최 종
연구보고서

GA0182-0010

곡류로부터 콜레스테롤 상승억제 기능소재의 개발 및 활용기술 연구

A study on development of hypocholesterolemic foodstuff from cereals

연구기관

한국식품개발연구원

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “곡류로부터 콜레스테롤 상승억제 기능소재의 개발 및 활용기술연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 10. 25

주관연구기관명: 한국식품개발연구원
총괄연구책임자: 하 태 열
연 구 원: 이 상 효
연 구 원: 금 준 석
연 구 원: 이 창 호
연 구 원: 김 성 수
연 구 원: 김 흥 만
연 구 원: 조 일 진
연 구 원: 박 성 희
연 구 원: 정 경 환
위탁연구기관명: 대구효성카톨릭대학
위탁연구책임자: 조 성 희

요 약 문

I. 제목: 곡류로부터 콜레스테롤 상승억제 기능소재의 개발 및 활용기술연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

혈중 콜레스테롤의 상승은 관상동맥질환 발생의 주요 risk factor 의 하나로 알려져 있으며 심혈관계 질환의 예방 및 치료를 위해서는 혈중 콜레스테롤을 억제하는 것이 무엇보다 중요하다. 그러나 지금까지 개발된 콜레스테롤합성 저해제는 주로 미생물이나 화학합성에 의한 약물로서 효과의 미약성과 부작용 등이 문제시되고 있어 천연물을 대상으로 한 연구개발이 요구되고 있다. 역학조사결과 곡류를 다량 섭취한 사람은 그렇지 못한 사람에 비하여 심장병환자가 감소하였다고 보고되어 있고 최근의 연구결과에 의하면 보리, 메밀, 수수, 율무 등과 같은 곡류에서는 tocotrienol, rutin을 비롯한 phenolic compound가 다량 함유되어 있다. 그러나 곡류 및 잡곡류에서 콜레스테롤 생합성저해물질에 대한 보고만 산발적으로 되어 있을 뿐 체계적 연구 및 건강편의 식품으로서의 개발은 거의 전무한 실정이다. 따라서 이러한 곡류의 기능특성을 구명하고 콜레스테롤 상승억제 기능성 식품이 개발된다면 계속 감소추세에 있는 곡류의 년간 생산량은 크게 증가하여 곡류가 새로운 고소득 작물로 보급, 정착되어 식량안보차원에서도 기여할 것은 물론 곡류의 섭취증가로 국민건강에도 크게 이바지 할 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. *in vitro*계에 있어서 콜레스테롤 상승억제 활성 검색계 확립 및 활성검색
2. 고활성추출물의 *in vivo*에서의 효능검정
3. 고활성 곡류의 가공적성 구명 및 제품개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. *in vitro*계서 다양한 곡류의 콜레스테롤 상승억제 활성을 검색하기 위하여 콜레스테롤 생합성 경로의 율속효소인 HMG-CoA reductase억제활성을 측정 할 수 있는 검색계를 확립하였으며 확립된 검색계를 이용하여 곡류 물 추출물 및 메탄올 추출물의 HMG-CoA reductase억제활성을 검색하였다. 그 중 활성이 높았던 수수, 흑미, 기장을 선별하여 극성이 다른 용매로 순차용매분획하여 활성을 측정한 결과 헥산획분에서 강한 활성을 나타내었다. 또한 고활성획분의 열안정성을 비롯한 활성획분의 특성 등을 검토하였고, 이들 고활성 곡류추출물 및 용매 분획물이 배양세포계에서의 콜레스테롤 함량에 미치는 영향을 검토하였다.

2. 고활성 곡류추출물의 *in vivo*에서의 효능검정

in vitro에서 HMG-CoA reductase 저해 활성을 보였던 수수, 흑미, 기장시료의 생체내 콜레스테롤 및 지질대사에 미치는 영향을 검토하고자 고콜레스테롤 식이 및 고지방식이모델을 이용하여 추출물 및 분말 또는 주성분을 급여하여 사육한 뒤 혈청 및 간장의 지질함량과 관련 효소활성, 분변으로의 배설량 등을 조사하였다. 그 결과 특히 기장과 흑미의 첨가는 혈청 및 간장의 지질함량을 현저하게 감소시키는 효과가 있었다. 그 작용기전으로서는 곡류의 성분이 간조직중의 HMG-CoA reductase와 G6PDH, malic enzyme의 활성을 저해하여 콜레스테롤과 지방산의 합성을 저해하고 변중의 담즙산 배설량을 증가시키는 데 기인한 것으로 나타났다.

3. 고활성 곡류의 가공특성 및 제품개발

활성이 높았던 곡류의 호화특성등 가공특성을 조사하였고 수수를 이용한 머핀을 검토한 결과 수수의 기능성, 조직감, 기호도등 머핀의 품질특성 측면에서 볼 때 수수가루 20% 정도는 첨가가능하였다. 또한 흑미를 이용하여 추출조건, 배합비, 기호도 조사등을 검토하여 흑미음료제품을 개발하였다.

SUMMARY

I. Title

A study on development of hypocholesterolemic foodstuff from cereals

II. Objective and Signigficance of Research

Although the rate of mortality has been considerably reduced, heart disease still remains as the leading cause of death. Data from well known epidemiologic studies have confirmed that hypercholesterolemia is one of the risk factor for development of coronary heart disease. Most of studies in this area are preventive in nature and focused on lowering plasma cholesterol as well as triglyceride. The rate of hepatic cholesterogenesis is largely determined by the activity of HMG-CoA reducatse, which catalyzed the conversion of HMG-CoA to mevalonic acid. Epidemiological data indicate that population that consume diets rich in cereal grains tend to have a low incidence of cardiovascular disease. It is also well known that cereal grains contain various types of polyphenolic compounds such as tocotrienols, tannic acid and rutin. Cereals consumed in Korea are various in kinds and some of them have been reported to have hypocholesterolemic effects or not. But, it still remains to clarify the effect of cereal grains on lipid metabolim, and utilization of cereal grain as functional food is limited.

This study was performed to investigate effect of cereal grains on the activities for cholesterol biosynthesis, degradation and fatty acid synthesis in vitro and vivo, and to development the new processed food

III. Scope and Contents of Research

1. Screening of HMG-CoA reductase inhibitory activity from cereals (*in vitro*)
2. Effects of some cereals on lipid mitabolism (*in vivo*)
3. Examination of physicochemical characteristics of some cereals and development of processed food from cereals

IV. Results

1. Screening of HMG-CoA reductase inhibitory activity from cereals (*in vitro*)

A study was conducted to screen the inhibitory activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A(HMG-CoA) reductase, which is known to be rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis, from the extracts of 80% methanol and 70% ethanol of cereals. The strongest inhibitory activity was shown in the ethanol extract of sorghum among the ethanol extracts. The inhibitory activity of HMG-CoA reductase of prosomillilet methanol extract was 73%, and highest among the methanol extracts. The inhibitory activity of 44.7% was observed in sorghum methanol extract. The methanol extracts of prosomillet, sorghum and black rice were further fractionated with hexane, chloroform, ethylacetate, butanol and water. Hexan fraction of these cereal methanol had the strongest inhibitory activity among five fractions, and the inhibitory activity was increased compared to each crude methanol extracts. It was also investigated the effect of methanol extracts and five fraction of cereals on cholesterol contents in HepG2 cell.

2. Effects of some cereals on lipid metabolism (*in vivo*)

Effect of sorghum, black rice and prosomillet, which had strong inhibitory activity of HMG-CoA reductase *in vitro* on lipid metabolism in rats fed high cholesterol diets or high fat diets. Sorghum methanol extracts decreased serum total cholesterol and increased fecal bile acid excretion in rats fed high-cholesterol diets. Black rice decreased significantly liver total cholesterol and triglyceride in rats fed high-fat diets. Prosomillet decreased significantly plasma total cholesterol, triglyceride, liver triglyceride and increased fecal cholesterol excretion. It was also found that liver cytosolic malic enzyme and G6PDH acitivities decresed by addition of prosomillet. These results indicate that certain active components in some cereals other that dietary fiber have potential to exert hypolipidemic effects via regulating hepatic cholesterogenesis and lipogenesis.

