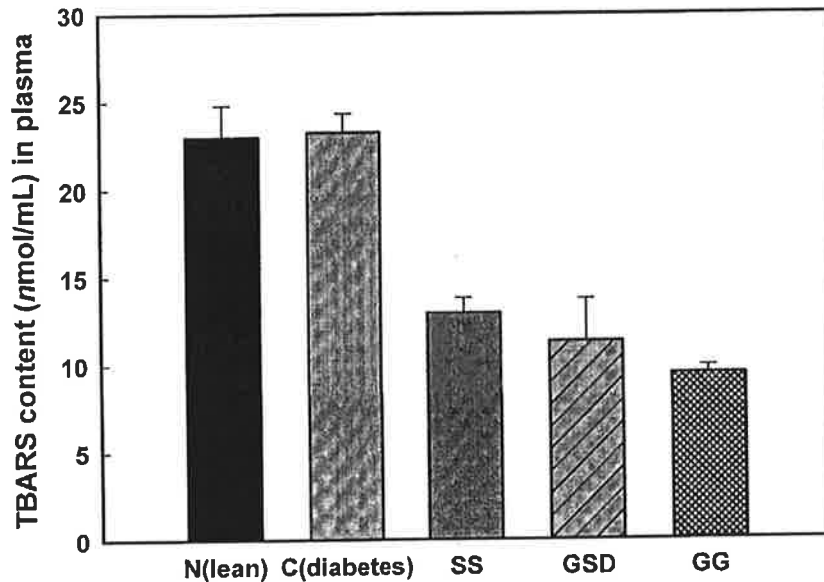


Fig. 38. Plasma lipid peroxide contents of mice fed diets containing glasswort and plant-derived salt.

N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.

#### 8) 간의 지질과산화물 함량 비교

함초고압열수분무소금(GSD)과 함초식물소금(GG) 식이가 db/db mice에서 산화적 스트레스(oxidative stress)를 감소시키는지 알아보하고자, 간에서 지질과산화 산화물(malondialdehyde, MDA) 함량을 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 법에 의해 조사하였다. 그 결과(Fig. 36), db/db mice에서 대조군(C)의 MDA 함량은 정상적인 lean군(C)보다 높게 나타났다. db/db mice에서 GSD 식이군과 GG 식이군의 MDA 함량이 대조군(C)에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다 ( $p < 0.05$ ). GSD 식이군이 GG 식이군보다 더 낮은 MDA 함량을 나타내 혈중 지질과산화물 함량과 반대 경향을 나타냈다. 이 또한 함초와 함초에 첨가된 식물이 체내에서 산화적 스트레스에 의해 생성되는 활성산소 혹은 지질 산화물 등을 제거할 수 있는 항산화 효과를 가지고 있음을 재확인되었다. 최근 김 등 (Food chemistry, 2011)은 함초에 존재하는 항산화 활성 물질로 isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside과 quercetin 3-O-β

-D-glucopyranoside 등의 flavonol 배당체 화합물들 및 다수의 dicaffeoyl quinic acid 유도체들이 동정된 바 있다. 또한 이들 화합물들은 동물실험의 혈장에 copper ion으로 유도되는 cholesteryl ester hydroperoxide 형성 저해능이 매우 우수하였다고 밝혀졌다. 그러므로 강력한 항산화 활성 유기물질과 우리 몸에 필요한 유용 미네랄 성분이 다량 함유하고 있는 GSD는 체내에서 산화적 스트레스를 줄이는데 매우 유용 식품소재인 것으로 판단된다.

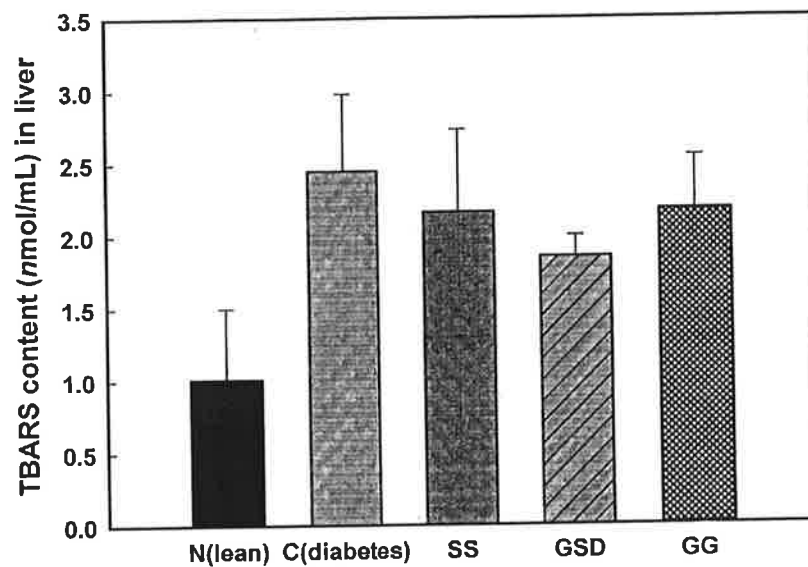


Fig. 39. Lipid peroxide contents in liver tissue of mice fed diets containing glasswort and plant-derived salt.

N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.

#### 9) 지방조직에서 NF- $\kappa$ B의 발현량

산화적 스트레스에 관여하는 TNF $\alpha$  경로에서 NF- $\kappa$ B를 거쳐 염증 및 세포괴사가 일어난다고 알려져 있으며 또한 인슐린 신호 전달에도 영향을 준다고 알려져 있다. 함초고압열수분무소금(GSD)과 함초식물소금(GG) 식이가 db/db mice에서 산화적 스트레스(oxidative stress)를 줄이는데 영향을 주는지 알아보하고자 지방조직에서 NF- $\kappa$ B의 발현량을 western blotting에 의해 조사하였다. GSD 식이군과 GG 식이군은 대조군(C)과

SS 식이군보다 약간 낮은 NF- $\kappa$ B의 발현량을 보였으나 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 40). 그러므로 함초고압열수분무소금(GSD)과 함초식물소금(GG) 식이가 간과 혈중에서 지질과산물 생성에 억제 효과를 나타냈으나 산화적 스트레스에 의해 발현되는 NF- $\kappa$ B의 발현에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 해석되었다.

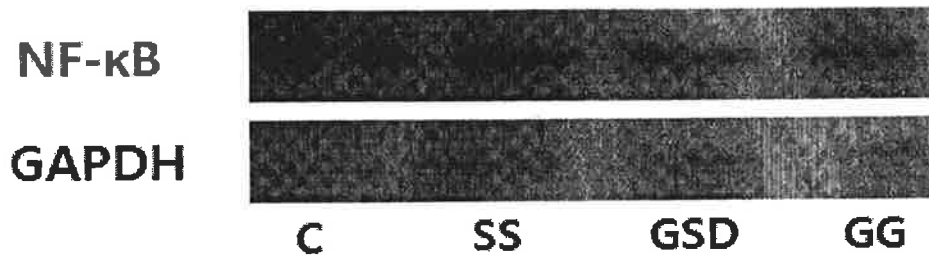


Fig. 40. Expression level of NF- $\kappa$ B in adipose tissue of mice fed diets containing glasswort and plant-derived salt.

C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.

#### 10) 지방조직의 Histologic photomicrogram

db/db mice에서 함초고압열수분무소금(GSD)과 함초식물소금(GG) 식이로 인해 지방조직에서의 형태학적 차이가 있는지 알아보고자, 각 식이군의 지방조직(Adipose)을 2% paraform aldehyde와 2% glutaldehyde 고정액으로 고정하였고 OsO<sub>4</sub>를 이용하여 2차 고정을 한 것과 하지 않은 것으로 나누어서 이들을 PBS 버퍼 용액과 증류수로 세척한 후 에탄올로 탈수과정을 거쳐 LR White 레진에 포매하였다. 포매한 조직을 초박 절편기에 의해 500-1000 nm 두께로 절편한 다음 광학 현미경하에서 관찰하였다. 그 결과(Fig. 41), 각 식이군의 지방 조직에서는 crown-like structure로 추정되는 부위가 관찰되었다. 지방조직 특히 복부지방에서 crown-like structure의 형성은 염증과 인슐린 저항성과 깊은 관련이 있다고 보고되고 있다. 즉 비만인 사람이나 설치류의 경우 총 지방조직 세포 함량의 40%이상이 대식세포로 이루어져 있는데 대식세포들은 염증성 사이토카인들과 함께 지방세포를 침윤시켜 지방세포를 죽여 crown-like structure를 형성한다고 알려져 있다. 그에 더하여 염증성 경로의 만성적인 활성화는

비만과 관련된 insulin resistance를 유발한다고 알려져 있는데 지방조직에서 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$ , IL-6, JNK, 그리고 IKK는 insulin resistance와 당뇨병 환자들에서 크게 증가하였다고 보고된 바 있다. 그 외에도 산화적 스트레스, 소포체의 스트레스, 그리고 지방조직의 괴사에 의한 염증이 insulin resistance와 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다. 그래서 본 실험에 사용한 db/db mice는 leptin receptor가 결핍되어 있어 지속적인 과식과 과음으로 인해 비만이 생기고 이로 인해 insulin resistance가 일어나 지방조직에서 대식세포와 염증성 사이토카인에 의해 crown-like structure가 형성되어질 가능성이 있다고 판단되었다.

이에 각 식이군 간의 지방조직의 형태학적 차이를 보다 상세히 살펴보면 정상적인 lean (N)의 경우 지방조직에서 crown-like structure는 거의 보이지 않았다. 반면 대조군(C)의 지방조직에서는 crown-like structure가 다수 관찰되어 과음 및 과식으로 인해 crown-like structure가 형성된 것으로 추측되었다. 반면에 함초고압열수분무소금군(GSD)과 함초식물소금 식이군(GG)은 대조군(C)과 SS 식이군에 비해 crown-like structure 형성수가 적게 관찰되었다. 이는 염증성 사이토카인의 생성을 억제함으로써 복부지방 조직에서 죽은 지방세포수(crown-like structure)가 적었기 때문인 것으로 추측된다. 염증성 사이토카인은 산화적인 스트레스 반응과 밀접하게 관련되며 또한 인슐린 신호전달과도 연결되어진다. 앞서 살펴본 바와 같이 함초고압열수분무소금군(GSD)의 체내 지방과산화물 생성 억제 효과, 즉 항산화 효과가 있다는 결과와 연관지어 볼 때, 함초고압열수분무소금 식이는 복부지방조직에서 산화적 스트레스에 반응하는 TNF- $\alpha$  pathway에 긍정적인 영향을 주어 crown-like structure 형성을 억제할 것으로 시사되었다.

또한 투과 전자 현미경을 이용하여 crown-like structure와 지방구를 관찰하였다. 그 결과, Lead의 정상식이군(N)의 간조직과 비교해 볼 때 db/db mice인 대조군(C)의 간 조직에서 핵이 변형되어 있음이 관찰되었다(Fig. 42). 이는 leptin receptor의 결핍으로 인한 과음과 과식으로 인해 간에 무리를 주어 손상되어 있는 것으로 판단되었다. 모든 당뇨군의 간 조직 관찰 결과, 세포질의 변형도가 천일염에서 가장 심했고 함초식물소금 식이군에서 변형도가 가장 약했다.

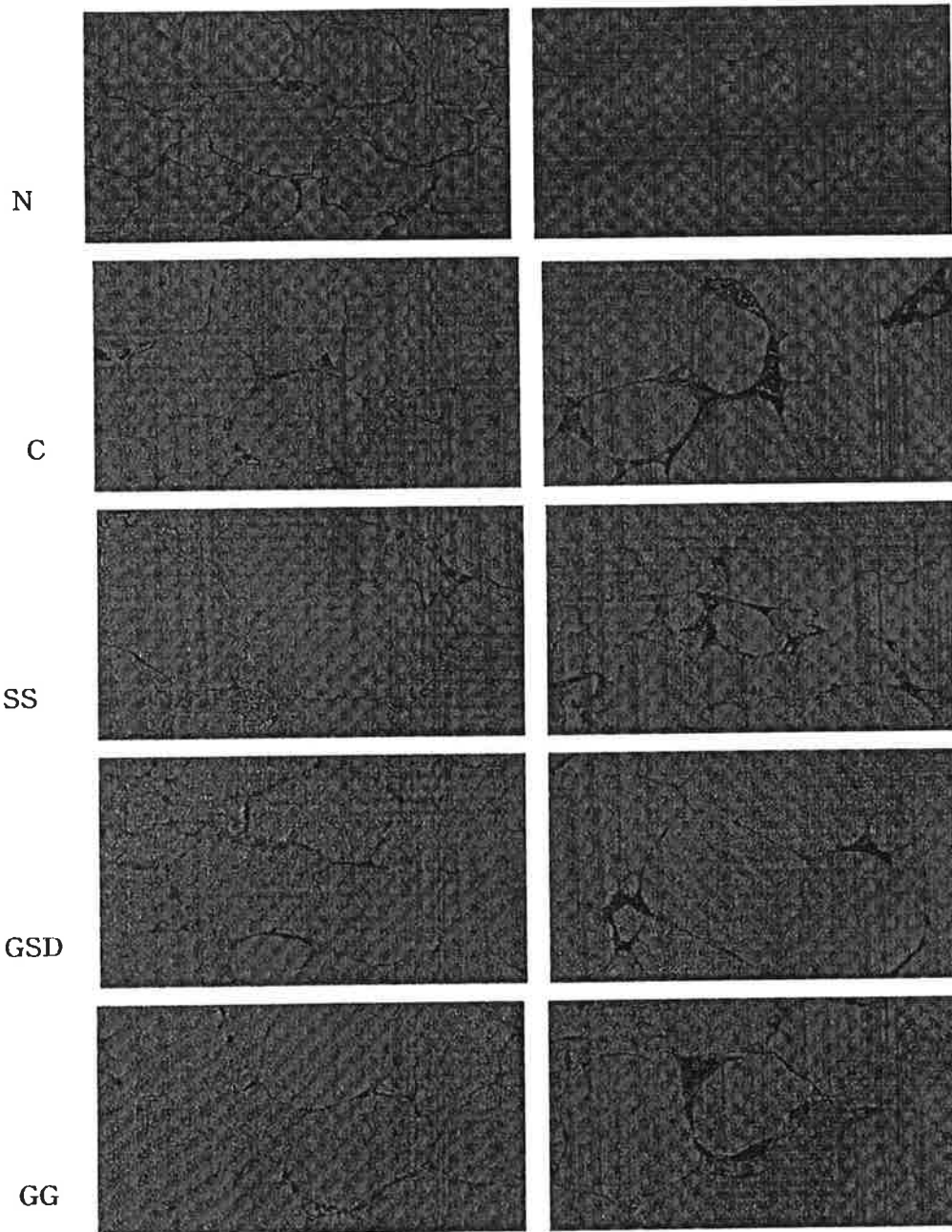


Fig. 41. Light microscopic images ( $\times 200$ ) of adipose tissues in mice fed diets containing hot water extract of glasswort.

N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.