3. Examination of physicochemical characteristics of some cereals and development of processed food from cereals

Gelatinization characteristics of some cereals were determined in terms of amylograph, gel consistency, WAI, WSI and viscoelasiticity. Black rice exhibited the lowest peak viscosity in Brabender amylograph among cereals tested, but gel consistency was significantly higher in black rice than the others.

Effect of addition of sorghum flour on the quality properties of wheat flour muffin were investigated. The sorghum flour addition at 10% level did not affect the volume of muffin, but the volume of muffin containing 30% sorghum flour was significantly decreased compared to that of control. Most of texture parameters such as hardness, adhesiveness,

gumminess and chewiness were not affected by the addition of sorghum flour up to 20% level. As results of sensory evaluation, appearance and flavor of muffins by addition of sorghum flour differed significantly from the control, but there were no differences among the muffins containing sorghum flour at 10, 20, and 30% levels. Texture of 10% sorghum flour muffin was similar to that of the control, but there was a significant difference in texture by 30% sorghum flour addition. However, taste and overall acceptability did not differ significantly up to 30% level.

It was also developed black rice beverage by examination of extraction condition, combination formula and sensory evaluation.

CONTENTS

B. Results and discussion

1) Body weight
2) Organ weights
3) Serum lipids
4) Serum GOT, GPT
5) Liver lipids
6) Fecal lipids and bile acid

3. Effect of prosomillet on lipid metabolism

o High-fat diet model

A. Materials and methods

1) Animals and diets
2) FER
3) Preparation of tissues for analysis
4) Analysis of lipids and enzymes

B. Results and discussion

1) Body weight, FER, liver weight
2) Serum lipids
3) Liver lipids
4) Liver HMG-CoA reductase activity
5) Liver cholesterol 7-α-hydroxylase activity
6) Liver Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity
7) Fecal lipids and bile acid

o High-cholesterol diet model

A. Materials and methods

1) Animals and diets
2) FER
3) Preparation of tissues for analysis
4) Analysis of lipids and enzymes

목 차

제 1장 서론

콜레스테롤은 세포막의 구성성분, 담즙산 및 호르몬의 전구체로서 생체내의 필수성분중의 하나이다. 그러나 혈중 콜레스테롤의 과다한 상승은 혈청 지질인자중 관상동맥질환의 제 1 위험인자로 알려져 있어 특히 서구에서는 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추기 위하여 영양교육에서 부터 약제개발에까지 다방면으로 노력해 왔으며 혈중 콜레스테롤 상승억제에 대한 관심이 집중되고 있다. 혈중 콜레스테롤의 농도는 크게 생체 내에서의 생합성과 분해의 두 과정에 의하여 조절되는데 그 중 생합성 과정이 더 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 콜레스테롤 생합성 과정중 HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A)로 부터 mevalonate로 전환시키는 효소인 HMG-CoA reductase는 cholesterol합성속도의 율속 효소이며 간장중 HMG-CoA reductase활성의 저하는 간장 LDL-receptor의 활성을 증가시켜 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시킨다고 보고되어 있다. 이와 동시에 고지혈증 개선제로서 콜레스테롤 합성저해제에 관한 연구가 다각적으로 연구되어 왔고 현재 시판되고 있는 compactin도 미생물균주로 부터 분리한 것으로 HMG-CoA reductase의 활성을 특이적으로 저해하며 이에 대한 자세한 연구가 계속되고 있다.

한편 근년의 역학조사에 의하면 곡류가 풍부한 식사를 섭취하는 사람들은 그렇지 못한 사람들에 비하여 심질환 발생율이 현저히 낮다고 보고되어 있고, 곡류 및 그 부산물이 체내 콜레스테롤 함량을 저하시키는 작용은 주로 식이섬유의 작용에 기인한다고 산발적으로 보고되어 왔다. 예를 들면 밀, 보리, 옥수수 외피, oat bran 등이 생체내 콜레스테롤 저하작용이 있는 것으로 보고되어 있으며 이는 식이섬유, 특히 hemicellulose를 비롯한 soluble dietary fiber의 작용에 기인하는 것으로 보고되어 있다. 보리에는 실험동물의 혈중 콜레스테롤 상승을 억제하는 강한 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 Qureshi등은 고단백질 보리에는 배유부에 존재하는 식이섬유, β-glucane

의 콜레스테롤 배설작용과는 다른 성분이 존재함을 밝혔고, 이러한 보리의 콜레스테롤 억제효과를 나타내는 주된 성분은 HMG-CoA reductase 활성을 억제하는 tocotrienol이라고 보고하고 있다. 또한 메밀이나 율무등에도 흰쥐 체내 콜레스테롤 함량을 감소시키는 작용이 있다고 보고되어 있다. 잡곡류에는 콜레스테롤 저하효과를 나타내는 성분으로서 종래부터 알려진 식이섬유 이외에도 다른 성분, 예를들면 phenolic compound와 같은 성분들이 다량함유 되어 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 곡류에는 콜레스테롤 저하효과의 물질이 존재할 가능성이 높으나 모두 실험동물을 이용한 효능검토 단계에서의 산발적 보고가 있을 뿐이며 이들의 작용기작에 관한 구명이나 제품화된 예는 없다. 따라서 본 연구에서는 곡류로부터 콜레스테롤 상승억제기능성 소재를 검토하고 이를 활용하는 기술개발을 그 목적으로 하였으며 주요 연구내용으로서는 *in vitro*에서의 콜레스테롤 상승억제 활성 검색계를 확립하고 다양한 곡류로부터 활성을 검색하여 그 특성을 확인하고 생체 내에서의 효능과 작용기작을 구명하고 활성이 높은 곡류를 중심으로 제품화하는 데 있다.

제 2장 *in vitro*계에서 콜레스테롤 상승억제 활성 검색계 확립 및 활성 검색

제 1절 *in vitro*계에서 콜레스테롤 상승억제 활성 검색계 확립

HMG-CoA reductase의 활성 측정은 일반적으로 isotope를 이용하고 있으나 본 연구에서는 많은 시료를 빠른 시간내에 일반실험실에서 편리하게 검색할 수 있도록 spectrophotpmetric assay법도 동시에 검토하였다. 따라서 enzyme의 활성을 높힐 수 있는 microsomal enzyme source의 조제방법을 검토하고 시료추출물의 용해에 따른 용매의 영향도 검토하였다.

1. 재료 및 방법

가. 효소원의 제조

150-200 g의 SD계 흰쥐는 환경에 적응시킨 후 cholestyramin 첨가 또는 무첨가 사료로 2주일간 사육한 뒤 다음과 같은 과정으로 microsome을 분리하여 효소원으로 사용하였다.

1) 쥐를 ether로 마취시킨 후 개복하여 문맥으로 10 ml 정도의 saline을 infusion하여 간조직의 혈액을 제거한 뒤 간을 적출하여 무게를 측정하였다.

2) 적출한 간에서 3-4 g을 절단하여 0-4℃의 buffer A(인산완충용액, pH 7.0, 50 mM, sucrose 0.2 M, dithiothreitol 2 mM)로 세척, homogenize한 약 30-40 ml의 조직분쇄액을 아래 단계로 원심분리하였다.

3) 15,000g에서 10분간 원심분리한 상등액에서 흰색의 지방층을 가아제와 면봉으로 제거하고 다시 100,000g에서 75분간 초원심분리하여 microsome pellet을 얻었다.

4) 3)에서 얻은 microsome을 buffer A로 세척한 후 100,000g에서 60분간 원심분리하여 microsome pellet을 얻었다.

5) 이 pellet를 소량의 suspension buffer (buffer A plus 50 mM EDTA, pH 7.0)으로 분산시켜 biuret 법으로 단백질을 정량한 후 50-100 ㎎씩 나누어

-20 ℃에서 보관한 후 효소원으로 사용하였다.

나. 효소 활성의 측정

<Spectrophotometric method>

HMG-CoA reductase 활성은 Kleinsek 등의 방법에 따라 측정하였는 데, 즉, 1 mL Cuvette에 각시료 20 ㎕L (control은 시료대신 DMSO 20 ㎕L, 인산완충용액(pH 7.0, 0.5 M) 100 ㎕L, DTT(20 mM) 100 ㎕L, NADPH(3 mM) 100 ㎕L, 효소원을 100 ㎕L를 가하고 반응액의 온도를 37℃로 일정 하게 한 후 HMG-CoA(3 mM)를 100 ㎕L 가하여 효소반응을 시작하면서 340 nm에서 5분간의 흡광도 변화를 기록하였다. 또한 HMG-CoA 대신 증류수를 가한 blank로 반응시킨 흡광도의 변화도 동시에 기록하여 다음식에 의거하여 억제활성을 산출하였다.

억제활성(%)= [1-(control의 흡광도 변화-control blank의 흡광도)/(sample의 흡광도 변화-sample blank의 흡과도 변화)] X 100

<Radiochemical method>

1) 반응용액의 구성 (1 assay 당)

① 총용량 ; 30 ㎕l

② 인산완충액 (pH 7.0) ; 5.5 ㎛mole 내외 (0.5 M KH_2PO_4 11 ㎕l)

③ NADPH ; 200 nmole (0.1 M 용액 2 ㎕l)

④ HMG-CoA(cold) ; 12 nmole (3mM 용액 4 ㎕l)

⑤ HMG-CoA(hot)* ; 0.06 ㎕Ci, 1.5 nmole (0.02 mCi/ml 용액 3 ㎕l)

(* Hydroxy-3-Methyl-DL-3-[glutaryl-3-^{14}C]-CoA from NEN)

⑥ Microsome suspension ; 100-500 ㎍g proetein (20 mg/ml 용액 5-10 ㎕l)

실험의 편리와 오차를 줄이기 위해 ③-⑤는 필요한 만큼 미리 cocktail을 만들어서 한꺼번에 첨가하였다.

2) 1)과 같이 준비한 반응용액을 37℃에서 0 (Blank), 15, 30, 45, 60분 반응

시킨 후 6 N HCl 5 ㎕을 가하여 반응을 정지시키고, 생성물인 mevalonic-lactone을 형성하기 위하여 다시 30분을 37℃의 수용액에 두었다.

3) 2) 과정을 행한 반응액을 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액 중 15 ㎕를 아래의 조건에서 TLC를 하였다.

4) 시료를 silica gel G plate (10x10, 또는 20x10, 높이를 10 cm)에 2-2.5 cm의 band로 점적한 후, benzene:acetone (1:1. v/v)으로 전개시킨다. 생성물인 mevalonic lactone (Mev)의 위치를 확인하기 위하여 표준품을 따로 또는 시료점적 후 부가적으로 apply하였다.

5) 전개 후 요오드 증기로 생성물 Mev를 확인하여 (Rf= 0.5 부근) 이 부분과 HMG-CoA 부분(점적부위)을 잘라서 scintillation cocktail 5 ml를 첨가하여 방사능을 측정하였다. 경우에 따라, 자르기 전에 TLC plate상의 방사능 존재 위치를 image analyzer로 다시 방사능 band가 요오드로 detect된 Mev임을 확인한 후 방사능을 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

<spectrophotometric method>

가. diurnal **변화 및** cholestyramin**첨가의 영향**

일반고형사료를 주어 light/dark cycle **사육조건에서** 2**주일간 사육한 후 오전** 10**시와** dark cycle**에서** 5**시간 후에 각각 쥐간을 적출하여** microsome **을 얻어 효소활성을 비교하였다**. **그 결과** Table 2-1 **에서 보는 바와 같이** dark cycle**의 경우가** light cycle**보다 활성이 약** 2**배정도 높게 나타났다**. **따라서** control**의 효소활성을 높히기 위해서는 이후 효소원의 조제시** middark cycle**에 해부하여 간을 적출해야 할 것으로 판단되었다**.

Table 2-1. Diurnal changes in HMG-CoA reductase

	Specific activity
Light	3,114 pmoles/min/mg protein
Dark	6,516 pmoles/min/mg protein

enzyme protein**당 효소활성이 높은** microsome**을 얻기 위하여 실험동물을** 2**군으로 나누어 한군에는 일반사료를**, **다른 한군에는** cholestyramin**을 첨가한 사료를 주어** 2**주간 사육한 후 밤** 12**시에 해부**, **간을 적출하여** microsome**을 얻어 효소활성을 비교하였다**. **그 결과** cholestyramin**을 첨가한** microsome**의** HMG-CoA reductase activity**는 무첨가** microsome**에 비하여 단위** protein**당 활성이 약** 9**배 정도로서 현저하게 높았다**(Table 2-2).

Table 2-2. Effect of cholestyramin in HMG-CoA reductase activity

	Specific activity
Cholestyramin 무첨가	702 pmoles/min/mg protein
Cholestyramin 첨가	6,647 pmoles/min/mg protein

나. 효소활성에 미치는 용매의 영향

효소활성에 미치는 사용용매의 영향을 살펴보기 위하여 에탄올, 메탄올, DMSO를 농도별로 첨가하여 효소활성을 측정한 결과, Table 2-3과 같이 DMSO가 가장 좋은 것으로 평가되었으며 특히 시료를 10㎕ 취한 본 실험에서는 효소활성에 있어서 용매의 영향이 전혀 없는 것으로 나타났다. 또한 각 시료 추출물의 용해도에 있어서도 메탄올, 에탄올에 비하여 DMSO가 매우 우수하였다. 따라서 본 효소활성 측정을 위해서는 각시료 추출물을 DMSO에 용해하는 것으로 하였다.

Table 2-3. Effect of various solvent on HMG-CoA reductase activity

	methanol	ethanol	DMSO
0 ㎕		100 %	
10 ㎕	58 %	77 %	95 %
15 ㎕	61 %	71 %	88 %
20 ㎕	67 %	77 %	89 %

이상 효소원의 조제방법을 검토한 결과 HMG-CoA reductase activity측정용 microsome은 cholestyramin을 급여하여 사육하고, 사육후 middark cycle 12시경에 간을 적출하여 얻어진 microsome을 freeze-thaw방

법으로 효소원을 조제하는 것으로 하였다.

<Radiochemical method>

가. Microsome Protein 양에 따른 효소활성 증가

이 실험은 microsomal protein 을 660 ㎍ 까지 증가하기 위하여 총 반응 60 ㎖로 하였는데, 30 ㎖로 하였을 때 보다 활성이 적게 검출되었다. 그러나 fig.2-1 에서 보는 것과 같이 microsomal protein에 증가에 따라 대체로 활성이 증가함을 볼 수 있었다. 그러나 660 ㎍에서 그 미만에 비해 활성 증가가 둔화되어 protein 양을 200-400 ㎍으로 조정하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

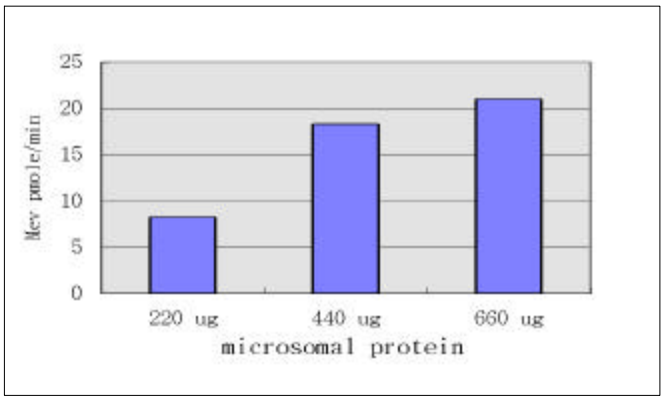


Fig. 2-1 Effect of microsomal protein concentration on HMG-CoA reductase activity

나. 반응시간에 따른 효소활성 변화

① 총 반응용액 30 과 60 ㎖에서 15분과 30 분 반응 ;

Fig. 2-2 에서 보는대로 두 조건에서 모두 반응시간이 증가 됨에 따라 생성물이 증가 하였으며 대체적으로 총 반응용액을 30 ㎖ 사용하였을 때가 반응이 잘 진행되었고, 60 ㎖사용하였을 때도, 시간의 증가에 따라 잘 비례하였다