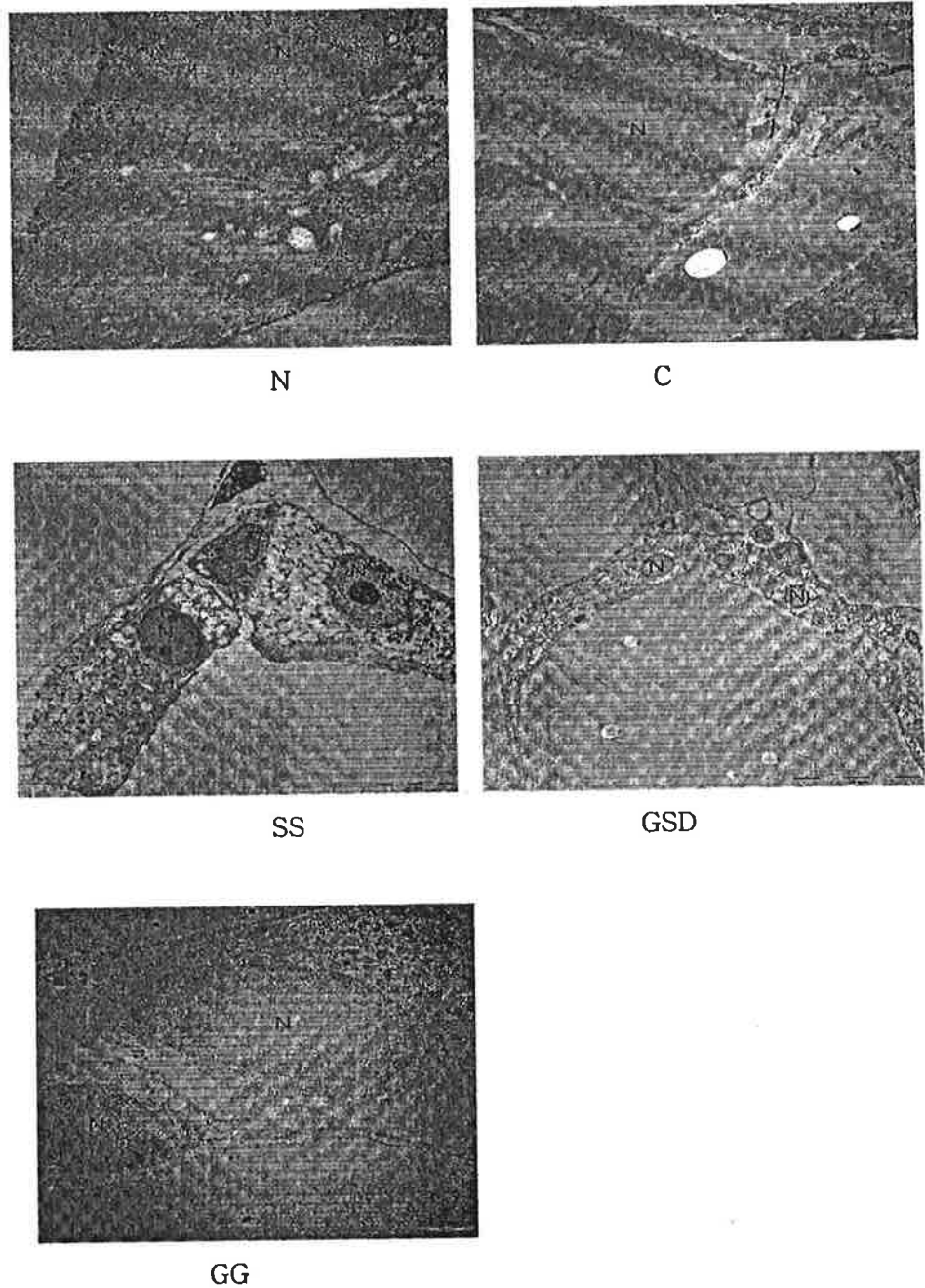


Fig. 42. Transmission electron microscopic (TEM) images of adipose tissues in mice fed diets containing hot water extract of glasswort.

N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분말소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.

### 11) 간 조직에서의 지방구 분포

각 식이군의 간 조직을 고정화하여 광학 현미경으로 관찰한 결과, 정상식이군(N)의 간에서는 지방구들이 거의 관찰되지 않았으며 있더라도 아주 작은 형태로 보였다(Fig. 44). 이에 반해 db/db mice의 대조군(C)의 간 조직에서는 지방구들이 다수 관찰되어 과식으로 인해 지방이 축적된 것으로 추측되었다. 간 조직에서 SS 식이군과 GSD 식이군의 지방구는 대조군(C)에 비해 더 적게 관찰된 반면 GG 식이군은 대조군과 유사하거나 더 많은 지방구들이 관찰되었다.

또한 투과 전자 현미경상에서는 지방구의 분포가 집단 간의 차이를 나타냈다(Fig. 45). 천일염 그리고 함초식물소금 식이군의 경우 정상 쥐에서 보이는 지방구의 구조 외에 특이한 구조를 관찰 할 수 있었는데 지방구와 세포내 구성물의 연결이 비정상적인 것을 관찰 할 수 있었다. 소포체와 미토콘드리아는 지방의 생성에 영향을 주는 세포내 소기관으로 알려져 있는데, 함초고압열수분무소금을 식이한 랫틴 기능이 없는 생쥐와 정상식이를 한 정상생쥐에서는 이러한 소기관이 지방 방울들에 연결이 된 것을 쉽게 관찰 할 수 있었으나 대조구, 천일염, 그리고 함초식물소금을 식이한 집단에서는 이러한 구조를 갖는 것들의 빈도가 낮았다.

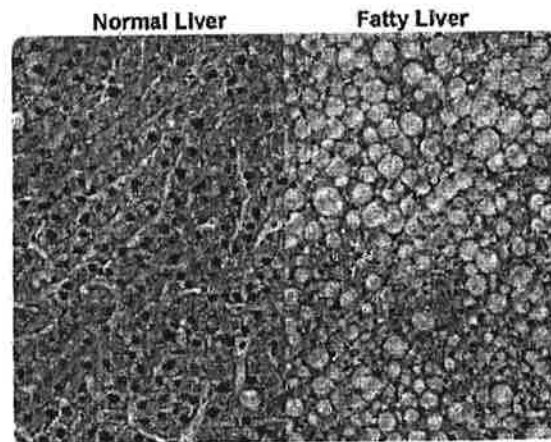


Fig. 43. Light microscopic images of normal and fatty livers.

(Cited from WEB: <http://www.elements4health.com/exercise-plans-prevent-liver-disease.html>)

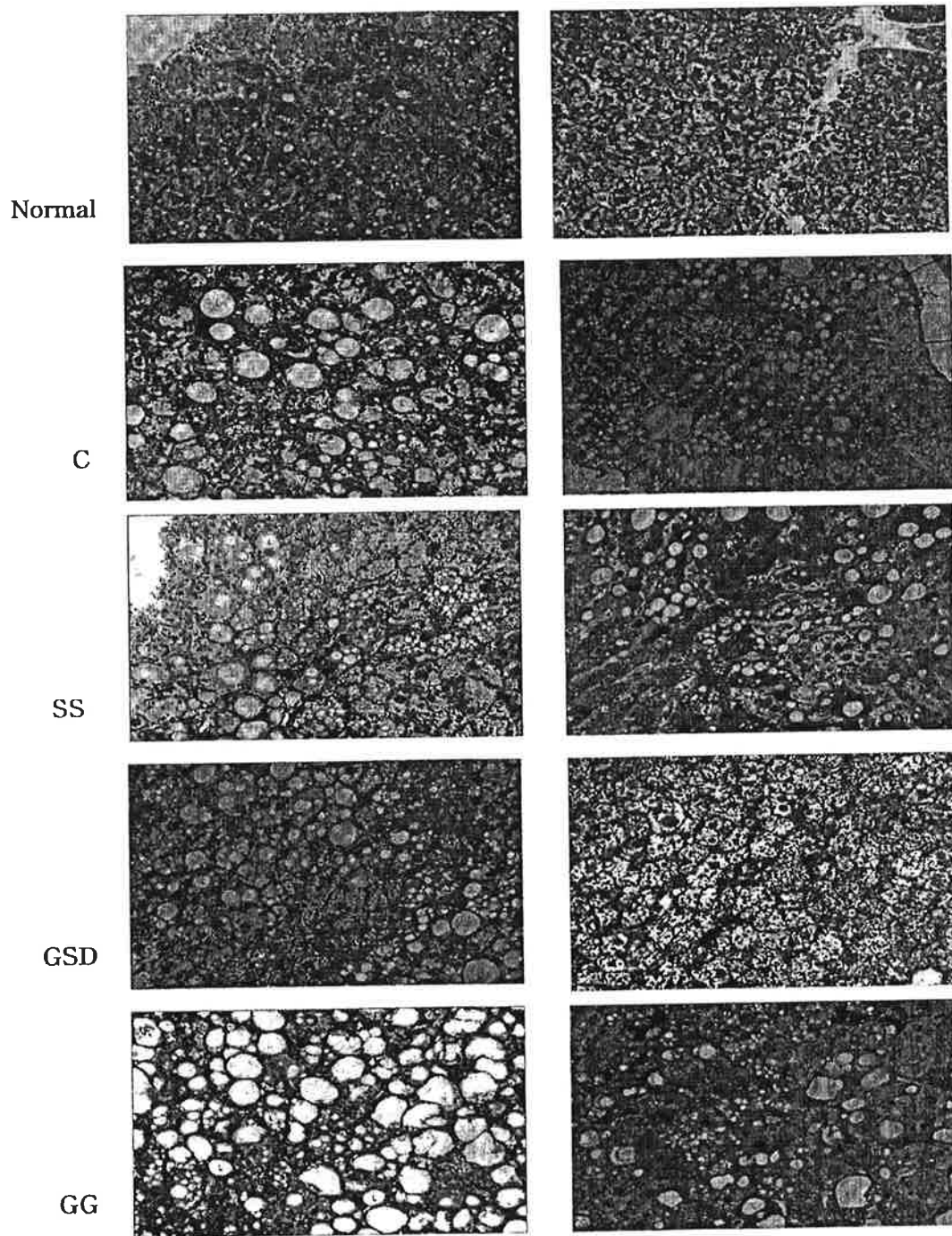


Fig. 44. Light microscopic images ( $\times 200$ ) of lipid droplets or vacuoles in livers of mice fed diets containing hot water extract of glasswort.

N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.

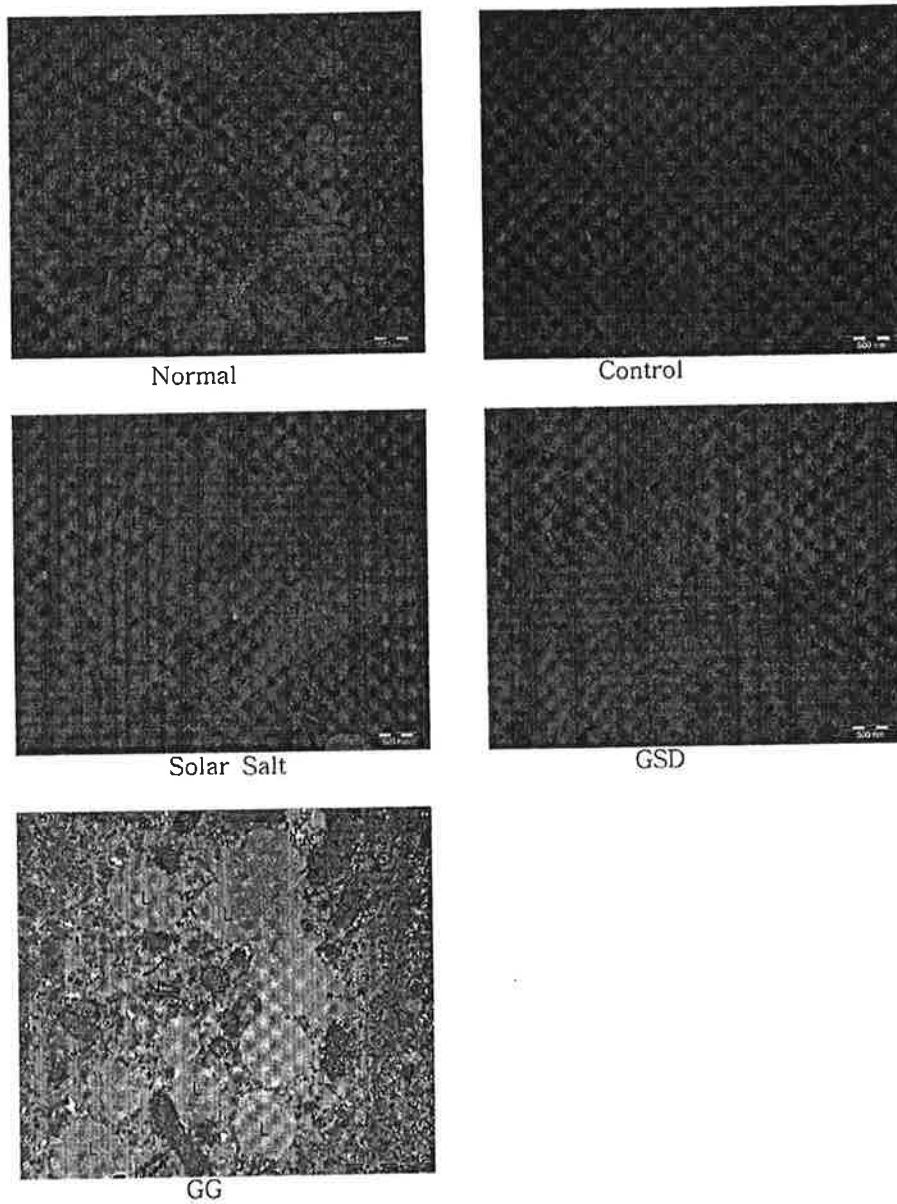


Fig. 45. Transmission Electron Microscopic images of lipid droplets in livers of mice fed various salts.

N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.

## 12) 신장조직의 Histologic photomicrogram

합초소금들 식이가 신장에 어떠한 영향을 주었는지 식이 5주 후 mice를 희생하여 얻어진 각 식이군의 신장을 광학 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 (Fig. 47), db/db mice의 대조군(C)은 정상군 (N)과 해부학적 차이는 거의 없는 것으로 나타났으며 또한 GSD 식이군 및 GG 식이군 간에도 차이를 발견할 수 없었다. 그러나 과다 소금 섭취로 인해 신장 기능 이상이 있을 경우, 체내 불순물들을 배출하는 기저막(endothelium)의 기능 및 두께에 영향을 줄 가능성이 있다고 판단되었다. 그래서 각 식이군의 신장에서 basement membrane과 endothelium의 구조적 변화가 있는지 알아보려고 먼저 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 광학현미경 상에서 신장의 basement membrane과 endothelium 구조 차이는 각 식이군에 따라 관찰되지 않았다. 이는 합초소금들과 천일염이 신장 기능에 큰 이상을 주지 않은 것으로 시사되었다. 신장 기능에 이상이 생기는 초기 단계이거나 기능이 저하되었을 경우 배울 및 해상도가 우수한 투과 전자 현미경을 이용하여 관찰하였다. 그 결과(Fig. 50), 투과 전자현미경에서 관찰된 basement membrane과 endothelium의 구조는 각 식이군에 따라 큰 차이를 나타내지 않았으나 그 두께에 있어 약간 차이가 있음을 알 수 있었다. 이에 각 식이군의 기저막의 두께를 측정하여 그 결과를 Table 11에 나타냈다. 신장 기저막 두께는 각 식이군에 따라 차이가 있었으나 집단 간의 유의차는 없었다. 즉 각 식이군 중 db/db mice에서 일반식이한 대조군(C)의 기저막이 가장 두꺼웠으며 lean mice에서 일반식이한 정상군(N)이 가장 얇았다. db/db mice는 leptin receptor가 결핍되어 과식과 과음으로 인해 정상 mice인 lean (N)보다 신장의 기저막이 두꺼워진 것으로 시사되었다. db/db mice에서 미네랄이 풍부한 천일염을 섭취한 SS식이군은 대조군보다 기저막이 얇았다. db/db mice가 미네랄이 풍부한 천일염을 섭취함으로써 기저막의 두께가 lean mice의 그것에 가까워지고 있는 것으로 해석되었다. 그러나 과다 소금 섭취 시 신장의 기능이 악화되고 기저막이 두꺼워진다고 알려져 있어 그 주원인 물질이 NaCl일 가능성이 있다고 시사되었다. 천일염에 함유된 미네랄 성분들이 미네랄이 거의 없는 소금에 비해 신장의 기능을 덜 악화시키고 기저막의 구조 변화에 덜 영향을 주는지에 대한 연구는 추후 검토가 요구된다. 그에 더하여 db/db에 합초소금을 섭취시킨 GSD 식이군과 GG 식이군은 대조군(C)과 SS 식이군에 비해 기저막이 얇았으며 lean mice의 일반식이한 정상쥐(N)에 더욱 가까웠다. 특히 GG 식이군이 정상쥐에 가장 가까운 기저막의 두께를 나타냈다.

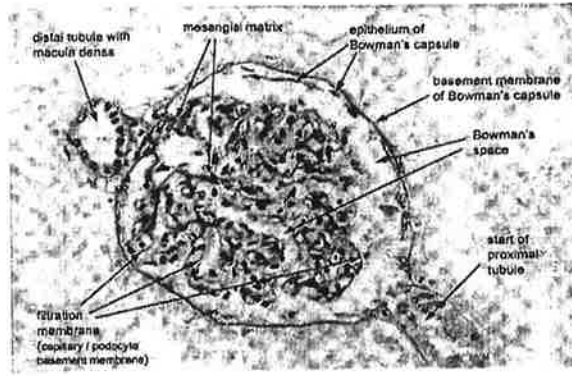


Fig. 46. Diagram that shows scientific term of glomerulus in kidney.