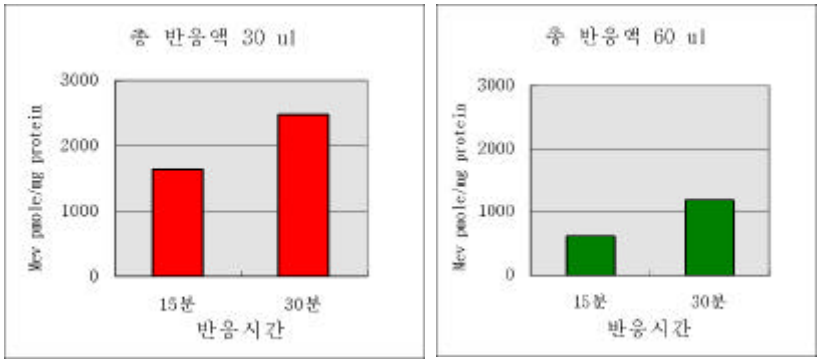


Fig.2-2 Effect of the time of incubation on HMG-CoA reductase activity

② **총 반응용액** 30 ㎕**에서** 60**까지 시간에 따른 활성 변화** ;

Fig. 2-3 **에서 보는 바와 같이** 30**분까지 비례하였으나 그 이후는 별로 증가하지 않아** 30**분이 가장 적합한 반응시간으로 판단되었다.**

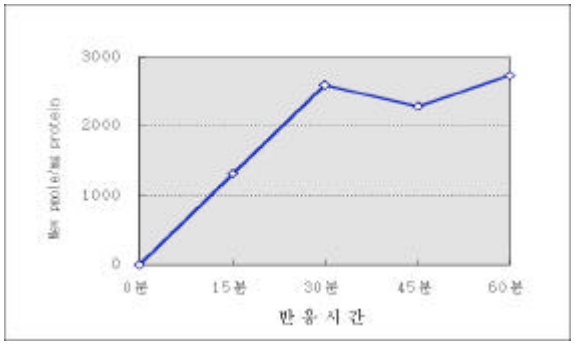


Fig. 2-3 Effect of the time of incubation on HMG-CoA reductase activity

제 2절 곡류로부터 콜레스테롤 상승억제 활성 검색

제 1절에서 확립된 방법을 이용하여 각 곡류로부터 물 또는 메탄올추출물을 조제하여 HMG-CoA reductase저해활성을 검색하였다. 또한 활성이 높은 곡류에 대해서 극성이 다른 용매로 분획을 실시하여 용매 분획의 활성을 검색하고 활성특성을 검토하였다.

1. 실험재료 및 방법

가. 실험재료

실험재료로 사용한 현미, 흑미, 홍향미, 향미, 배아, 쌀보리, 늘보리, 수수, 기장, 차조, 메밀, 율무, 옥수수, 흑임자, 녹두, 대두, 동부, 팥, 검정콩은 모두 1996년도산으로서 대양영농조합으로 부터 구입하였다. Cholestyramin, β-NADPH, HMG-CoA, dithiothreitol은 sigma사로 부터 구입하였고 나머지 시약은 일급이상의 것을 사용하였다.

나. 추출물의 조제

각 실험재료는 이물질 등을 골라내고 물로 씻어 30℃ 에서 풍건한 후 40 mesh로 분쇄하였고 지방함량이 높은 흑임자 및 두류는 hexane으로 탈지한 후 추출에 이용하였다. 각 시료에 70% 에탄올 용액을 시료중량의 10배를 가하여 16시간 shaking 한 다음 여과하고(Toyo No. 2) 다시 70% 에탄올 용액을 시료중량의 5배 가하여 3시간 shaking하여 여과하였다. 여액은 모아서 감압건조시킨 뒤 잔존하는 물은 동결건조하여 에탄올 시료로 사용하였다. 메탄올 시료는 에탄올 대신 80% 메탄올을 가하여 에탄올 시료와 동일한 방법으로 추출하였다.

다. 용매분획

1차년도에서 비교적 활성이 높았던 수수, 기장, 흑미, 메밀 메탄올 추출물을 각종 용매로서 순차적으로 분획하였는 데, 즉 시료 2 g에 증류수 100 mL을 가하여 혼합한 후 500 mL 분액여두에 넣어 hexane 200 mL을 넣고 분액여두용 진탕기에서 10분간 진탕한 다음 1시간 방치후 hexane층을 분리해 내고 다시 hexane 200 mL을 가하여 10분간 진탕, 1시간 방치하여 hexane층을 분리하여 모았다. 다음은 chloroform, ethylacetate, butanol을 순차적으로 가하여 hexane과 동일한 방법으로 분획하여 hexane획분, chloroform획분, ethylacetate획분, butanol획분, 수용성 획분으로 분획하였고 각 분획물은 감압건조하였다. 각시료 추출물 및 분획물은 dimethylsulfoxide(DMSO)로 일정농도가 되게 녹인 후 assay에 이용하였다.

라. 효소원의 조제

실험동물은 200-220 g의 SD계 숫컷 흰쥐에게 activation 시킨 cholestyramin을 일반고형사료에 0.4% 되게 첨가한 사료를 주어 10일간 사육하였다. 사육이 끝난 흰쥐는 밤 11시에 해부하여 간을 적출하여 무게를 측정하였다. 적출한 간을 cold buffer(인산 완충용액, pH 7.0, 50 mM, sucrose 0.2 M, dithiothreitol 2 mM)로 세척하여 Potter-Elvehjem type glass homogenizer로 homogenize한 다음 15,000g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액에서 흰색의 지방층을 가아제와 면봉으로 제거하고 다시 100,000 g에서 70분간 초원심분리하여 microsome pellet을 취하고 다시 buffer A로 microsome을 세척하여 100,000 g에서 60 분간 원심분리한 다음 -20℃에서 보관하였다. -20℃에서 약 2주일간 보관되었던 microsome pellet을 buffer B(인산완충용액, pH 7.0, 50 mM, sucrose 0.1 M, dithiothreitol 2 mM, KCl 50 mM, EDTA 30 mM)를 가하여 homogenize한 후 상온에서 30분간 방치한 다음 100,000 g, 20℃에서 60 분간 초원심분리하여 상등액을 효소원으로 하였고 사용할 때 까지 -70℃에서 보관하였다.

마. HMG-CoA reductase **억제활성의 측정**

HMG-CoA reductase **활성은** Kleinsek **등의 방법에 따라 측정하였는 데**, **즉**, 1 mL Cuvette**에 각시료** 20 ㎕L (control**은 시료대신** DMSO 20 ㎕L, **인산완충용액**(pH 7.0, 0.5 M) 100 ㎕L, DTT(20 mM) 100 ㎕L, NADPH(3 mM) 100 ㎕L, **효소원을** 100 ㎕L**를 가하고 반응액의 온도를** 37℃**로 일정 하게 한 후** HMG-CoA(3 mM)**를** 100 ㎕L **가하여 효소반응을 시작하면서** 340 nm**에서** 5**분간의 흡광도 변화를 기록하였다**. **또한** HMG-CoA **대신 증류수를 가한** blank**로 반응시킨 흡광도의 변화도 동시에 기록하여 다음식에 의거하여 억제활성을 산출하였다**.

억제활성(%)= [1-(control**의 흡광도 변화**-control blank**의 흡광도**)/(sample**의 흡광도 변화**-sample blank**의 흡과도 변화**)] X 100

마. **단백질 정량**

Solubilized enzyme**원의 단백질양은** Lowry**법에 의하여 정량하였고 표준품은** bovine serum albumin**을 사용하였다**. .

2. 결과 및 고찰

가. 시료의 일반성분

시료의 일반성분을 보면 수분은 10% 미만이었고 지방 함량은 0.2%-5%로 나타났으며 일부 두류등 고지방 시료는 헥산으로 탈지하여 사용하였으므로 단백질 및 식이섬유 함량이 각각 22-42%, 10-23% 범위로 매우 높게 나타났다.

나. 시료 추출물의 수율

각 시료의 에탄올 및 메탄올 추출물의 수율(Table 2-4)을 보면 메탄올 추출물에서는 탈지대두가 15.1%, 탈지 검정콩이 14.8%로 매우 높았으며 현미, 흑미, 율무는 2%미만으로 낮았고 향미는 1% 미만이었다. 에탄올 추출물에서도 탈지검정콩이 17.5%로 가장 높았고 향미가 0.6%로 가장 낮았으며 전체적으로 보아 메탄올 추출물의 수율이 에탄올 추출물 보다 약간 낮게 나타났다.

Table 2-4. The yields of 70% ethanol and 80% methanol extracts of cereals and regumes.

Samples	Methanol extracts	Ethanol extracts
		(%)
Brown rice	1.9	1.8
Black rice	2.7	1.4
Prosomillet	2.9	2.0
Sorghum	2.8	2.4
Naked barley	4.0	2.9
barley	2.2	3.0
Job's tears	5.0	1.6
Glutinous millet	3.5	2.6
Buckwheat	2.6	3.5
Flavor rice	0.6	0.4
Red rice	2.5	2.0
Corn	7.0	4.9
Defatted soy bean	16.9	15.1
Defatted black soybean	17.5	14.8
Mungbean	9.1	8.1
Cowpeas	6.4	9.4
Small red bean	8.2	7.5
Black sesame	6.2	7.7

다. 시료 추출물의 HMG-CoA reductase 저해활성

각 곡류 및 두류 시료 에탄올 추출물을 100 ㎍/assay 되게 첨가하여 HMG-CoA reductase 억제활성을 검색한 결과를 Table 2-5에 나타내었다. 수수가 41.1%로서 가장 높은 저해활성을 보였고 다음은 흑임자로서 20.8%를 나타내었다. 또한 늘보리, 옥수수, 녹두, 동부는 16%-17.3%의 범위를 나타내었으며 나머지는 활성이 미미하거나 전혀 없는 것으로 나타났다. 메탄올 추출물의 HMG-CoA reductase 저해활성을 보면(Table 2-6), 기장이 73%로 매우 높은 억제활성을 나타내었고 다음은 수수로서 44.7%의 활성을 보였으며 그 다음은 흑미가 27%, 향미(26.2%), 쌀보리(18.8%), 메밀(16.2%)의 순으로 나타났다. Qureshi등은 보리는 여러 곡류중에서 실험동물의 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 데 가장 효과적이었으며, 특히 보리배유부에 존재하는 주된 식이섬유인 β-D-glucans는 콜레스테롤의 배설에 영향을 준다고 보고되어 있다. 그러나 고단백질 보리(Hordeum vulgan, L) 가루에는 식이섬유 이외에 콜레스테롤 합성을 억제하는 작용, 즉 HMG-CoA reductase 활성을 억제하는 효과가 있으며 이러한 활성을 나타내는 물질은 tocotrienol이라고 보고하였다. 또한 이등은 약용식물을 중심으로 HMG-CoA reductase 저해활성을 검색한 결과 메밀껍질의 물 추출물에서 65% 정도로 가장 높은 활성을 나타내었다고 보고하고 있으며 최 등의 연구에 의하면 메밀종자 물추출물은 6%, 메밀껍질 물추출물은 33%의 저해활성을 나타내었으나 메밀채소의 경우는 HMG-CoA reductase 활성을 오히려 증가시킨다고 보고되어 있다. 통메밀을 이용한 본 연구에서는 에탄올 추출물에서는 HMG-CoA reductase 저해활성이 전혀 나타나지 않았고 메탄올 추출물에서는 약 26%로서 최 등의 메밀종자보다는 높고 껍질보다는 낮은 저해활성을 보여 메밀의 HMG-CoA reductase 저해활성을 나타내는 물질은 메밀의 껍질부분에

존재할 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서는 보리와 메밀이 타 곡류에 비하여 비교적 높은 활성을 나타내었지만 수수와 기장은 이미 보고된 바 있는 메밀이나 보리보다도 현저히 높은 활성을 나타내어 새로운 HMG-CoA reductase 저해활성 소재로 사료되나 이에 대해서는 *in vivo*에서의 효능을 비롯하여 더 많은 연구가 요구된다.

Table 2-5. The inhibitory effect of 70% ethanol extracts of cereals and regumes on the microsomal HMG-CoA reductase activity

Samples	Specific activity (nmole/mg protein/min)	Inhibition rate (%)
Control	3.53	
Sorghum	2.08	41.1
Prosomillet	3.18	9.8
Barley	2.97	16.0
Naked barley	3.37	4.6
Glutinous millet	4.02	-14.0
Buckwheat	3.53	0
Flavor rice	4.13	-17.0
Black rice	3.51	0.7
Red rice	3.48	1.3
Rice germ	2.75	22.1
Brown rice	4.09	-16.0
Job's tear	3.52	0
Black sesame	2.80	20.8
Mungbean	2.92	17.3
Defatted soybean	4.31	-22.0
Cowpeas	2.92	17.3
Small red bean	3.57	-1.0
Corn	2.94	16.7
Defatted-		

black soybean	3.53	0

* The concentrations of each sample tested was 100 ㎍/assay

Table 2-6. The inhibitory effect of 80% methanol extracts of cereals and regumes on the microsomal HMG-CoA reductase activity

Samples	Specific activity (nmole/mg protein/min)	Inhibition rate (%)
Control	4.15	
Sorghum	2.29	44.7
Prosomillet	1.13	72.7
Barley	4.45	-7.3
Naked barley	3.37	18.8
Glutinous millet	4.66	-12.2
Bucksheat	3.06	26.2
Flavor rice	3.35	19.2
Black rice	5.70	-37.4
Red rice	4.76	-14.7
Brown rice	4.15	0.0
Job's tear	3.93	5.2
Rice germ	4.77	-14.9
Black sesame	3.89	6.2
Mungbean	4.02	3.0
Defatted soybean	4.07	1.8
Cowpeas	4.34	-4.5
Small red bean	5.69	-37.3
Corn	4.40	-6.1
Defatted-black soybean	4.23	-2.1

* The concentrations of each sample tested was 100 ㎍/assay

라. 분획물의 수율

각 용매 분획물의 수율(Table 2-7)**은 수수의 경우 헥산획분이** 41%**로 가장 높았고 다음은 수용성 획분이** 38%**로 많았으며 기장은 헥산획분이** 56%, **수용성 획분이** 29%, **부탄올 획분이** 7%**의 순이었고 흑미는 수용성획분이** 52%**로 가장 높았고 다음은 헥산획분으로** 18%**였으며 메밀은 수용성 획분이** 45%**로 가장 높았다. 이와 같이 수수와 기장은 헥산 획분이 가정높게 비슷한 경향을 나타내었으며 흑미와 메밀은 수용성 획분이 가장 높아 비슷한 양상을 보였다. 또한** 4**시료 모두 에틸아세테이트 획분이 가장 낮게 나타났다.**

Table 2-7. Yield of each solvent fraction

	Sorghum	Prosomillet	Black rice	Buckwheat
Hexane	38.2	55.6	18.0	14.0
Chloroform	4.5	1.4	5.6	5.5
Ethylacetate	1.1	0.8	2.1	4.3
Butanol	11.4	7.4	12.4	20.9
Water	39.4	28.6	48.0	45.0

마. 용매분획물의 HMG-CoA reductase **저해활성**

각 시료 메탄올 추출물을 극성이 다른 각종 용매로 분획하여 100ug/assay **되게 첨가한 다음** HMG-CoA reductase **저해활성을 검토하였다. 우선 기장을 보면**(Fig.2-4) **헥산 획분, 에틸아세테이트 획분 및 클로르포름 획분이 각각** 96.2%, 98%, 93.1%**로 매우 높은 활성을 나타내었으며** 3**획분 모두 분획**

전의 메탄올 추출물에 비하여 활성이 현저히 증가하였다. 그러나 부탄올 획분과 수용성 획분은 활성이 없었다. 수수에 있어서는(Fig. 2-5) 헥산 획분에서 활성이 완전히 억제되어 매우 강력한 활성을 보였다. 다음은 클로르포름 획분과 에틸아세테이트 획분으로서 10% 미만이었으며 부탄올 획분과 수용성 획분은 오히려 HMG-CoA reductase 활성을 촉진시키는 것으로 나타났다. 수수와 기장 모두 헥산 획분에서 매우 높은 활성을 나타낸 것으로 보아 이러한 활성을 나타내는 물질은 비극성 물질일 가능성이 매우 높을 것으로 사료된다. 또한 흑미에 있어서도(Fig. 2-6) 헥산 획분이 88.7%로 매우 강한 활성을 나타내었고 다음은 클로르포름 획분으로서 22.5%의 저해활성을 나타내었으며 에틸아세테이트, 부탄올, 수용성 획분에는 거의 활성이 나타나지 않아 역시 활성 획분은 비극성 물질일 것으로 추정되었다. 한편 메밀(Fig. 2-7)은 앞의 3 시료와는 달리 헥산, 클로르포름 획분에는 활성이 전혀 나타나지 않았고 에틸아세테이트 획분에서만 43.9%의 활성을 보였다. 이러한 각 시료의 HMG-CoA reductase 억제활성을 나타내는 주성분 물질을 확인하기 위해서는 앞으로 TLC, preparation HPLC 등을 이용한 확인이 필요하다고 생각된다.