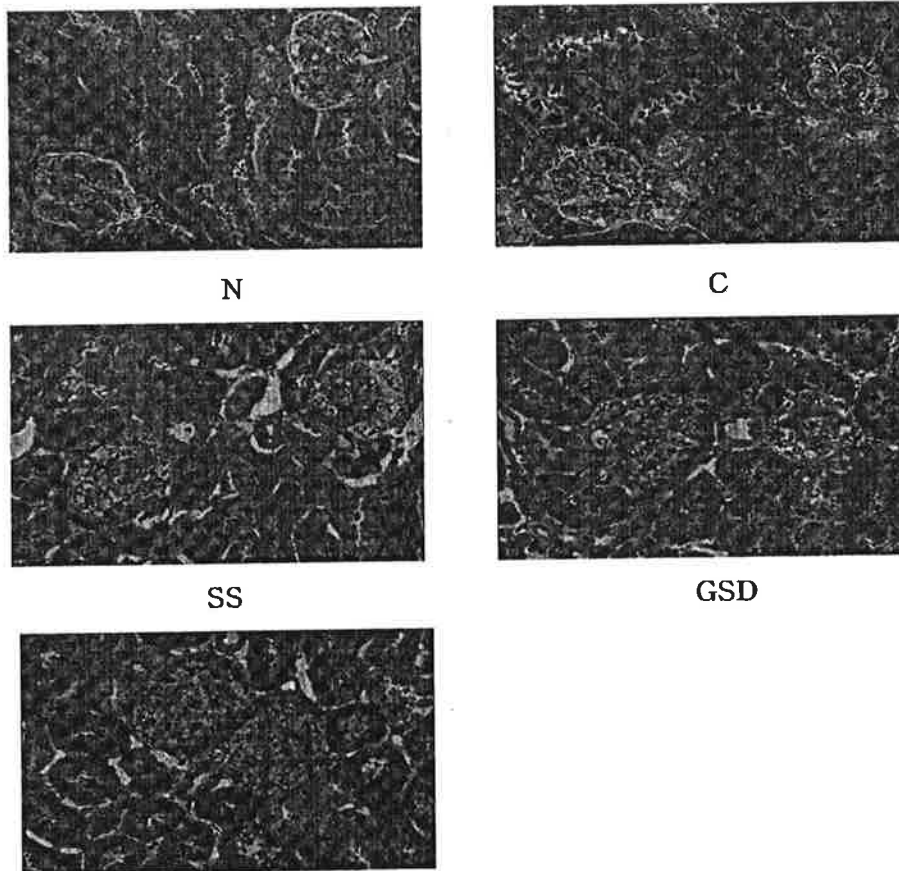


Fig. 47. Light microscopic images of kidney in normal, control and various salt diet mice.

N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.

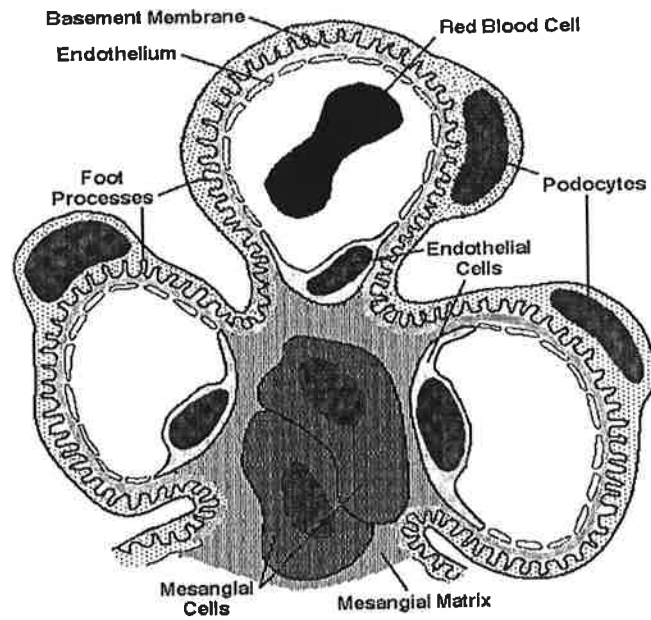
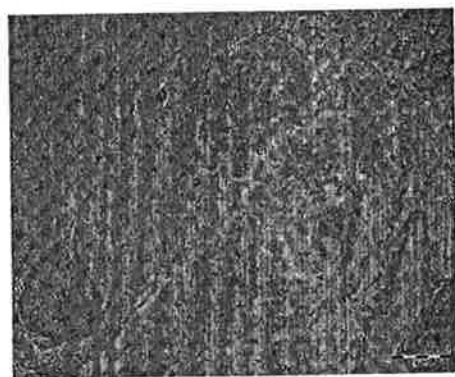
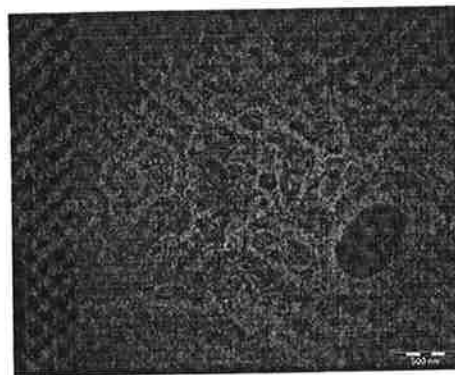


Fig. 48. Diagram shows detailed structure of glomerulus (WEB)



Normal



Control

Fig 49. TEM images of glomerulus in kidneys of mice fed various salts.

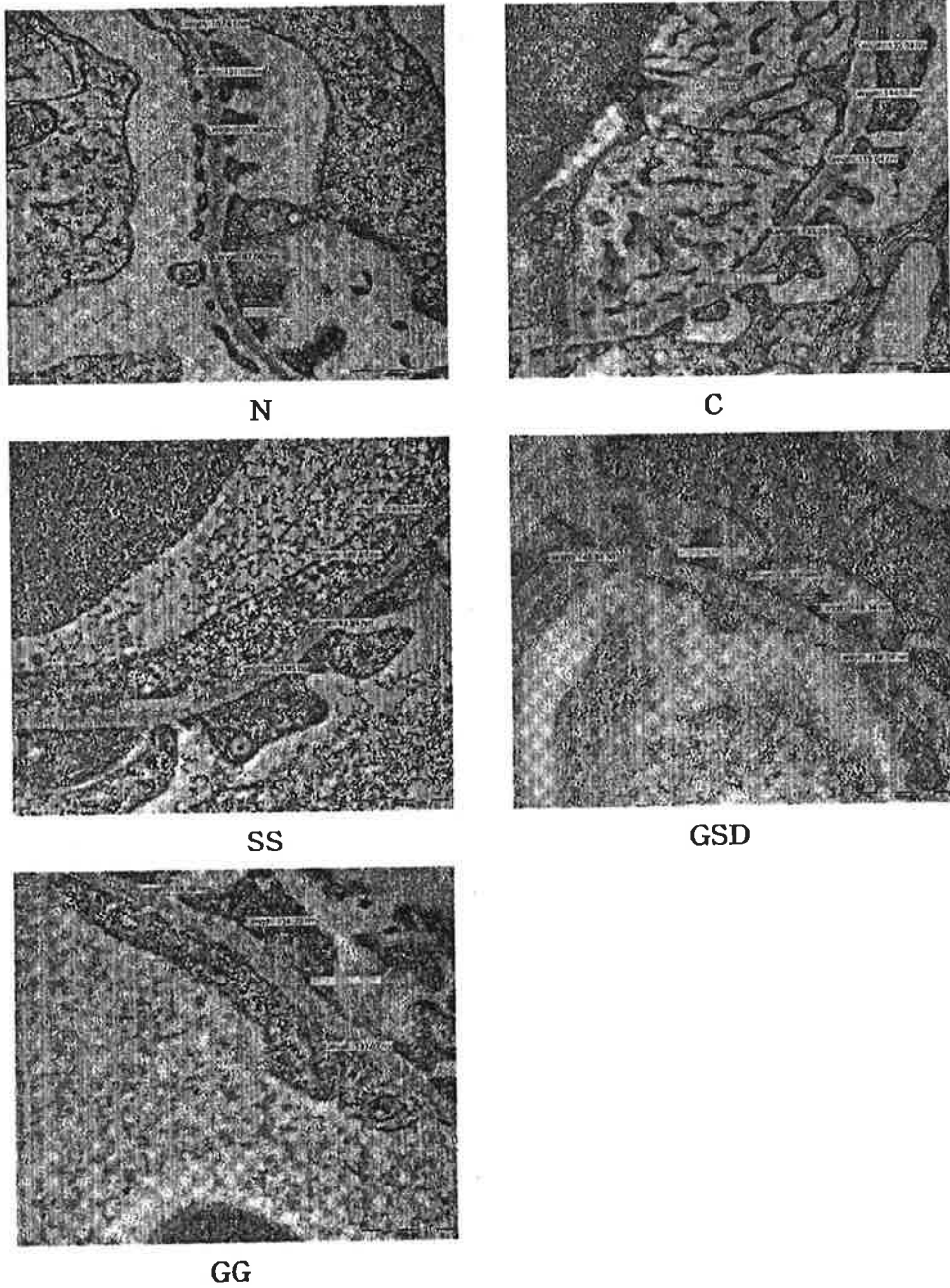


Fig. 50. TEM images of glomerulus in kidneys of mice fed various salts.  
 N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.



Table 11. Thickness of basal membranes in glomerulus of mice fed various salts

Groups	thickness (nm) of basal membrane in glomerulus
Normal	120.70±18.85
Control	138.80± 9.41
SS	131.77±28.30
GSD	121.85±15.43
GG	126.48± 3.68

N(db/lean) 정상군 (정상식이, AIN-93G); C, 당뇨대조군(정상식이, AIN-93G); SS, 1% 천일염 식이군; GSD, 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 함초식물소금 식이군.

이상의 결과를 종합해 보면, leptin receptor의 결함으로 인한 과식과 과음으로 자발적인 비만과 인슐린 저항성이 유발되는 db/db mice에서 2종의 함초소금들(GSD, GG)의 식이가 당화혈색소(HbA1c)의 함량을 낮추는 효과를 제외하고 포도당 내성 실험 등의 항당뇨 효과에 천일염(SS) 식이와 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 함초를 이용하여 제조된 함초고압열수분무소금(GSD)과 함초와 건강기능성이 우수한 식물자원과 혼합하여 제조한 함초식물소금(GG)은 간과 혈중에서 지질과산화물 생성 억제 효과를 나타내 소금으로부터 오는 산화적 스트레스를 줄여주는데 효과가 있음을 확인하였다. 그에 더하여 이들 식물소금들은 지방조직에서 지방세포가 사멸되어 생성되는 crown-like structure 형성 수가 적고 신장의 기적막 기능 등의 형태학적 변화를 적게 줄을 밝혔다.

### 3-7. 식물소금들이 염민감쥐에서 혈압 상승 억제에 미치는 영향

앞서 살펴본 바와 같이 leptin receptor가 결핍되어 과식과 과음으로 인해 자발적으로 비만과 인슐린 저항성이 유발되는 db/db mice에서 2종의 합초소금들(GSD, GG)의 식이가 당화혈색소(HbA1c)의 함량을 낮추는 효과를 제외하고 포도당 내성 실험 등의 항당뇨 효과에 천일염(SS) 식이와 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 합초를 이용하여 제조된 합초고압열수분무소금(GSD)과 합초와 건강기능성이 우수한 식물자원과 혼합하여 제조한 합초식물소금(GG)은 간과 혈중에서 지질과산화물 생성 억제 효과를 나타내 소금으로부터 오는 산화적 스트레스를 줄여주는데 효과가 있음을 확인하였다. 그에 더하여 이들 식물소금들은 지방조직에서 지방조직이 사멸되어 생성되는 crown-like structure 형성 억제 효과가 있음을 알 수 있었다.

본 장에서는 합초를 이용하여 제조된 합초고압열수분무소금(GSD)과 합초와 건강기능성이 우수한 식물자원과 혼합하여 제조한 합초식물소금(GG)의 식이가 소금 섭취로 인해 자발적으로 혈압이 상승하는 염민감쥐인 Dahl salt-sensitive rat에서 혈압 상승 억제 효과를 평가하고자 하였다. 즉 3% NaCl의 되도록 99%이상의 2% NaCl과 2% 합초고압열수분무소금(GSD, 50% NaCl)과 합초식물소금(GG, 50% NaCl) 및 3% NaCl인 천일염을 첨가하여 제조된 사료들을 각각 5주 동안 섭취시킨 후 혈압을 측정하였다. 특히 제 3-5절에서 사용하였던 tail-cuff 측정기는 꼬리에 혈압측정기로 삽입함으로써 외부로부터 오는 많은 스트레스를 주어 분석된 혈압수치의 편차가 큰 단점을 나타내 실패한 바 있다. 그래서 이러한 문제점을 줄여주기 위하여 본 장에서 사용한 혈압측정기는 동물의 대퇴부 동맥내에 혈압측정 sensor를 삽입하여 원격으로 자유롭게 혈압을 측정할 수 있는 DSI PhysioTel® PA-C40 telemetry system (Data Sciences International:DSI, USA)을 이용하여 수축기와 이완기 혈압을 측정하였다.

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 재료 및 시약

미네랄이 풍부한 천일염과 식물소금들은 상기와 같은 것을 실험에 사용하였다. Trichloroacetic acid, Malondialdehyde(MDA), 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH), 및 lanthanum chloride Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터,

Anti-Akt2/PKB $\beta$ 는 Upstate Biotech Inc. (NY, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 또한 Rabbit anti-GAPDH polyclonal antibody는 Ab Frontier (Seoul, Korea)로부터, Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G 와 anti-NF  $\kappa$ B p65는 Millipore (CA, USA)로부터, 그리고 Anti-VEGF and RhoA는 Santa Cruz Biotechnology (Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다.

## 2) 실험동물 및 식이조성

본 연구에 사용된 실험동물은 8주령의 Male Dahl salt-sensitive rat으로 다물사이언스(대전, 한국)로부터 구입하여 케이지당 2마리씩 넣어 사육하였다. 사육환경은 온도 21~24 $^{\circ}$ C, 습도 50~60%가 되도록 유지하였고, 명암은 12시간(day light 06:00~18:00)을 주기로 하여 2주일간 환경에 적응 시킨 후 실험을 수행하였다. 이들의 평균 체중은 390 $\pm$ 20 g이었고, 난괴법에 의해 천일염(SS)군, 함초고압열수분무소금(GSD)군, 함초식물소금(GG)군으로, 총 3개의 실험군(n=4)으로 분류하였다. 각 실험군의 사료는 AIN-93G를 기준으로 3%의 NaCl 함량을 함유하도록 제조하였다. 즉, SS군의 식이는 3%의 천일염, GSD군에는 2%의 천일염과 2%의 함초고압열수분무소금(NaCl 함량 약 50%)을 첨가하고, GG군에는 2%의 천일염과 2%의 함초식물소금(NaCl 함량 약 50%)을 함유하는 고염식이 사료를 제조하여 4주간 물과 함께 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

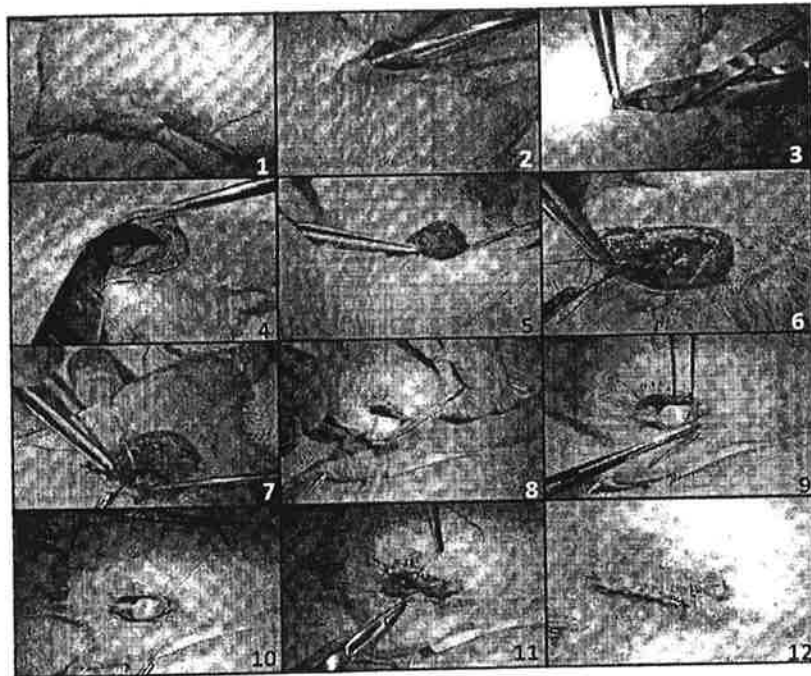
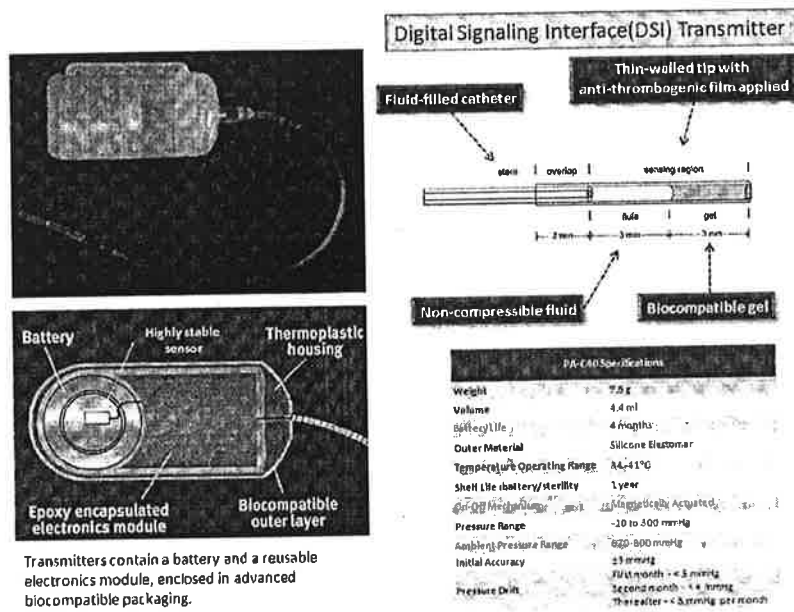
## 3) 물 섭취량 및 식이효율

각 시료군들을 대상으로 식이한 쥐의 체중 증가량은 안정화기간이 끝난 시점을 초기 체중으로 하여 주1회 총4주간 측정하였다 식이섭취량은 식이공급량에 대한 잔여량 및 흘린 양을 제외하고 계산하였으며 물섭취량은 주1회 총4주간 측정하였다 식이효율(food efficiency ratio, FER)은 체중증가량에 대한 식이섭취량으로 나누어 계산하였다

## 4) 혈압 측정

앞 장에서 언급한 동물실험을 통하여 식물소금들의 혈압강하 효과를 검정을 위해 사용한 혈압 측정법은 tail-cuff법으로, 혈압을 측정할 때 쥐들은 좁은 cage에 넣어져 안정이 될 때까지 많은 시간이 소요되고 또한 꼬리에 측정기로 함으로서 외부로부터 많은 스트레스를 받게 되어 분석된 혈압수치의 편차가 큰 단점을 나타냈다. 그래서 이러한 문제점을 보다 줄여 주기 위하여 초기 동물의 대퇴부 동맥 내에 혈압측정 sensor를

삽입한 다음 원격으로 자유롭게 혈압을 측정할 수 있는 PA-C40 Transmitter (Data Sciences International: DSI, USA) 측정기를 도입하여 식이하는 동안 수축기와 이완기 혈압을 측정하였다. 이에 대한 혈압측정기는 아래 그림과 같다.



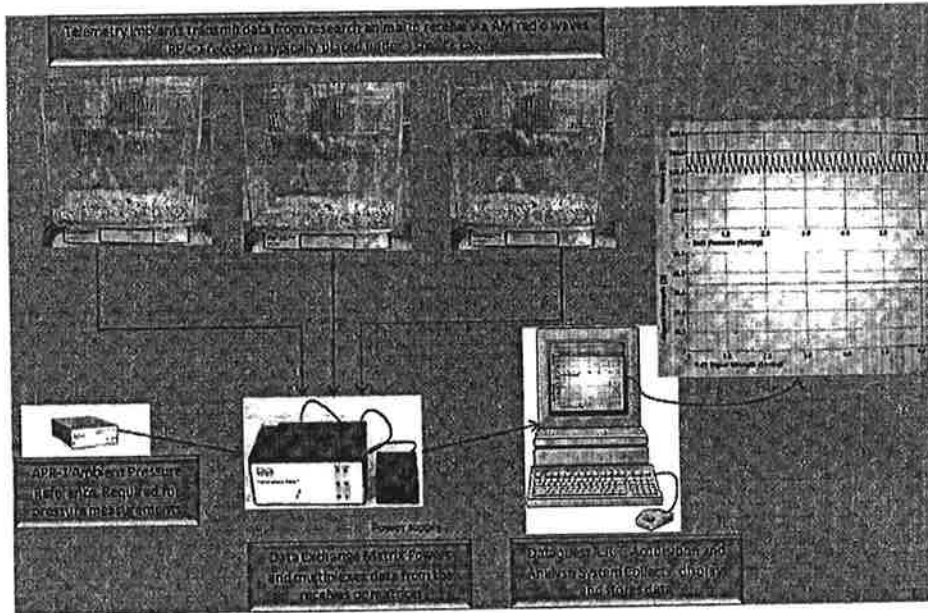


Fig. 51. DSI PhysioTel® PA-C40 telemetry systems for blood pressure measurement.

#### 5) 희생 및 채혈

실험동물은 희생 전 12시간 절식시킨 다음 에테르로 마취한 후 경추분리에 의해 희생하였다. 동물의 복부에서부터 흉부까지 개복하고 심장박동이 유지되고 있는 상태로 심장에서 직접 채혈하였다. 이후 간조직, 지방조직, 근육조직을 분리한 다음 이를 얼음으로 냉각시킨 생리식염수로 세척한 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 분석에 사용될 때 까지 보관하였다.

#### 6) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) 활성

모든 식이군의 ACE 활성은 Cushman 등(1971)이 제시한 방법으로 실시하였다. 즉 혈청(50  $\mu\text{L}$ )에 기질 300 mM NaCl을 함유하고 있는 100 mM sodium borate buffer 용액(pH 8.3)에 용해시킨 5 mM substrate (Hip-His-Leu, HHL) 150  $\mu\text{L}$ 를 가하여 혼합한 다음  $37^{\circ}\text{C}$  45분 동안 반응시켰다. 이 반응용액에 2N HCl 200  $\mu\text{L}$ 를 가하여 효소반응을 정지시킨 다음 여기에 2.0 mL의 ethyl acetate로 분배하였다. 얻어진 ethyl acetate를 10분 동안  $1000\times\text{g}$ 로 원심분리한 후 상층액 1.5 mL를 glass tube로 옮겨 상온에서 감압 농축하였다. 농축된 추출물에 1 mL의 증류수를 가하여 용해시킨 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도 값은 작성된 표준용액(hippuric acid)의

검량곡선을 이용하여 각 식이군의 ACE 활성을 hippuric acid 생성량으로 환산하였다.

#### 7) 혈장에서의 무기질 함량 분석

모든 실험쥐들은 식이기간 초기와 말기에 metabolic cage에서 개별적으로 사육하면서 24시간동안 뇨를 채취하였다. 채취된 뇨는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 분석에 사용하였다. 채취된 전혈은 heparinized tube에 넣고 원심분리하여 혈장을 얻었다. 뇨와 혈장의 무기질 함량은 atomic absorption spectrophotometer (AVANTA, GBC Scientific Equipment Pty Ltd, VIC, Australia)를 이용하여 측정하였으며 모든 실험결과는 3회 반복 분석하였다.

#### 8) 혈장의 지질과산화물 함량 측정

혈장에서의 지질과산화물 함량은 TBARS 법에 의해 측정하였다. 즉, plasma 0.1 mL을 20% trichloroacetic acid의 0.6 M HCl 0.5 mL와 0.67% thiobarbituric acid의 1 M NaOH용액 0.3 mL를 가하여 혼합한 다음  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 20분 동안 반응시켰다. 이 반응용액을 냉각시킨 다음 n-butanol 0.8 mL로 분배하여  $1500\times\text{g}$ 로 10분 동안 원심분리하였다. 얻어진 n-butanol 층의 흡광도는 532 nm에서 측정하였으며 이들 흡광도값은 작성된 표준용액 (malonaldehyde, MDA)의 표준곡선을 이용하여 혈장에서의 지질과산화물 함량으로 환산하였다.

#### 9) 단백질 카르보닐화 화합물(PCOs) 함량 측정

Protein carbonyl 함량은 Reznick 와 Packer (1994)등의 방법에 의해 측정하였다. 10 mM DNPH의 2 M HCl 용액 100  $\mu\text{L}$ 에 간 조직으로부터 얻어진 단백질 2 mg을 가한 다음 상온 및 암실에서 1시간 동안 반응시켰으며 이때 15분 간격으로 vortex하였다. 이 반응용액에 얼음으로 냉각시킨 10% trichloroacetic acid (w/v) 1 mL를 가하여 혼합한 다음  $3000\times\text{g}$ 로 10분 동안 원심분리하였다. 얻어진 단백질 펠렛(pellet)을 ethanol/ethyl acetate (1:1, v/v) 용액 2 mL로 3회 반복하여 세척한 다음 이를 6 M guanidine hydrochloride (pH 2.3) 1.5 mL로 용해시켜  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 반응시킨 후, 370 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도값에 대한 DNPH의 molar extinction coefficient ( $\epsilon = 2.2 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )를 나누어 간조직에서의 protein carbonyl 함량으로 환산하였다.

#### 10) Western blotting

조직의 전처리 : 신장, 간, 지방조직은 lysis buffer [1% Triton X-100, 50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 10 mM NF, 10 mM EDTA, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 10 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  and 0.1 mg/ml aprotinin]로 polytron (PT1200E, Kinematicca AG, Switzerland)을 이용하여 homogenizing한 후, 4°C에서 2시간 동안 서서히 교반시켜 원심분리(15000 rpm, 4°C, 20 min)하였다. 얻어진 상등액은 Bradford assay를 이용하여 단백질을 정량하였다.

western blotting : 신장조직의 VEGF와 RhoA 단백질의 발현량을 조사하기 위해, 각 식이군들의 단백질 용액(50  $\mu$ g, 10  $\mu$ L)에 Tricine sample buffer (Biorad) 10  $\mu$ L를 가하여 95°C에서 5분 동안 denaturation 하였다. Denaturation된 단백질을 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동하여 전개된 단백질들을 polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membrane으로 이동시킨 다음 이 membrane를 3% bovine serum albumin (BSA)이 함유된 0.05% Tween-20 (TBST) buffer로 1시간 동안 blocking하였다. 이어 TBST 용액으로 세척한 후, primary antibody로 Anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Seoul, Korea)와 RhoA (Santa Cruz Biotechnology, Seoul, Korea)에 처리하여 overnight 반응하였다. Secondary antibody로 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (Millipore, CA, USA)를 사용하여 1시간동안 반응시킨 후, luminol이 함유된 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액과 반응시켜 필름에 현상하였다.

#### (11) 통계처리

본 실험결과의 통계처리는 SPSS (v 18.0)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었다. 모든 결과는 반복 측정법(repeated measure)을 사용하였으며 각 시간에 따른 집단 간 차이는 One-way ANOVA와 사후검정(Duncan's test)을 실시하였으며 분석 시 유의수준은  $p < 0.05$ 로 설정하여 측정하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### 1) 일반 특성

염 민감쥐에 식물소금들과 천일염이 함유된 사료를 섭취시켜 4주 동안 체중 변화를 조사하였다. 그 결과(Fig. 51), 모든 식이군들의 체중은 식이기간 동안 지속적인 증가를 보이다가 식이 4주째에 약간 감소하는 경향을 보였다. 또한 GSD 식이군과 GG 식이군의 함초소금 식이군이 천일염식이군(SS)에 비해 체중 증가가 높았으나 각 집단 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 반면에 사료 섭취량은 SS 식이군이 GSD 및 GG 식이군보다 높았다(Fig. 52). 일일 물 섭취량은 약 65 mL내외로 나타났으나 각 집단 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 53).

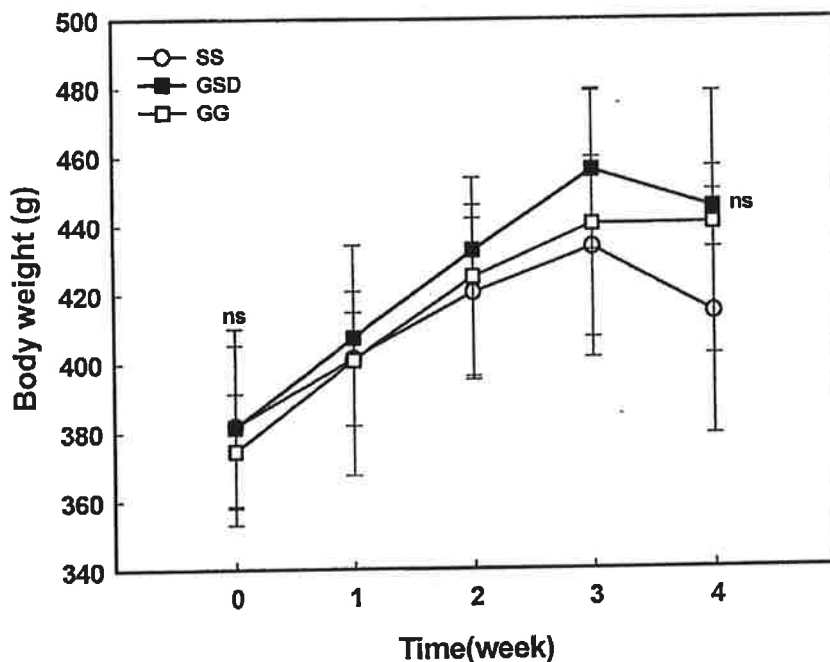


Fig. 51. Body weight in rats fed diets containing glasswort and plant-derived salt.

SS, 3% 천일염 식이군; GSD, 2% 천일염과 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 천일염과 2% 함초식물소금 식이군.



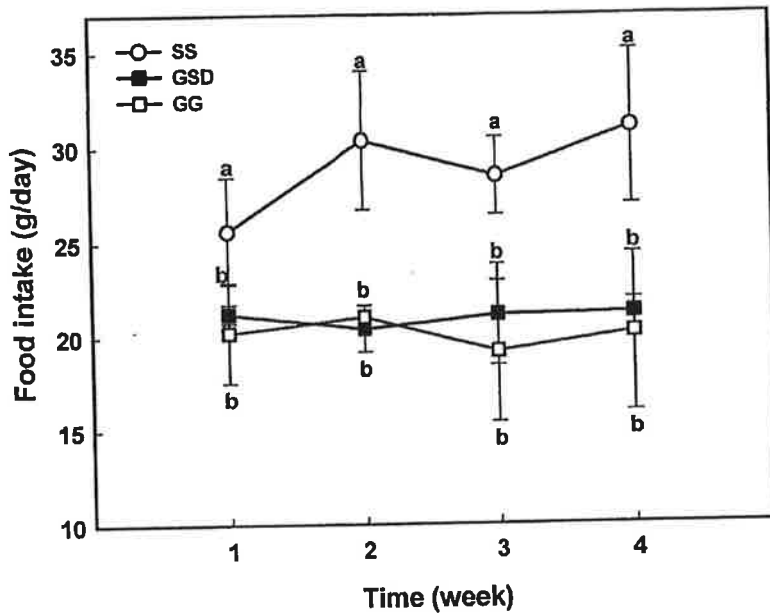


Fig. 52. Food intake in rats fed diets containing glasswort and plant-derived salt.

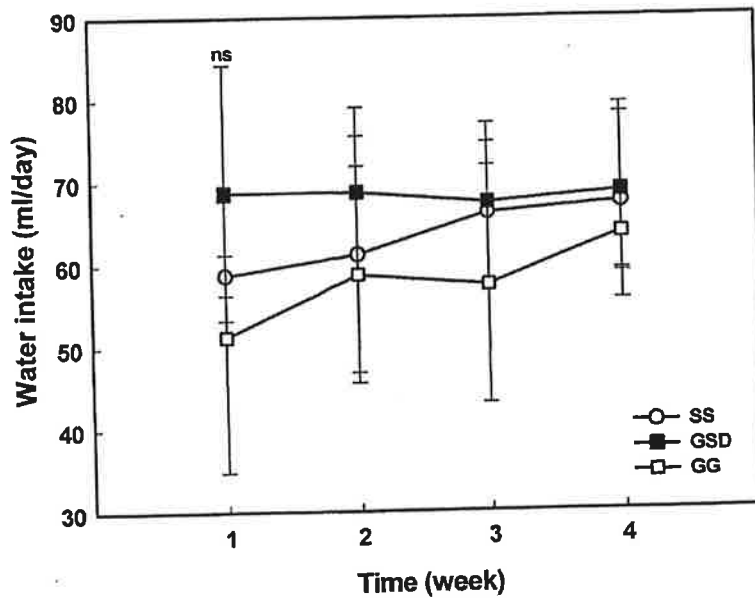


Fig. 53. Water intake in rats fed diets containing glasswort and plant-derived salt.  
 SS, 3% 천일염 식이군; GSD, 2% 천일염과 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 천일염과 2% 함초식물소금 식이군.