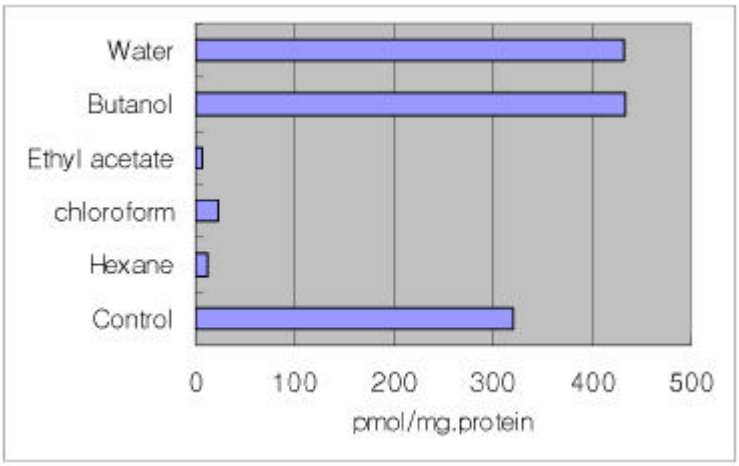


Fig. 2-4 Effect of various solvent fractions of prosomillet methanol extract on activity of liver microsomal HMG-CoA reductase

pmol of mevalonic acid/min/mg microsomal protein

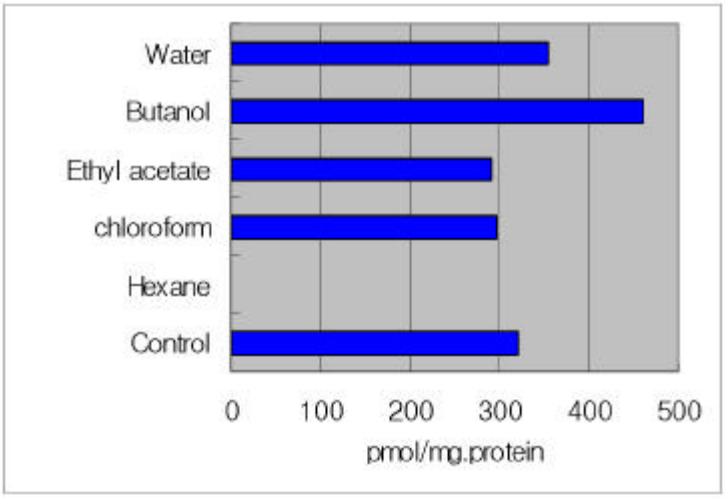


Fig. 2-5 Effect of various solvent fractions of sorghum methanol extract on HMG-CoA reductase

pmol of mevalonic acid/min/mg microsomal protein

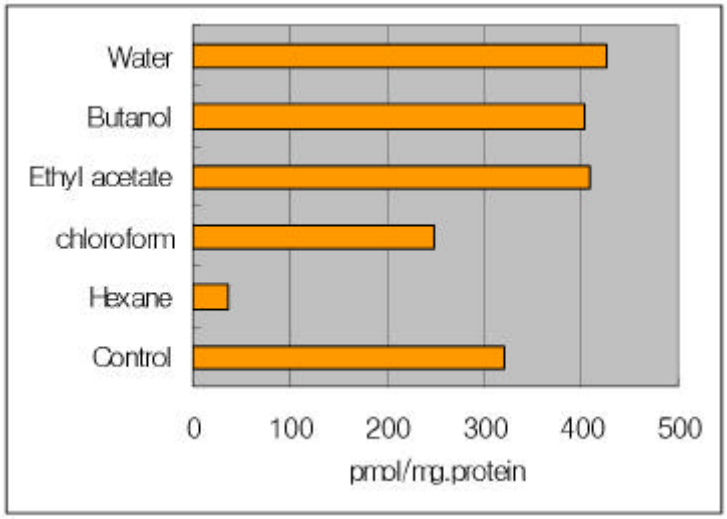


Fig. 2-6 Effect of various solvent fractions of black rice methanol extract on HMG-CoA reductase

pmol of mevalonic acid/min/mg microsomal protein

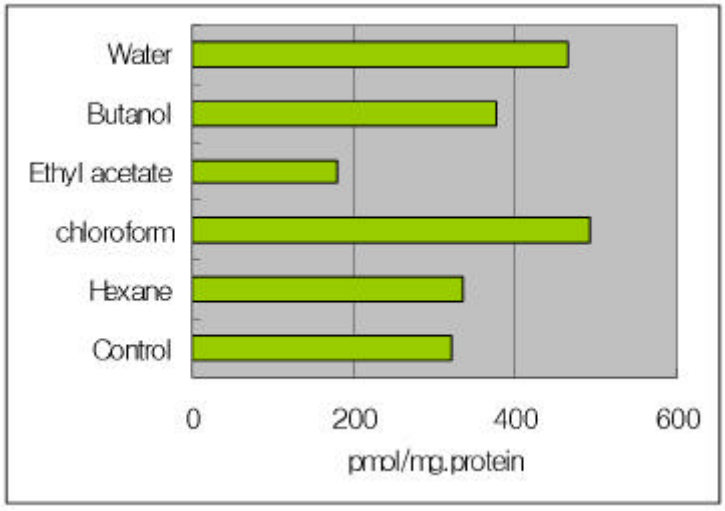


Fig. 2-7 Effect of various solvent fractions of sorghum methanol extract on HMG-CoA reductase

pmol of mevalonic acid/min/mg microsomal protein

바. 농도 의존성

활성이 높았던 수수헥산획분과 기장의 헥산, 클로르포르획분, 흑미의 헥산 획분, 메밀의 에틸아세테이트 획분의 첨가농도를 25ug, 50ug, 100ug**으로 달리하여** radioenzymatic method**로** HMG-CoA reductase **억제활성을 검색하였다(그림** 2-8,9,10,11,12). **그 결과 수수 헥산획분은** 100ug **첨가시 완전히 억제되었고** 50ug **첨가시** 97%, 25ug **첨가시에도** 80% **이상의 매우 강한 활성을 나타내었고 첨가농도에 비례하여 활성이 증가하였다. 기장 헥산 획분 및 클로르포름 획분에 있어서도 농도의존성을 나타내었으며** 100ug **첨가시는** 95.3%, 95.8%, 25ug **첨가시는** 75%, 70.2%, 25ug **첨가시는** 37.4%, 40.1%**로 두획분 거의 비슷한 활성을 나타내었다. 흑미에 있어서도** 100ug **첨가시** 81.3%, 50ug **첨가시** 53.4%, 25ug **첨가시** 30.5%**로 첨가농도가 높을수록 강한 억제활성을 나타내었다. 메밀 에틸아세테이트 획분에서는** 25ug **첨가시는 전혀 활성이 나타나지 않았다. 또한 동일농도에서 각 시료별로 비교하여 보면** 25ug **첨가시, 수수헥산획분이 가장 높은 활성을 나타내었고 다음은 기장이었으며 메밀이 가장 낮은 것으로 나타났다.**