## 2) 혈압

### (1) 수축기혈압

염 민감쥐에서 합초소금들을 식이하는 동안 telemetry system를 이용하여 수축기 혈압의 변화를 측정하였다. 그 결과(Fig. 54), SS 식이군과 GSD식이군은 식이기간 중 지속적으로 수축기 혈압이 상승하였다. 이는 염 민감쥐인 Dahl salt-sensitive rat은 소금을 섭취하였을 때 혈압이 상승하는데 이 결과와 일치하였다. 그러나 GSD식이군은 SS 식이군보다 낮은 상승 폭을 나타냈으나 집단 간의 유의적 차이는 없었다. 흥미롭게도 GG식이군은 식이 6일까지 수축기 혈압이 상승하였으나 이후 식이 기간 동안 그 수치가 상승하지 않고 그대로 유지하는 경향을 보였다. 특히 이 GG 식이군은 GSD 식이군 및 SS 식이군에 비해 낮은 수축기 혈압을 유지하였는데 식이 18일부터 그 수치가 현저하게 차이를 보였으며 식이 4주후에는 유의적인 차이를 나타냈다. 과다 소금 섭취는 고혈압, 당뇨 등의 대사성 증후군에 직접적인 영향을 주는데, 정상쥐 및 염 민감쥐 등의 다양한 동물실험모델을 통하여 미네랄이 풍부한 소금이 미네랄이 거의 없는 소금보다 혈압 상승을 완화시켰다고 보고한 바 있다. 본 실험에서 나타난 바와 같이 염 민감쥐에서 합초식물소금(GG)이 미네랄이 풍부한 소금 즉 천일염(SS)과 달리 수축기 혈압 상승이 거의 없었던 것은 미네랄 성분뿐만 아니라 식물에 함유된 다양한 기능성 유기 성분들이 혈압 상승 억제에 기여한 것으로 추측된다.

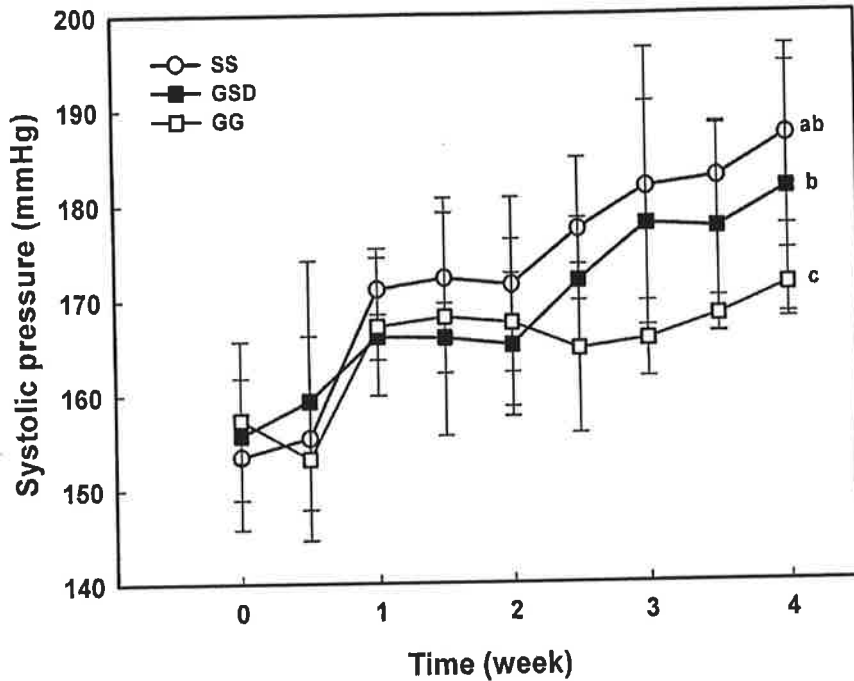


Fig. 54. Changes of systolic blood pressure in rats fed diets containing glasswort and plant-derived salt.

SS, 3% 천일염 식이군; GSD, 2% 천일염과 2% 합초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 천일염과 2% 합초식물소금 식이군.

## (2) 이완기혈압

또한 염 민감쥐에서 합초소금들을 식이하는 동안 telemetry system를 이용하여 이완기 혈압의 변화를 측정된 결과(Fig. 55), 각 식이군의 이완기 혈압은 식이하는 동안 수축기 혈압 결과와 유사하였다. 즉, SS 식이군과 GSD식이군은 식이기간 중 지속적으로 이완기 혈압이 상승하였으며, 또한 GSD식이군은 SS 식이군보다 낮은 상승 폭을 나타냈으나 집단 간의 유의적 차이는 없었다. 흥미롭게도 GG 식이군은 식이 6일까지 이완기 혈압이 상승하였으나 이후 식이 기간 동안 그대로 유지하는 경향을 보여 수축기 혈압 결과와 일치함을 알 수 있었다. 이 GG 식이군은 GSD 식이군 및 SS 식이군에 비해 낮은 이완기 혈압을 나타냈으나 집단 간 유의적인 차이는 없었다. 그러나 수축기 혈압 결과와 마찬가지로 합초소금들이 이완기 혈압을 상승시키지 않는 것으로

시사되었다. 그러므로 혈압 상승 억제 효과를 갖는 식물소금의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

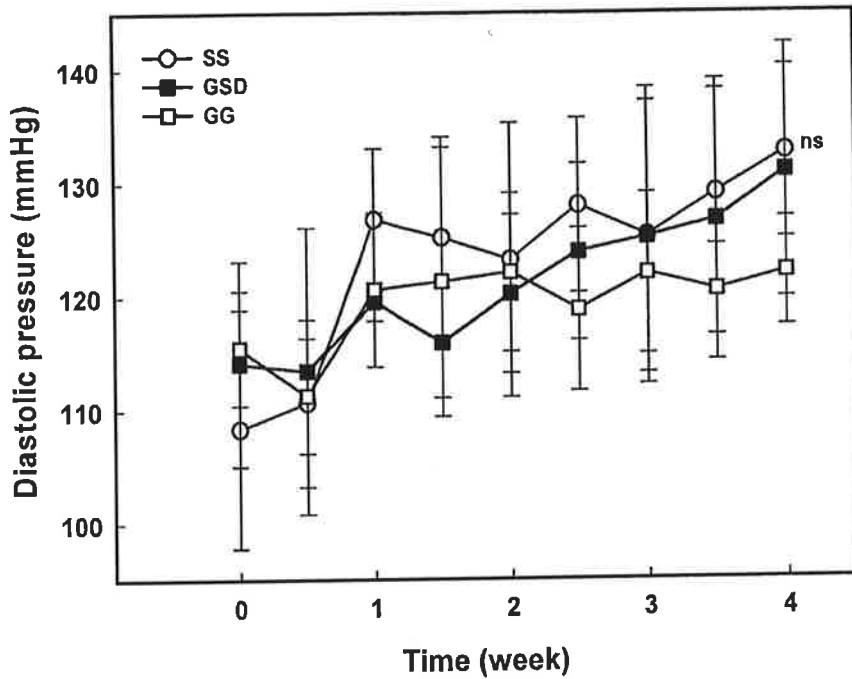


Fig. 55. Changes of diastolic blood pressure in rats fed diets containing glasswort and plant-derived salt.

SS, 3% 천일염 식이군; GSD, 2% 천일염과 2% 합초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 천일염과 2% 합초식물소금 식이군.

### 3) 혈중 ACE 활성

Renin-angiotensin-aldosterone system은 우리 몸에서 혈압과 물의 평형을 조절하는 중요한 hormone 기작이다. 즉 우리 몸에 수분이 부족하게 되면 신장에서 renin이 분비되고 이어 간에서 생산한 angiotensin이 혈관을 수축시키고 이 때 aldosterone 호르몬에 의해 신장으로부터 물과 Na를 혈액에 보내어 혈압을 상승시킨다고 알려져 있다. 특히 간에서 angiotensin 전화 효소에 의해 생성된 angiotensin은 renin-angiotensin-aldosterone

system에 있어서 혈압을 상승시키는 주된 원인 물질이다. 그러므로 angiotensin 전화 효소의 발현량이 적다는 것은 체내 혈압이 낮다는 의미로 해석할 수 있다. 그래서 함초소금들의 식이에 따른 Dahl salt-sensitive rat의 혈청 ACE 활성을 조사한 결과, SS 식이군과 GSD 식이군간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나 GSD 식이군이 SS식이군보다 약간 낮은 ACE 저해 활성을 나타내 이는 혈압 결과와 일치하였다. 흥미롭게도 GG 식이군은 GSD 식이군과 SS 식이군보다 유의적으로 낮은 ACE 활성을 보였다. 그러므로 GG소금은 소금 섭취에 의해 혈압이 상승하는 염 민감쥐에 섭취시키더라도 혈압이 상승하지 않고 ACE 활성도 낮아 혈압 상승 억제 효과가 있음을 더욱 확신할 수 있었다.

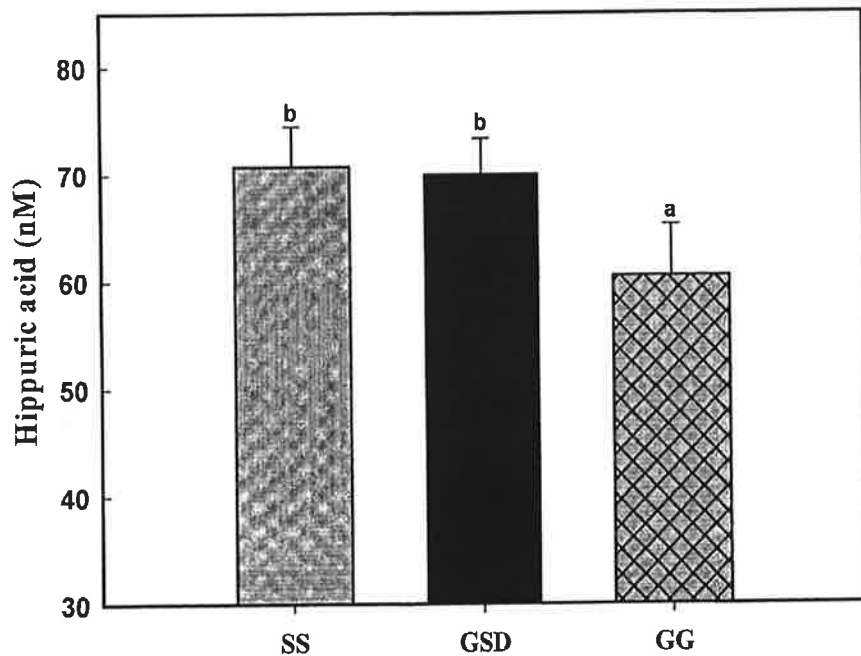


Fig. 56. Levels of ACE activity in serum of rats fed diets containing glasswort and plant-derived salt.

SS, 3% 천일염 식이군; GSD, 2% 천일염과 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 천일염과 2% 함초식물소금 식이군.

#### 4) 혈압 조절 인자들의 발현량

각 식이군의 신장 조직에서 혈압 조절 인자인 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)의 발현량을 western blotting에 의해 조사하였다. 그 결과(Fig. 57), 천일염만을 식이한 SS식이군이 가장 낮은 VEGF 발현량을 나타냈으며 함초소금인 GSD 식이군과 GG 식이군 모두 SS 식이군 보다 높은 발현량을 보였다. 또한 GSD 식이군과 GG 식이군 간의 VEGF 발현량은 거의 유사하였다. VEGF는 NO synthase를 발현시켜 NO 생성을 유도하는 단백질로써 혈압을 조절하는 인자들 중 하나로, 이 인자의 발현량이 많을수록 NO 생성량을 증가시켜 혈압을 낮추는 역할을 한다고 알려져 있다(Carie S. Facemire, 2009). 두 함초소금 식이군에서 SS 식이군보다 높은 VEGF 발현량을 보였던 것은 NO 생성을 높여 혈압을 낮춘 것으로 해석되었다. 이는 함초소금식이군이 식이 기간 동안 SS 식이군보다 낮은 수축기 및 이완기 혈압을 유지하였던 결과와 일치하였다.

또한 각 식이군의 신장조직에서 근육이완 및 수축을 조절하는 ras homolog gene family member A (RhoA)의 발현량을 조사한 결과(Fig. 58), 각 식이군들의 RhoA 발현량은 VEGF 발현량과 반대 경향을 보였다. 즉 SS 식이군은 가장 높은 RhoA 발현량을 보였으며 두 함초소금식이군은 낮은 RhoA 발현량을 나타냈다. 또한 두 식물소금식이군 간에는 GG식이군이 GSD식이군보다 낮은 RhoA 발현량을 나타냈다. 근육조직에서 RhoA는 myosin phosphatase를 저해하여 혈관긴장도(vascular tone)를 높여 혈압을 상승시킨다고 보고된 바 있다(Angela Wirth; Stefan Offermanns, 2008). 본 실험에서는 두 함초소금식이군이 SS식이군보다 낮은 RhoA 발현량을 나타냈다는 것은 myosin phosphatase를 저해하지 못하여 혈관긴장도를 낮춘 것으로 해석되어졌다. 따라서 두 식물소금들은 RhoA의 발현을 저해함으로써 혈관긴장도를 낮추어 혈압 상승을 억제한 것으로 시사되었다. 특히 GG소금이 GSD소금보다 더 RhoA의 발현을 저해한 것으로 나타나 더욱 혈압 상승 억제 효과가 있는 것으로 판단되었다.

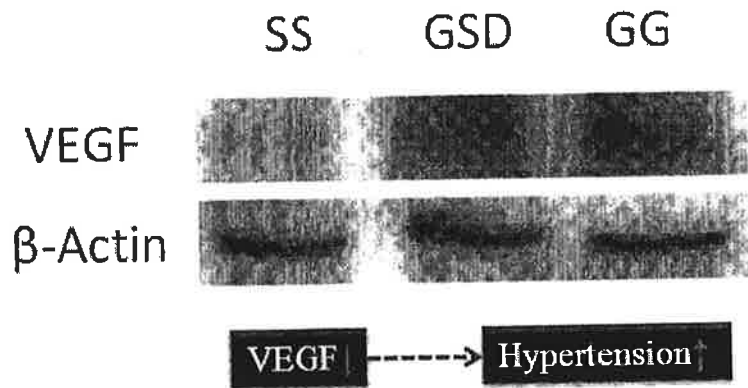


Fig. 57. Protein expressions level of VEGF in kidney by western blotting analysis.

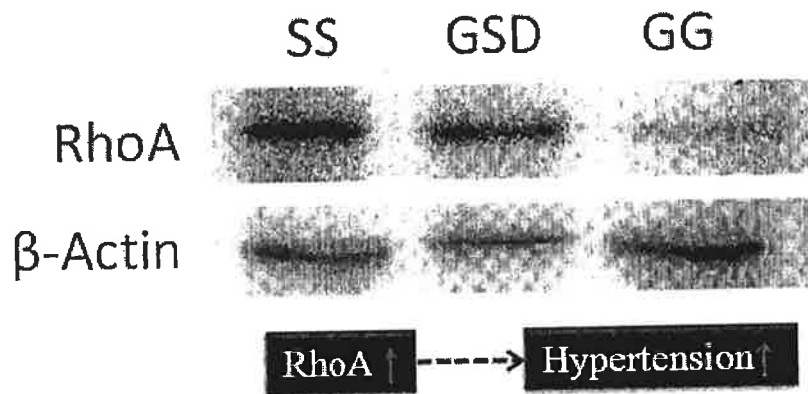


Fig. 58. Protein expressions level of RhoA in kidney by western blotting analysis. SS, 3% 천일염 식이군; GSD, 2% 천일염과 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 천일염과 2% 함초식물소금 식이군.

##### 5) 혈장에서의 전해질 함량

혈중 Na, K, Ca, Mg 등의 미네랄 성분은 세포막의 투과성을 조절하고 세포액의 이동을 조절하는 매우 중요한 성분들로, 혈압에 직접적인 영향을 준다고 알려져 있다. 두 함초소금의 섭취가 혈중 미네랄 성분에 영향을 주었는지 알아보기 위하여, 4주간의 식이 후, 희생하여 얻어진 혈장에 함유된 Na, K, Ca, Mg를 AA 분석기에 의해 분석하였다. 혈중 Na 함량은 44.12 ~ 44.40 mmol/L로 측정되어 각 식이군 간에 유의적인 차이는 보

이지 않았다(Table 12). 또한 혈장 K의 농도는 약 3.06~5.46 mmol/L로 측정되었으며 집단 간에 유의적 차이를 보였다. GG 식이군은 가장 낮은 혈장 K 함량을 나타냈으며 SS 식이군과 GSD 식이군과 유의적인 차이를 보였다. 혈장 Ca의 농도는 1.72~1.86 mg/L로 분석되었으며 집단 간에 유의적 차이는 보이지 않았다. Mg은 심장과 혈관에 필요한 물질로 수축 단백질을 조절하고 세포막의  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ 의 수송에 관여하기도 하며 ATPase의 조효소 역할을 한다고 알려져 있다. 또한, NO의 생성에 관여하며 호르몬에 영향을 미쳐 혈압을 조절하기도 한다. 혈장의 Mg 농도는 1.28~1.66 mg/L로 측정되었다. 혈장 Mg농도는 집단 간의 차이를 나타냈으며 함초소금 식이군이 천일염 식이군보다 높은 혈중 Mg 함량을 나타냈다.

Table 12. Mineral composition in the plasma of rats fed diets containing glasswort and plant-derived salt

Groups	Content (mmol/L)			
	Na	K	Ca	Mg
SS	44.40±0.66 <sup>ns</sup>	5.46±0.28 <sup>a</sup>	1.77±0.08 <sup>ns</sup>	1.28±0.05 <sup>b</sup>
GSD	44.12±0.84	4.69±0.28 <sup>a</sup>	1.86±0.06	1.59±0.13 <sup>a,b</sup>
GG	46.33±0.97	3.06±0.37 <sup>b</sup>	1.72±0.23	1.66±0.08 <sup>a</sup>

SS, 3% 천일염 식이군; GSD, 2% 천일염과 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 천일염과 2% 함초식물소금 식이군.

#### 6) 뇨에서의 미네랄 함량

혈압은 Na, K, Ca, Mg 등의 미네랄 성분 균형에 의해 조절되는데, 과량의 소금 섭취는 체내 항상성 유지를 위해 과량의 Na을 분비하는 것으로 알려져 있다. 염 민감쥐에서 함초소금 섭취가 뇨로 분비되는 미네랄 성분 함량의 변화에 미치는 영향을 알아보고자, 모든 실험쥐들은 식이기간 초기와 말기에 metabolic cage에서 개별적으로 사육하면서 24시간동안 뇨를 채취한 다음, 이를 atomic absorption spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 그 결과 (Table 13), 함초소금과 천일염을 혼합하여 제조된 사료의 섭취 전과 섭취 4주 후의 뇨에 함유된 미네랄 함량을 비교해 보면, 4주 후의 뇨에는 Na 함량이



매우 높게 나타났고 Ca과 Mg 함량 또한 대체적으로 높게 나타났으나, K 함량은 감소하는 경향을 나타냈다. 이는 과량의 소금 섭취로 인해 K를 제외한 다른 미네랄 성분들의 분비량은 증가한 것으로 해석되었다. 뇨에 함유된 Na/K 비는 혈압과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있는데 이 비율이 낮을수록 낮은 혈압을 갖는다고 보고된 바 있다. 각 식이군들의 N/K비를 살펴보면 식이전이나 식이 4주 후에도 각 집단 간의 유의적인 차이는 없었다. 그러나 식이 4주 후 SS 식이군이 가장 높은 N/K비를 나타냈으며 GG 식이군이 가장 낮은 N/K비를 보였다. 이는 합초소금 중 GG소금이 천일염(SS)만 섭취할 때 보다 낮은 혈압을 나타낸 것으로 해석되며 앞서 제시된 수축기와 이완기 혈압 결과와 일치하였다. 각 식이군의 일일 뇨 분비량의 경우 GSD 식이군의 분비량이 가장 많았으며 GG가 그 다음으로, 그리고 SS 식이군이 가장 낮은 일일 뇨 배출량을 나타내 합초소금들의 섭취가 천일염(SS)만 섭취했을 때 보다 일일 뇨 배출량이 많음을 알 수 있었다. 이어 각 식이군들 간의 일일 뇨 미네랄 분비량을 검토해 본 바에 의하면 식이 전이나 식이 4주 후 각 식이군들 간의 유의적인 차이는 없었다. 식이 4주 후의 Mg과 Na의 일일 분비량은 식이 전보다 높은 것으로 나타났으며 K과 Ca의 일일분비량은 약간 높거나 거의 유사하였다. 각 식이군 간의 일일 미네랄 분비량의 경우 SS 식이군에서 Na 함량이 높았으나 유의차는 없었다. 또한 그 외의 미네랄 성분 함량은 다른 식이군들과 유사하였다.

Table 13. Mineral composition in the urines of rats fed diets containing glasswort and plant-derived salt.

Group	Concentration (mmol/l)				Na:K	Urine (ml/day)	Excretion (mmol/day)			
	Mg	K	Ca	Na			Mg	K	Ca	Na
Urine-W0										
SS	4.01±1.15 <sup>ab</sup>	53.28±2.37 <sup>ab</sup>	1.35±0.45 <sup>ab</sup>	34.88±12.55 <sup>ab</sup>	0.64±0.21 <sup>ab</sup>	10.88±2.49 <sup>ab</sup>	0.0423±0.00 <sup>ab</sup>	0.56±0.10 <sup>ab</sup>	0.01±0.00 <sup>ab</sup>	0.35±0.09 <sup>ab</sup>
GSD	3.00±0.60	52.02±1.70	1.29±0.42	27.04±7.40	0.51±0.13	12.00±2.72	0.04±0.01	0.62±0.13	0.02±0.00	0.33±0.12
GG	3.62±0.87	52.40±1.53	1.60±0.39	33.78±8.40	0.62±0.15	13.38±2.19	0.05±0.01	0.70±0.11	0.02±0.00	0.46±0.17
Urine-W4										
SS	2.94±0.57 <sup>ab</sup>	30.48±5.04 <sup>b</sup>	1.14±0.49 <sup>ab</sup>	53.96±15.48 <sup>ab</sup>	1.64±0.20 <sup>ab</sup>	27.25±5.56 <sup>a</sup>	0.07±0.00 <sup>ab</sup>	0.75±0.08 <sup>ab</sup>	0.02±0.00 <sup>ab</sup>	1.24±0.17 <sup>ab</sup>
GSD	5.71±2.87	51.13±1.09 <sup>a</sup>	2.42±0.64	90.35±8.03	1.60±0.10	9.25±1.49 <sup>b</sup>	0.06±0.03	0.47±0.07	0.02±0.00	0.86±0.19
GG	5.47±3.00	41.64±6.16 <sup>ab</sup>	2.30±0.64	62.39±12.76	1.47±0.11	18.13±5.74 <sup>ab</sup>	0.08±0.01	0.70±0.16	0.03±0.01	1.13±0.27

SS, 3% 천일염 식이군; GSD, 2% 천일염과 2% 합초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 천일염과 2% 합초식물소금 식이군.

### 7) 혈중의 지질과산화물 함량

Dahl salt sensitive rat에서 두 합초소금(GSD, GG) 식이가 산화적 스트레스(oxidative stress)에 영향을 주는지 알아보고자, 혈장에서 지질과산화물(malondialdehyde, MDA) 함량을 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 법에 의해 조사하였다. 그 결과(Fig. 59), 천일염식이군(SS)의 혈중 MDA 함량이 가장 높게 나타났다. 미네랄이 풍부한 소금(갯벌천일염)은 미네랄이 거의 없는 소금보다 혈중 지질과산화물 함량이 더 낮아 소금으로부터 오는 산화적 스트레스를 줄여 준다고 보고된 바 있다. 그러나 좋은 소금이라도 할지라도 과다 소금 섭취는 산화적 스트레스를 준다는 것을 재확인하였다. GSD 식이군과 GG 식이군은 SS 식이군에 비해 혈중 MDA 함량이 낮게 나타났으며 식물소금 중 GG 식이군이 GSD 식이군보다 더욱 낮은 함량을 보였다. 미네랄이 풍부한 천일염이 미네랄이 거의 없는 소금보다 산화적 스트레스를 줄일 수 있더라도 합초를 이용하여 제조된 합초소금(GSD)이 더욱 산화적 스트레스를 줄여주는 것으로 판단되었다. 그에 더하여 합초에 항산화 활성이 우수한 생물자원과 혼합하여 제조된 합초식물소금(GG)은 혈중 지질과산화물 생성을 더욱 강하게 억제하는 것으로 판단되었다. 그러므로 두 식물소금 섭취는 체내에서 산화적 스트레스를 줄이는데 매우 유용 식품소재로 개발이 가능할 것으로 기대된다.

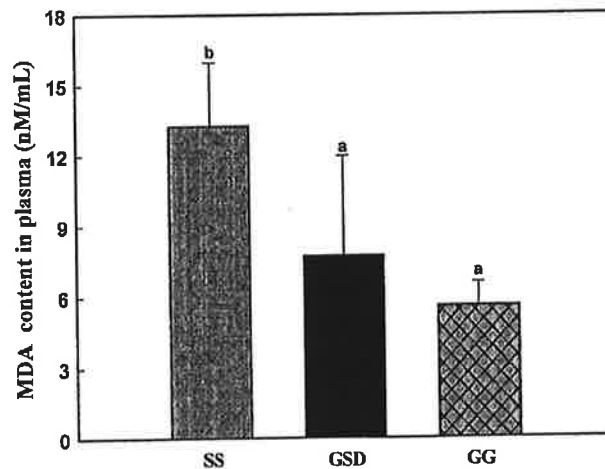


Fig. 59. Lipid peroxidation in plasma of rats fed diets containing glasswort and plant-derived salt.

SS, 3% 천일염 식이군; GSD, 2% 천일염과 2% 합초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 천일염과 2% 합초식물소금 식이군.

(8) 간에서의 단백질 산화 화합물 함량

또한 두 식물소금(GSD, GG) 식이가 간조직에서 산화적 스트레스(oxidative stress)로부터 생성되는 단백질 산화 화합물(PCOs)의 함량을 조사한 결과 (Fig. 58), 천일염식이군(SS)의 PCOs 함량이 가장 높게 나타났다. GSD식이군과 GG식이군은 SS식이군에 비해 유의적으로 낮은 PCOs 함량을 보여 혈중 지질과산화물의 조사 결과와 유사한 결과를 얻었다. 두 식물소금식이군 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 GSD식이군이 GG식이군보다 더욱 낮은 PCOs 함량을 보였다. 두 식물소금은 소금섭취로부터 오는 산화적 스트레스로 인해 간조직의 구성성분인 단백질의 산화를 줄여 주는 것으로 보인다. 특히 GG는 혈중 지질과산화물 생성 억제에, GSD는 간조직에서 단백질 산화 억제에 더 효과가 있는 것으로 시사되었다. 그러므로 두 식물소금 섭취는 체내에서 산화적 스트레스를 줄이는데 매우 유용 식품소재로 개발이 가능할 것으로 기대된다.

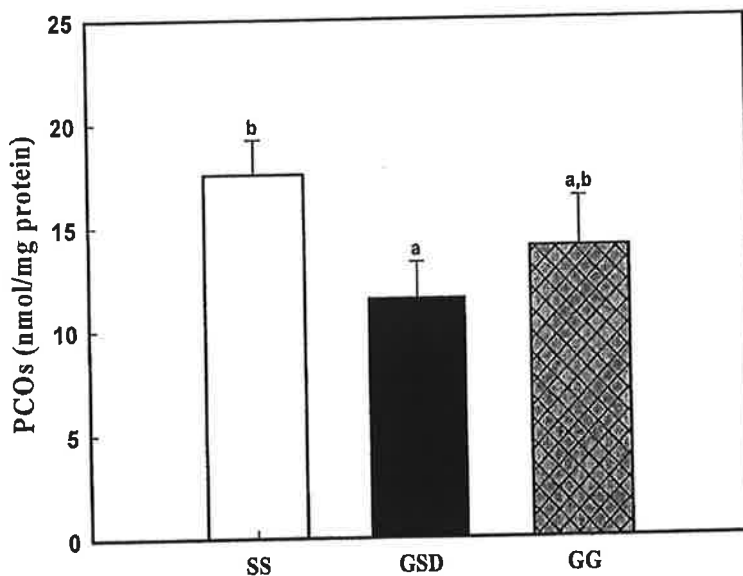


Fig. 60. PCOs in liver of rats fed diets containing glasswort and plant-derived salt. SS, 3% 천일염 식이군; GSD, 2% 천일염과 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 천일염과 2% 함초식물소금 식이군.

### 9) 지방조직에서 pIRS1<sup>ser307</sup>의 발현량

체내에서 산화적 스트레스에 발현하는 TNF $\alpha$ 와 인슐린신호전달는 상호 밀접한 관계를 갖고 있다고 보고되고 있다(Fig. 61). 특히 TNF $\alpha$ 에서의 NF-kB와 PPAR $\gamma$ 는 insulin receptor substrate-1 (IRS-1)의 인산화를 증가시키고 이로 인해 PI3-kinase 발현을 줄이고 IRS-1의 불활성을 유도할 뿐만 아니라 NF-kB와 PPAR $\gamma$ 에 의한 인슐린의 작용으로 발현되는 GLUT4를 저해함으로써 인슐린 신호전달을 저해하여 인슐린 저항성을 유발시킨다고 알려져 있다. 그래서 함초소금(GSD, GG)을 식이한 염 민감쥐의 지방조직에서 IRS-1의 인산화에 관여하는 효소 pIRS1<sup>Ser307</sup>의 발현량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 62), pIRS1<sup>Ser307</sup>의 발현량은 함초소금들(GSD, GG)을 식이한 염 민감쥐의 지방조직에서 GSD 식이군과 GG 식이군이 SS식이군보다 낮게 나타났다. 이는 함초소금들(GG, GSD)이 염 민감쥐에서 인슐린 신호전달에 negative 조절 인자인 pIRS1<sup>Ser307</sup>의 발현을 저해함으로써 인슐린 신호전달 개선에 효과가 있는 것으로 시사되었다. 앞서 언급한 바와 같이 함초소금들의 식이는 혈중에서의 지질과산화물 생성량이 적었고 간에서도 단백질 산화생성물 함량이 낮았을 뿐만 아니라 pIRS1<sup>Ser307</sup>의 발현량이 낮게 측정됨에 따라 이들과 관련된 산화적 스트레스에 발현하는 TNF $\alpha$  경로에도 긍정적인 영향을 주었을 것으로 시사되었다. 그래서 지방조직에서 NF-kB 등의 TNF $\alpha$ 에 관련된 인자들의 발현량에 대한 연구는 현재 진행 중에 있다.

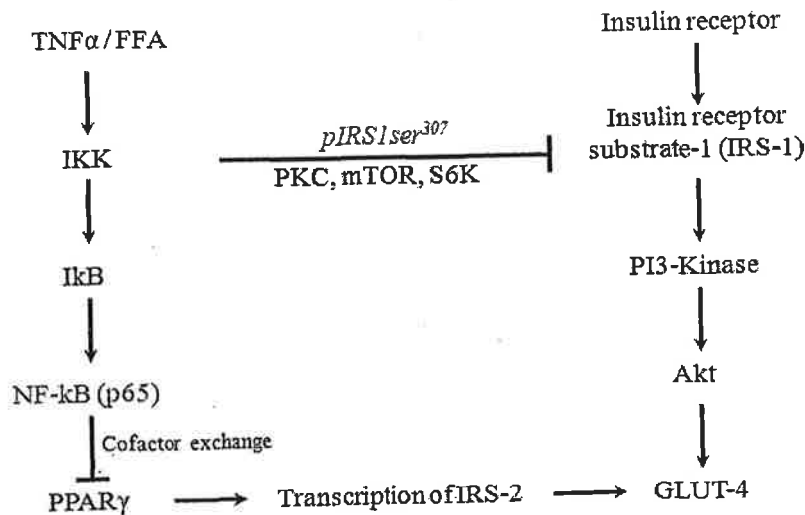


Fig. 61. Schematic shows mechanisms of TNF/FFA-mediated inhibition of insulin signaling pathway.

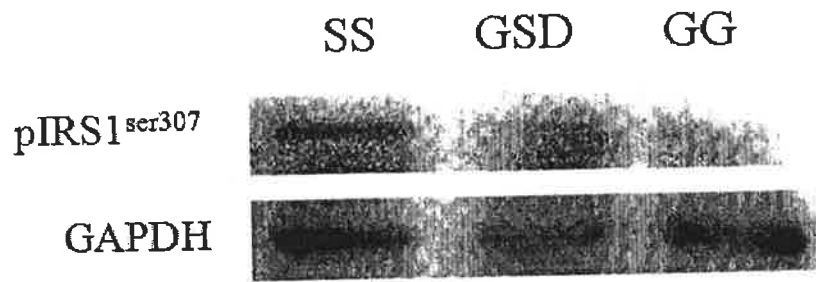


Fig. 62. Protein expressions level of pIRS1<sup>ser307</sup> in adipose tissue by western blotting analysis.