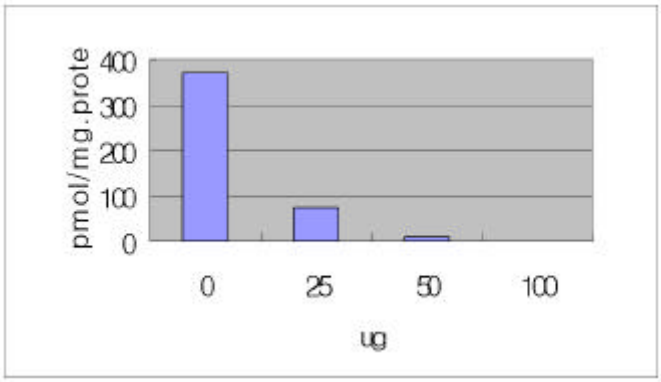


Fig. 2-8 Dose dependent inhibition of hexane fraction of sorghum methanol extract on HMG-CoA reductase activity

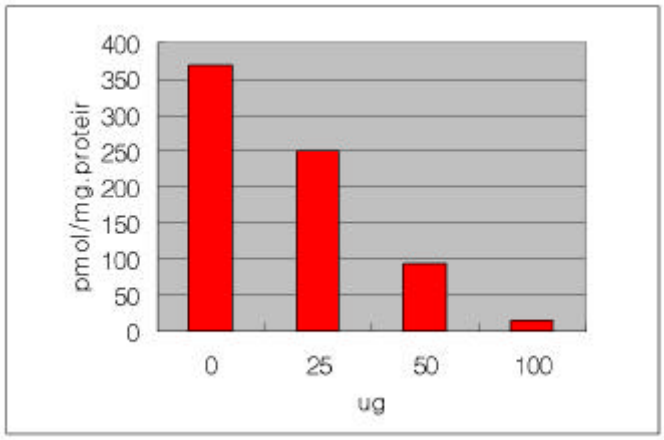


Fig. 2-9 Dose dependent inhibition of hexane fraction of prosomillet methanol extract on HMG-CoA reductase activity

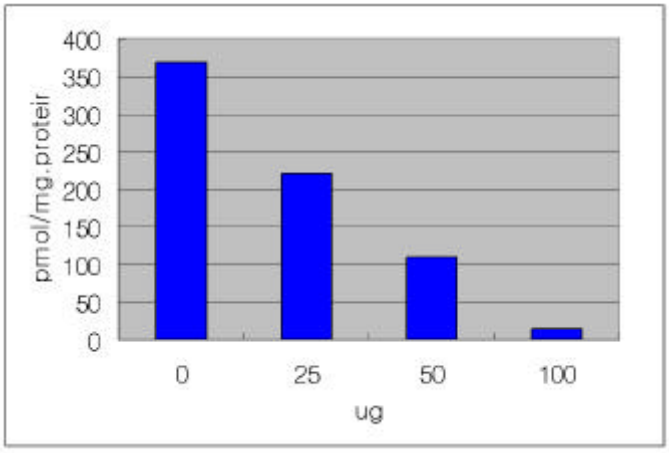


Fig.2-10 Dose dependent inhibition of chlorform fraction of sorghum methanol extract on HMG-CoA reductase activity

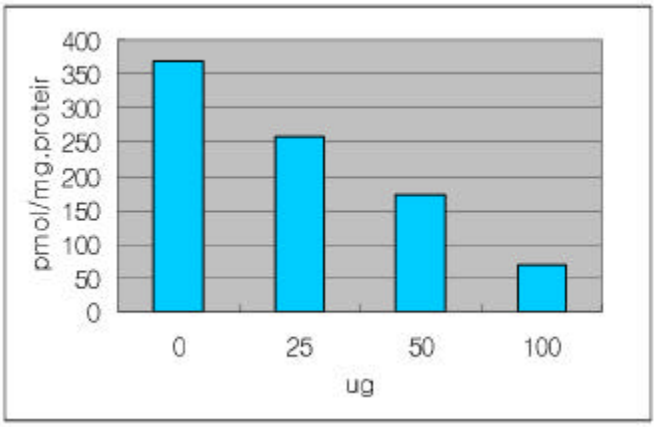


Fig. 2-11 Dose dependent inhibition of hexane fraction of black rice methanol extract on HMG-CoA reductase activity

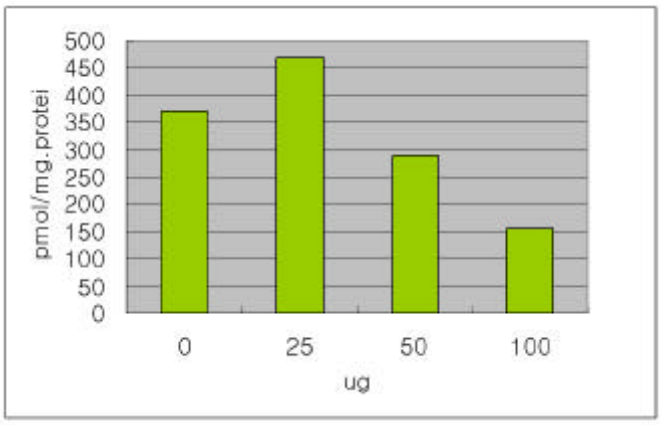


Fig. 2-12 Dose dependent inhibition of ethyl acetate fraction of buckwheat methanol extract on HMG-CoA reductase activity

사. 페놀화합물의 HMG-CoA reductase 저해활성

각종 페놀성 화합물이 HMG-CoA reductase활성에 미치는 영향을 Table 2-8 에 나타내었다. 그결과 NDGA가 85.6%로 가장 높은 활성을 나타내었고 다음은 Tannic acid로 약 65%의 억제활성을 나타내었으며 다른화합물에서는 활성이 없거나 오히려 촉진시키는 것으로 나타나 NDGA, tannic acid를 제외한 페놀성 화합물은 HMG-CoA reductase억제 작용이 없는 것으로 사료되었다. 또한 메밀의 주 활성성분으로 알려진 rutin은 HMG-CoA reductase 활성을 억제하는 것으로 일부 보고된 바 있으나 본 연구에서는 억제활성이 나타나지 않았으며 메밀추출물에서도 미약한 활성이 나타났다. 한편 tannic acid는 수수의 주성분이기도 하며 각 고활성 곡류시료의 활성획분에 대한 주성분 분석이 필요하다고 사료된다.

Table 2-8. Effect of various phenolic comounds on HMG-CoA reductase activity

Compounds	pmol/mg.protein	% of control
Control	455	100
Quercetin	477	105
Catechin	505	111
NDGA	65	14.4 *
Kampferol	436	96.2 *
Rutin	482	106
Tannic acid	161	35.5
Gallic acid	500	110
Ferulic acid	482	106

이상 고활성 곡류추출물의 각 획분이 microsomal HMG-CoA reductase 억제활성을 검토한 결과 메밀을 제외한 모든 시료에서 헥산획분이 가장 높은 활성을 나타내었고 특히 수수의 헥산 획분의 활성은 현재 고지혈증 치료제로 이용되고 있고 HMG-CoA reductase inhibitor로 알려져 있는 mevastatin 보다도 강한 활성을 나타내었다. 그 다음으로 높은 활성을 보인 것은 클로르포름획분이었으며 메밀에서는 에틸아세테이트 획분에서 가장 높은 활성을 나타내었으나 다른 3시료에 비하여 낮은 활성을 보였다. 또한 이러한 활성획분은 비극성 물질일 것으로 추정되었으나 주성분 물질을 확인하기 위해서는 앞으로 TLC, preparation HPLC 등을 이용한 확인이 필요하다고 생각된다.

제 3절 활성획분의 특성조사

HMG-CoA reductase 억제활성에 있어서 활성 획분간의 상승효과 및 열안정성에 대하여 검토하였고 활성 획분의 주성분 분석에 대해서도 검토하였다.

1. 실험재료 및 방법

가. 효소원의 조제

HMG-CoA reductase활성 측정용 효소원인 흰쥐 간장 microsome은 2-1절에서 확립한 방법에 의거하여 조제하였다. 즉 SD계 숫컷 흰쥐에게 activation 시킨 cholestyramin을 첨가시켜 사육한 다음 간장 microsome을 분리하여 HMG-CoA reductase 효소원으로 이용하였다.