SS, 3% 천일염 식이군; GSD, 2% 천일염과 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 천일염과 2% 함초식물소금 식이군.

#### 10) Metabolic profiling

성공적으로 인간 게놈 지도가 완성된 이후 수명연장과 질병극복을 위해 genomics와 proteomics를 활용한 연구가 꾸준히 진행되고 있지만 이들만으로는 질병에 관한 정보를 충분하게 제공할 수 없어서 새롭게 도입된 것이 대사과정에 생성되는 분자량 1000-1500 미만의 저분자물질인 대사체(metabolite)를 분석하고 연구하는 대사체학(metabolomics)이 활발히 진행되고 있다. 또한 대사체는 생체내에 1000-3000 개 정도 존재하는 것을 알려져 있으며 질병과 같은 표현형에 직접적으로 관여하는 것을 알려졌다. 그래서 함초소금(GSD, GG)을 식이한 염 민감쥐의 각 조직에서 대사체에 미치는 영향을 알아보고자, 혈장과 뇨에 대하여 UPLC-Q-TOF MS 분석을 행한 다음 PLS-DA score plot, PLS-DA loading plot, 그리고 S-plot 등의 다변량 통계분석을 실시하였다. 그 결과(Fig. 63), 혈장의 경우 GG 식이과 GSD 식이군은 유사하였으며 SS 식이군 간의 차이가 관찰되었다. 즉 GG 식이군과 GSD 식이군은 유사한 대사물질들을 분비하고 있었고 SS식이군과 다른 대사물질들이 분비되고 있음을 알 수 있었다. 또한 뇨의 경우 각 식이군들 간의 차이가 관찰되어 식이군에 따른 분비되는 대사물질들이 다르다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 64). 현재 각 식이군에서 특이적으로 검출된 대사물질들을 구명 중에 있다.

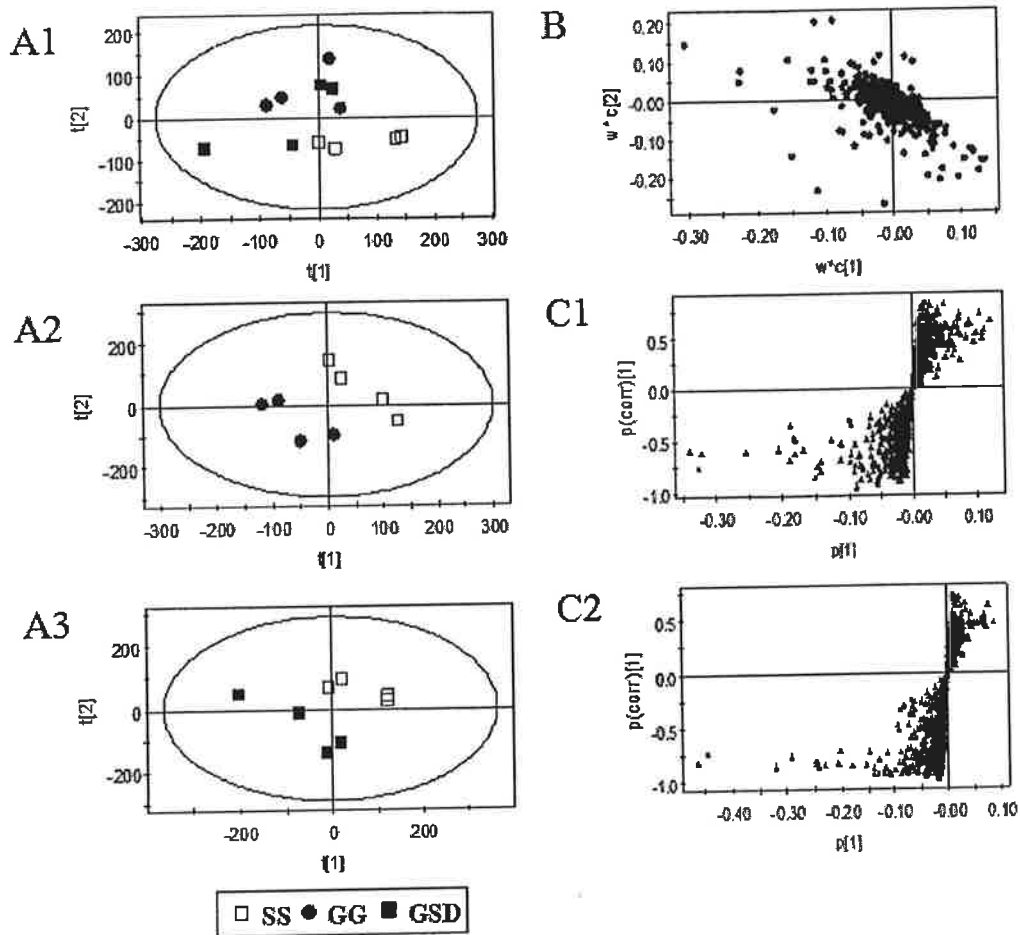


Fig. 63. PLS-DA score plot (A), PLS-DA loading plot (B) and S-plot (C) of UPLC-Q-TOF MS data set of metabolites in plasma of rats fed diets containing **glasswort and plant-derived salt**

SS, 3% 천일염 식이군; GSD, 2% 천일염과 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 천일염과 2% 함초식물소금 식이군.

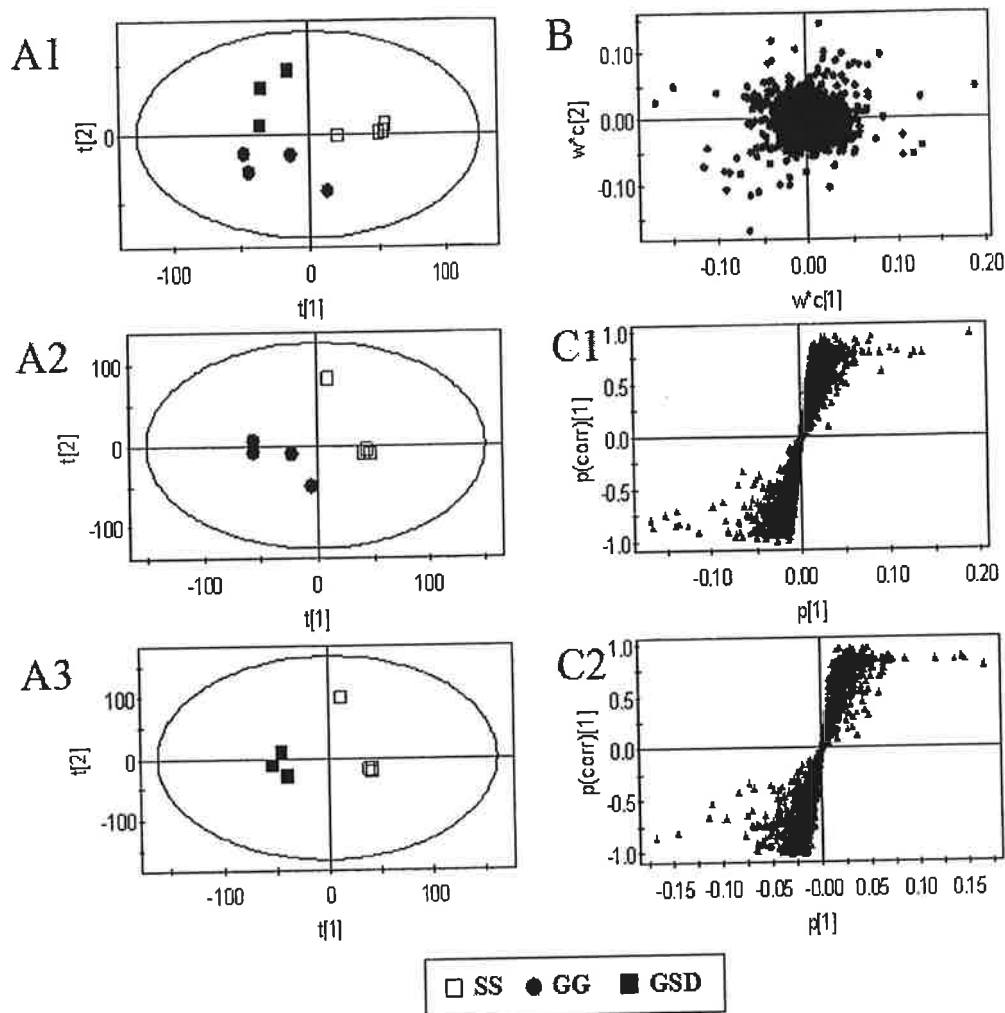


Fig. 64. PLS-DA score plot (A), PLS-DA loading plot (B) and S-plot (C) of UPLC-Q-TOF MS data set of metabolites in urine of rats fed diets containing 3% of solar salt

SS, 3% 천일염 식이군; GSD, 2% 천일염과 2% 함초고압열수분무소금 식이군; GG, 2% 천일염과 2% 함초식물소금 식이군.

이상의 결과를 종합해 보면, 함초를 이용하여 제조된 함초소금(GSD)과 함초와 건강기능성이 우수한 식물자원과 혼합하여 제조한 함초식물소금(GG)의 식이가 소금 섭취로 인해 자발적으로 혈압이 상승하는 염 민감쥐인 Dahl salt-sensitive rat에서 혈압 상승 억제 효과를 나타냈다. 특히 함초와 건강기능성이 우수한 식물자원을 혼합하여 제조한 함초식물소금(GG)은 식이기간 동안 소금섭취로 인해 염 민감쥐의 혈압이 상승하여야함에도 불구하고 식이 전과 거의 유사한 수축기와 이완기 혈압을 나타냈다. 또한 두 함초소금들은 천일염(SS)에 비해 낮은 ACE 저해 활성을 보였으며 NO 생성량을 증가시켜 혈압을 낮추는데 관여하는 VEGF의 발현량이 높이고, myosin phosphatase를 저해하여 혈관긴장도(vascular tone)를 높여 혈압을 상승시키는데 관여하는 RhoA 발현량이 낮추어 혈압 상승을 억제하는 것으로 나타났다. 그에 더하여 이들 함초소금은 혈중의 지질과산화물과 간에서의 단백질 산화물의 함량이 낮아 과다 소금섭취로부터 오는 산화적 스트레스를 줄여 준 것으로 나타났다. 그러므로 함초를 이용한 함초소금(GSD)과 함초에 건강기능성이 우수한 생물자원과 혼합하여 제조된 함초식물소금(GG)은 혈압상승을 억제하고 체내에서 산화적 스트레스를 줄이는 식품소재로 개발이 가능할 것으로 기대된다.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1. 합초소금의 제조 기술 확립 및 이들 응용제품 개발	100	합초고압열수추출물을 이용한 합초소금 제조의 제조기술을 확립하고 이를 이용한 합초고압열수추출소금원단을 제조하였고 건합초를 초미세 혹은 미세화하여 합초미세분말원단 및 합초초미세분말원단을 제조하였음.
2. 혈압 상승 억제에 효과가 있는 천연자원을 이용한 식물소금의 제조 방법 확립	100	합초와 ACE 저해 활성 등의 생리활성이 우수한 2종의 생물소재를 혼합한 합초식물소금들을 제조하였음.
3. 제조된 합초소금, 응용제품, 그리고 식물소금들의 이화학적 특성, 기능성성분, 그리고 생리활성 평가	100	합초소금제품들을 대상으로 염도, pH, ORP, 그리고 색도 등의 이화학적 특성을 조사하고, 총페놀성화합물함량과 caffeic acid 함량 등의 기능성 성분을 분석한 다음, ACE 저해 활성, $\alpha$ -glucosidase 저해 활성, 항산화 활성 등의 생리활성을 평가하여 건강기능성이 우수한 합초식물소금들을 선별하였음.
4. 선발된 합초식물소금들이 혈압 상승 억제 작용에 미치는 영향	100	합초소금(GSD)과 식물소금(GG)은 소금 섭취로 인해 자발적으로 혈압이 상승하는 염민감쥐인 Salt-sensitive Dahl rat에서 혈압 상승 억제 효과를 나타냈음. 또한 천일염(SS)에 비해 낮은 ACE 저해 활성을 보였으며 VEGF의 발현량이 높고 RhoA 발현량이 낮춤. 이와 더불어 혈중의 지질과산화물과 간에서의 단백질 산화물의 함량이 낮아 과다 소금섭취로부터 오는 산화적 스트레스를 줄여 줄 것으로 판단되었음.
5. 선발된 합초식물소금들이 인슐린 작용에 미치는 영향	100	합초식물소금들은 db/db mice에 혈당 등을 낮추는 항당뇨 효과는 관찰되지 않았으나 혈중 당화혈색소 형성을 억제하는 당뇨 합병증 예방을 보였으며 지질과산화물 생성 억제 등의 산화적 손상을 적게 주고 신장, 간, 지방 등의 조직 기능에 긍정적인 영향을 준 것으로 판단되었음.
6. 합초소금 혹은 식물소금 제품의 생산 공정 표준화	90	합초소금과 식물소금은 과다 소금섭취로부터 오는 혈압 상승을 강하게 억제하고 체내에서 산화적 스트레스를 줄이는 효과가 높아 산업화 가능성을 나타내 이 소금들을 공장규모에서 대량생산 및 표준화를 추진 중에 있음.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

#### ○ 사업화

- 사업화명: 함초분말소금원단 및 함초식물소금
- 제품명: 함초분말제품
- 업체명: (주)태평소금
- 고용창출인원: 1명
- 당해연도 매출액: 30백만원
- 사업화형태: 기존업체에서 상품화

### 2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

#### ○ 연구인력활용

- 인력양성명: 천일염이 염민감취 및 정상취에서 혈압 및 인슐린 저항성에 미치는 영향
- 인력양성년도: 2009년
- 인력양성대상수: 2명

### 3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

#### ○ 국내 및 국제학술발표

1. 박선영, 조정용, 신미정, 방미애, 조재우, 이강덕, 함경식. (2009) 함초 고압열수추출물 및 일반열수추출물의 생리활성 평가. 한국식품영양학회. P8-121
2. 이강덕, 조재우, 조정용, 박선영, 함경식. (2010) 추출조건에 따른 함초열수추출물의 생리활성 및 유용성분 비교. 한국식품과학회. P09-017

#### ○ 국외논문

- 염민감취에서 함초식물소금들의 혈압 상승 억제 효과, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 투고예정

#### ○ 특허

- 혈압상승 억제 효과를 갖는 식물소금들의 제조 방법 및 제품, 대한민국/외국, 출원예정

### 4. 추가연구, 타 연구에 활용 계획 등

#### ○ 전시회 등 참여

### 1. 전시회

- 행사명칭: The 9th International Symposium on Salt
- 전시품목: 함초분말
- 장소: 중국 베이징
- 주최기관: 중국염업총공사
- 활용년도: 2009년

### 2. 전시회

- 행사명칭: 2009 광주국제식품전
- 전시품목: 함초분말, 천일염, 토판소금, 함초소금, 해조금
- 장소: 김대중컨벤션센터
- 주최기관: 광주광역시
- 활용년도 2009년

### 3. 박람회

- 행사명칭: 2010 국제소금박람회
- 전시품목: 함초분말, 천일염, 토판소금, 함초소금, 해조금
- 장소: 김대중컨벤션센터
- 주최기관: 광주광역시
- 활용년도 2010년

## 제 6 장 참고문헌

- Anca D. Dobrian, Suzanne D. Schriver, Terrie Lynch, and Russell L. Prewitt. (2003). Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F619-F628
- Anees AB, Abdul BM, Fatima RF, Mustafa L. (2007). Mechanisms of Oxidative Stress-Induced Increase in Salt Sensitivity and Development of Hypertension in Sprague-Dawley Rats. *Hypertension*. 49:664-671.
- Bang MH, Kim HA, Cho YJ. Hypoglycemic and antioxidant effect of dietary hamcho in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 2002, 31, 840-846.
- Barbagallo, M., Gupta, R.K., Resnick, L.M., (1996). Cellular ions in NIDDM: relation of

- calcium to hyperglycemia and cardiac mass. *Diabetes Care* 19, 1393-1398.
- Beswick RA, Zhang H, Marable D, Catravas JD, Hill WD, Webb RC. (2001). Long-term antioxidant administration attenuates mineralocorticoid hypertension and renal inflammatory response. *Hypertension*. 37:781-786.
- Brasier AR, Li J. (1996). Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension*. 27:465-75.
- Bruno Sontia, Rhian M. Touyz. (2007). Role of magnesium in hypertension. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 458: 33-39.
- Cheng ZJ, Vaskonen T, Tikkanen I, Nurminen K, Ruskoaho H, Vapaatalo H, Muller D, Park JK, Luft FC, and Mervaala EM. (2001). Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Hypertension* 37: 433-439.
- Chung YC, Chun HK, Yang JY, Kim JY, Han EH, Kho YH, Jeong HG. Tungtungmadic acid, a novel antioxidant, from *Salicornia herbacea*. *Arch. Pharm. Res.*, 2005,28, 1122-1126.
- DeFronzo, R. A. and Ferrannini, E. (1991). Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 14(3)173-94.
- DeFronzo, R. A., Gunnarsson, R., Bjorkman, O., Olsson, M. And Wahren, J. (1985). Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 76(1):149-155.
- DeFronzo, R. A., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahern, J. and Felber, J. P. (1981). The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*.30(12):1000-1007.
- Douillette A, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, et al. (2006). The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the I $\kappa$ B kinase complex. *J Biol Chem*. 281:13275-84.
- Ferri, C., Bellini, C., Desideri, G., Di Francesco, L., De Mattia, G., Santucci, A., Balsano, F., 1994. Salt-sensitivity is associated with a hyperinsulinaemic and hyperglycaemic response to atrial natriuretic peptide infusion in human essential hypertension. *Diabetologia* 37, 308-312.

- Fuenmayor, N., Moreira, E., Cubeddu, L.X., 1998. Salt sensitivity is associated with insulin resistance in essential hypertension. *Am J Hypertens* 11, 397-402.
- Fujita, T., Henry, W.L., Bartter, F.C., Lake, C.R., Delea, C.S., 1980. Factors influencing blood pressure in salt-sensitive patients with hypertension. *Am J Med* 69, 334-344.
- Fung TT, Manson JE, Solomon CG, Liu S, Willett WC, Hu FB. (2003). The association between magnesium intake and fasting insulin concentration in healthy middle-aged women. *J Am Coll Nutr.* 22(6):533-8.
- Galletti, F., Strazzullo, P., Ferrara, I., Annuzzi, G., Rivellese, A.A., Gatto, S., Mancini, M., 1997. NaCl sensitivity of essential hypertensive patients is related to insulin resistance. *J Hypertens* 15, 1485-1491.
- Gao TC, Ekkapon L, Feng LY, Bang MA, Cho JY, Ham KS. Chronic effects of various salts on oxidative stress in rats. 9th International Symposium, pp. 1345-1347, Beijing, China, 2009.
- Gao TC, Feng LY, Choi JK, Cho JY, Ham KS. Chronic effects of roasted salt and purple bamboo salts on oxidative stress in Sprague-Dawley rats. *Bioconvergence for Food Innovation/한국식품과학회*, p11-214, 2010. 06.
- Goldstein BJ. (2003). Insulin resistance: from benign to type 2 diabetes mellitus. *Rev Cardiovasc Med* 4 Suppl. 2003; 6: S3-10,
- Ha JA, Lee SH, Kim HJ, Lee JY. The role of *Salicornia herbacea* in ovariectomy-induced oxidative stress. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, 29, 1305-1309.
- Ham KS, Ekkapon L, Gao TC, Bang MA, Cho JY. Effects of mineral-rich solar salt on blood pressure and insulin resistance in rats. 9th International Symposium, pp. 1312-1313, Beijing, China, 2009
- Hayakawa H, Coffee K, and Raj L. (1997). Endothelial dysfunction and cardiorenal injury in experimental salt-sensitive hypertension: effects of antihypertensive therapy. *Circulation* 96: 2407-2413.
- Hwang YP, Yun HJ, Chun HK, Chung YC, Kim HK, Jeong MH, Yoon TR, Jeong HG. Protective mechanisms of 4-caffeoyl, 4-dihydrocaffeoyl quinic acid from *Salicornia herbacea* against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions.* 2009, 181, 366-376.
- Im SA, Kim KJ, Lee CK. Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea*. *Int. Immunopharmacol.* 2006, 6, 1451-1458.

- Im SA, Lee YR, Lee YH, Oh ST, Gerelchuluum T, Kim BH, Kim YS, Yun YP, Song SG, Lee CK. Synergistic activation of monocytes by polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea* and interferon- $\gamma$ . *J. Ethnopharmacol.* 2007,111,365-370.
- Jang HS, Kim KR, Choi SW, Woo MH, Choi JH. Antioxidant and antithrombus activities of enzyme-treated *Salicornia herbacea* extracts. *Ann. Nutr. Metab.* 2007, 51, 119-125.
- Jo YC, Ahn JH, Chon SM, Lee KS, Bae TJ, Kang DS. Studies on pharmacological effects of glasswort (*Salicornia herbacea* L.). *Korean J. Med.Corp Sci.* 2002,10,9 3-99.
- Joffres, M., Reed, D., Yano, K., (1987). Relationship of magnesium intake and dietary factors to blood pressure: the Honolulu heart study. *Am. J. Clin. Nutr.* 45, 459-475.
- Kelley, D., Mitrakou, A., Marsh, H., Schwenk, F., Benn, J., Sonnenberg, G., Arcangeli, M., Aoki, T., Sorensen, J., Berger, M. and et al. Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. *J Clin. Invest.* 1988; 81(5):1563-1571.
- Kim CS, Song TG. Ecological studies on the halophyte communities at western and southern coasts in Korea. *Korean J. Ecol.* 1983, 6, 167-176.
- Kong CS, Kim JA, Qian ZJ, Kim YA, Lee JI, Kim SK, Nam TJ, Seo YW. Protective effect of isorhamnetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea* against oxidation-induced cell damage. *Food Chem. Taxicol.* 2009, 47, 1914-1920.
- Kong CS, Kim YA, Kim MM, Park JS, Kim JA, Kim SK, Lee BJ, Nam YW. Flavonoid glycosides isolated from *Salicornia herbacea* inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells. *Toxicology in Vitro* 2008, 22, 1742-1748.
- Lee JT, Jeong YS, An BJ. Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials. *Korean J. Herbol.* 2002,17, 61-69.
- Lee KY, Lee MH, Chang IY, Yoon SP, Lim DY, Jeon YJ. Macrophage activation by polysaccharide fraction isolated from *Salicornia herbacea*. *J. Ethnopharm.* 2006, 103, 372-378.
- Lee YS, Lee SH, Kim BK, Oguchi K, Shin KH. Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O- $\beta$ -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Biol. Pharm. Bull.* 2005,

28, 916-918.

- Lee, Y. S.; Lee, H. S.; Shin, K. H.; Kim, B. K.; Lee, S. H. Constituents of the halophyte *Salicornia herbaceae*. Arch. Pharm. Res. 2004, 27, 1034-1036.
- Lind, L., Lithell, H., Gustafsson, I.B., Pollare, T., Ljunghall, S., 1992. Metabolic cardiovascular risk factors and sodium sensitivity in hypertensive subjects. Am J Hypertens 5, 502-505.
- Los M, Droge W, Stricker K, et al. Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. Eur J Immunol. 1995;25:159-65.
- Luscher TF, Raij L, and Vanhoutte PM. (1987). Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. Hypertension 9: 157-163.
- Macherio, A., Rimm, B.B., Giovannucci, E.L., et al., (1992). A prospective study of nutritional factors and hypertension among US men. Circulation 88, 1475-1484.
- Manchester, J. K., Chi, M. M., Carter, J. G., Pusateri, M. E., McDougal, D. B. and Lowry, O. H. (1990). Measurement of 2-deoxyglucose and 2-deoxyglucose 6-phosphate in tissues, Anal Biochem. 185:118-124.
- Maria AA, Elena V, Cruz G, Maria DP, Jorge LA, Maria PN, Jaime A. (2005). Proinflammatory Liver and Antiinflammatory Intestinal Mediators Involved in Portal Hypertensive Rats. Mediators of Inflammation. 2005;2: 101-111
- Mario Barbagallo, Ligia J. Dominguez, Antonio Galioto, Anna Ferlisi, Calogero Cani, Lorian Malfa, Antonella Pineo, Adele Busardo, Giuseppe Paolisso. (2003). Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. Molecular Aspects of Medicine 24: 39-52
- Mario Barbagallo, Ligia J. Dominguez. (2007). Magnesium metabolism in type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and insulin resistance. Archives of Biochemistry and Biophysics 458: 40-47
- Michel R Joffres, MD, P/iD, Dwayne M Reed, MD, PhD, and Katsuhiko Yano, MD. (1987). Relationship of magnesium intake and other dietary factors to blood pressure: the Honolulu heart study. Am J Clin Nuts. 145:469-75.
- Min JG, Lee DS, Kim TJ, Park J H, Cho TY, Park DI, Chemical composition of *Salicornia herbacea* L. J. Food Sci. Nutr. 2002, 7, 105-107.
- National Research Council. (1989). Diet and Health: Implication for Reducing Chornic Disease Risk. National Academy Press, Washington DC. USA. pp.55-58

- Nava M, Quiroz Y, Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. (2003). Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol, Renal Physiol.* 284:447-54.
- Nishida Y, Ding J, Zhou MS, Chen QH, Murakami H, Wu XZ, and Kosaka H. (1998). Role of nitric oxide in vascular hyperresponsiveness to norepinephrine in hypertensive Dahl rats. *J Hypertens* 16: 1611-1618.
- Nosratola D Vaziri (2008). Causal Link Between Oxidative Stress, Inflammation, and Hypertension. *Iranian Journal of Kidney Diseases; Issue: 1; pp: 1-10; Vol: 2.*
- Ogihara T, Asano T, Fujita T. (2003). Contribution of salt intake to insulin resistance associated with hypertension. *Life Science.* 2003 Jun 20;73(5):509-23.
- Ogihara T, Asano T, Katagiri H, Sakoda M, Anai N, Shojima H, Ono M, Fujishiro A, Kushiya Y, Fukushima M, Kikuchi N, Noguchi H, Aburatani Y, Gotoh I, Komuro T, Fujita T. (2004). Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor- $\kappa$ B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetologia.* 47:794-805.
- Paolisso, G., Barbagallo, M., (1997). Hypertension, diabetes mellitus, and insulin resistance: the role of intracellular magnesium. *Am. J. Hypertens.* 10, 346-355.
- Park SH, Kim KS. Isolation and identification of antioxidant flavonoids from *Salicornia herbacea* L. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 2004, 47, 120-123.
- Park SH, Ko SK, Choi JG, Chung SH. *Salicornia herbacea* prevents high fat diet-induced hyperglycemia and hyperlipidemia in ICR mice. *Arch. Pharm. Res.* 2006, 29, 256-264.
- Pavel H, Zdenka Pa, Pierre Dumas, Yu Lin Sun, Johanne Tremblay, Michal Pravenec, Jaroslav Kunes, Drahomira Krenova, and Vladimir Kren. (1998). Newborn and adult recombinant inbred strains: A tool to search for genetic determinants of target organ damage in hypertension. *Kidney International, Vol. 53, pp. 1488-1492.*
- Pittner, R. A., Wolfe-Lopez, D., Young, A. A. and Rink, T. (1995). Anylin and epinephrine have no direct effect on glucose transport in isolated rat soleus muscle. *FEBS Lett.* 365:98-100.
- RA Jan, S Shah, SM Saleem, A Waheed, S Mufti, MA Lone, M Ashraf. (2006). Sodium and Potassium Excretion in Normotensive and Hypertensive Population in Kashmir. *Journal of Association of Physicians of India* ISSN 0004-5772.



- RA Jan, S Shah, SM Saleem, A Waheed, S Mufti, MA Lone, M Ashraf. (2006). Sodium and Potassium Excretion in Normotensive and Hypertensive Population in Kashmir, *J Assoc Physicians India*. 54:22-6.
- Ray, P. E., Suga, S. I., Liu, X. H. Johnson, R. J. (1983). Chronic potassium depletion induces renal injury, salt sensitivity, and hypertension in young rats. *Kidney Int*. 59:1850-1862.
- Reaven, G. M. Banting lecture (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*.; 37(12):1595-607.
- Resnick, L. M., J. Laragh, J. E. Sealey, M. Alderman. (1983). Divalent cations in essential hypertension. Relations between serum ionized calcium, magnesium, and plasma renin activity. *N. Engl. J. Med*. 309:888-891.
- Reznick, A. Z., & Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233, 357-363.
- Rodríguez-Iturbe B, Zhan CD, Quiroz Y, Sindhu RK, Vaziri ND. (2003). Antioxidant-rich diet improves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 41:341-6.
- Saad MF, Lillioja S, Nyomba BL, (1991). Racial differences in the relation between blood pressure and insulin resistance, *New Engl. Med*. 324: 733-739.
- Saoraya C, Gao TC, Choi JK, Cho JY, Ham KS. Effects of mineral-rich solar salt on insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. *Bioconvergence for Food Innovation*, p11-220, 2010. 06.
- Sasson, S., Oron, R. and Cerasi, E. (1993). Enzymatic assay of 2-deoxyglucose 6-phosphate for assessing hexose uptake rats in cultured cell. *Anal Biochem*. 215:309-311.
- Seifollah Bahramikia, Amin Ardestani, Raziieh Yazdanparast. (2009). Protective effects of four Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation. *Food Chemistry* 115: 37-42
- Sen CK. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc*. 33:368-70.
- Sharma, A.M., Ruland, K., Spies, K.P., Distler, A., 1991. Salt sensitivity in young normotensive subjects is associated with a hyperinsulinemic response to oral glucose. *J Hypertens* 9, 329-335.

- Shin HY, Lee EH, Kim CY, Shin TY, Kim SD, Song YS, Lee KN, Hong SH, Kim HM. Anti-inflammatory activity of Korean folk medicine purple bamboo salt. *immunopharmacol immunotoxicol*, 25, 377-384, 2003.
- Squadrito GL and Pryor WA. (1995). The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. *Chem Biol Interact* 96: 203-206.
- Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. (1995). In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Hydroethidine microfluorography. Hypertension*. 25:1083-1089.
- Swei A, Lacy F, Delano FA, Parks DA, Schmid-Schonbein GW. (1999). A mechanism of oxygen free radical production in the Dahl hypertensive rat. *Microcirculation*. 6:179 -187.
- Swei A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. (1997). Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension*. 30:1628-1633.
- T. W. Balon, J. L. Gu, Y. Tokuyama, A. P. Jasman and J. L. Nadler. (1995). Magnesium supplementation reduces development of diabetes in a rat model of spontaneous NIDDM. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 269: E745-E752.
- Takaya J, Higashino H, Kobayashi Y. (2004). Intracellular magnesium and insulin resistance. *Magnes Res*. 126-36.
- Takehide Ogihara, Tomoichiro Asano, Toshiro Fujita. (2003). Contribution of salt intake to insulin resistance associated with hypertension. *Life Sciences* 73: 509-523.
- Tannenm, D. H. (1983). Effects of potassium on blood pressure control. *Ann. Int. Med*. 98:1850-1856.
- Trolliet MR, Rudd MA, and Loscalzo J. (2001). Oxidative stress and renal dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Kidney Blood Press Res* 24: 116-123.
- Trolliet MR, Rudd MA, Loscalzo J. (2001). Oxidative stress and renal dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Kidney Blood Press Res*. 24:116 -123.
- Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, Kinugawa S, Suematsu N, Utsumi H, and Takeshita A. (2001). Effects of ACE inhibition on left ventricular failure and oxidative stress in Dahl salt-sensitive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 37: 725-733.
- Ueyama, A., Sato, T., Yoshida, H., Magata, K. and Koga, N. (2000). Nonradioisotope assay of glucose uptake activity in rat skeletal muscle using enzymatic measurement of 2-deoxyglucose 6-phosphate in vitro and in vivo. *Biol Signals*

Recept. 9:267-274.

Weinberger, H. M., Fineberg, N. S. (1991). Sodium and volumen sensitivity of blood pressure: Age and pressure change over time. Hypertension. 18:67-71.

Whelton PK, Klag MI. (1989) Magnesium and blood pressure: review of the epidemiologic and clinical trial experience. Am J Cardiol. 63:26G-30G.

Yamamoto, N., Sato, T., Kawasaki, K., Mutosaki, S. and Yamamoto, Y. (2006). A nonradioisotope, enzymatic assay for 2-deoxyglucose uptake in L6 skeletal muscle cells cultured in a 96-well microplate. Anal Biochem. 351:139-145.

이강덕, 박정옥, 최차란, 송현우, 윤수경, 양호철, 함경식. 전라남도 지역에서 생산된 천일염의 염도 및 중금속 함량, 한국식품영양과학회지, 36, 753-758, 2007.

조정용. 항당뇨 예방 효과를 갖는 가공소금개발, 지자체주도연구개발사업 천일염 및 염생식품 산업화 사업단 기술이전 설명회, 목포대학교, p. 5, 2009. 05.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.