나. HMG-CoA reductase 억제활성에 미치는 활성획분의 상승효과

HMG-CoA reductase 활성은 Kleinsek 등의 방법에 의거하여 확립한

isotope방법으로 측정하였으며 상승효과를 보기 위하여 활성이 높았던 곡류 추출물인 수수, 기장, 흑미, 메밀 추출물을 적정 농도로 혼합하여 활성을 측정 비교하였고 고활성 획분인 헥산 획분과 tannin 및 NDGA와의 상승효과도 검토하였다.

효소원의 단백질양은 Lowry법에 의하여 정량하였다.

다. 활성획분의 주성분 분석

각 분획물중 활성이 높았던 헥산획분을 취하여 TLC plate에 spot한 다음 전개용매 (CH3: MeOH: H2O = 65: 35: 10)로 전개하였다. 분리된 각 spot을 취하여 다시 용매로 녹인 후 UV-spectrum을 조사하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 활성 획분이 온도 및 시간에 따른 변화

HMG-CoA reductase 억제활성이 강했던 수수헥산 획분의 가열온도 및 가열시간에 따른 억제활성변화를 측정하여 열안정성을 조사하였다. 가열온도 60℃, 80℃, 100℃에서 각각 30분간 가온한 후 HMG-CoA reducatse 억제활성을 측정하여 25℃(실온)에서 30분 처리한 것과 비교한 결과 실온에 비하여 100.3, 94.3, 95.4%로 나타났다. 가온시간에 따른 변화를 보기 위하여 100℃에서 15분, 30분, 60분간 가온처리하여 열을 가하지 않은 것과 비교한 결과 15분간 처리시에는 변화가 없었고 30분 가온시는 95.3%, 60분 가온시는 93.8%를 각각 나타내었다. 수수 헥산 획분의 HMG-CoA reductase 억제활성은 온도, 시간에 따른 열처리 조건에서 비교적 일정하게 유지되어 열안정성이 비교적 높은 것으로 나타났다(Fig.2-13, 14).

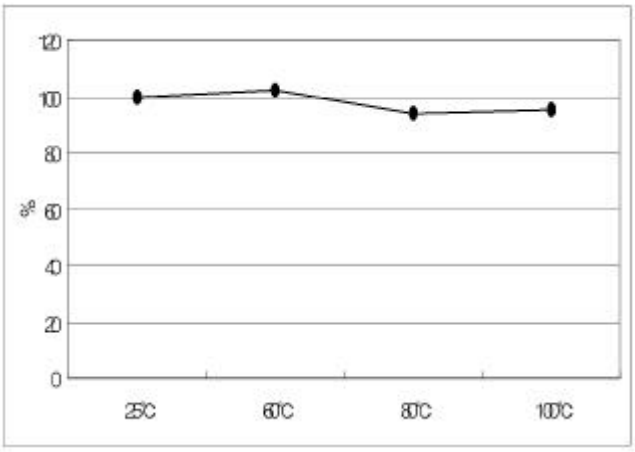


Fig. 2-13 Effect of hexane fraction of sorghum methanol extract heated to various temperatures on HMG-CoA reductase activity

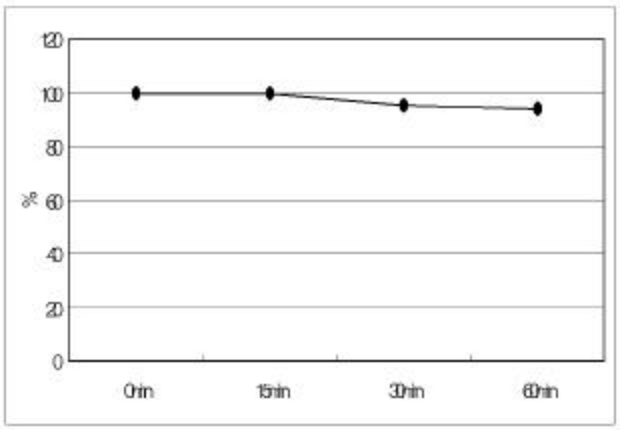


Fig. 2-14 Effect of hexane fraction of sorghum methanol extract

heated for various times at 100℃ on HMG-CoA reductase activity

나. 활성획분간 및 타물질과의 상승효과

수수, 기장, 흑미, 메밀의 메탄올 추출물 25mg/ml을 1ul씩 취하여 혼합 첨가한 다음 (곡류 추출물 total 100ug/assay) 활성을 비교한 결과 미미한 활성을 나타내어 각각의 곡류 100ug/assay 첨가시 활성과 거의 비슷한 활성을 보였다. 또한 혼합물의 농도를 2배 증가시킨 경우에는 활성이 크게 증가하였고 4배 고농도로 첨가한 경우는 활성이 약 4배 증가한 것으로 보아 메탄올 추출물 상호간의 상승효과 보다는 첨가농도에 의한 영향이 큰 것으로 나타났다. 그러나 수수와 기장 헥산 획분 25mg/ml을 각각 2ul 씩 취하여(total 100ug/assay) 동시에 첨가한 다음 활성을 측정한 결과 72.1%의 억제활성을 나타내어 각각 획분의 단독만을 100ug/assay 되게 첨가한 경우의 53%(수수), 63%(기장)억제 활성에 비하여 활성이 현저하게 상승하였다. 한편 HMG-CoA reductase 억제활성이 비교적 높았던 페놀성 화합물인 tannin 또는 NDGA와 수수, 기장의 헥산 획분을 혼합 첨가한 다음하여 활성을 측정하였다. 그 결과 수수 헥산 획분에 NDGA를 첨가한 경우는 84.6%의 억제활성으로 수수헥산 단독 및 NDGA 단독 첨가시보다 현저하게 높은 활성을 나타내었고, 기장 헥산획분에 첨가한 경우도 동일한 경향을 나타내었다. 또한 수수헥산 획분 및 기장 헥산 획분에 tannin을 각각 첨가한 경우에도 각각 74.8%. 68.9%의 억제활성을 나타내었으며 각 헥산 획분 단독 또는 tannin단독 첨가시에 비하여 현저하게 높은 활성을 나타내었고 헥산획분의 첨가농도에 따라서도 비례하여 이들 획분의 억제활성은 페놀성 화합물과 뚜렷한 상승효과가 있는 것으로 나타났다.

다. 주성분 분석

고활성 추출물의 주성분 분석을 위해 수수와 기장의 분획분중 가장 활성이

높았던 헥산획분에 대하여 검토하였다. 우선, TLC를 실시한 결과 기장 헥산 획분에서는 4개의 spot이 나타났으나 대부분이 Rf 0.75에서 큰 spot으로 집중되었고 황산발색 등으로 판단해 볼 때 이는 대부분이 지방산유인 것으로 추정되었다. 수수의 경우는 Rf 0.13, 0.25, 0.38, 0.5 위치에 4개 spot으로 나타났고 각 spot에 대한 UV-spectrum을 조사한 결과 flavonid, tannin과 같은 페놀성 성분이 주성분 인 것으로 추정되며 앞으로 그 원인 물질에 대한 구조동정이 요구된다.

라. 흑미유효성분의 대량 분리

고활성 곡류의 하나인 흑미로부터 용매 추출, 컬럼크로마토그래피등을 이용하여 유효성분을 분리하여 대량 추출하였다.

제 4절 배양세포계에서 세포내 콜레스테롤 상승억제 활성검색

1. 재료 및 방법

가. 세포배양

실험에 이용한 세포주는 HepG2은 Korea Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하였다. 각 세포는 fetal bovine serum을 10% 함유하는 RPMI 1640(100unit/ml penicillin, 100unit/ml streptomycin) 배지로 배양한 다음 100x100 mm dish에 4x106 cell을 seeding 하였다. 세포가 monolayer를 형성하였을 때 무혈청 배지로 교환하여 하루동안 배양시킨 후 각 분획물 시료를 250ug/dish 첨가하여 4시간 배양하여 세포내 HMG-CoA reductase 활성 측정용시료로 harvest하였다. control에는 각 분획물 시료를 용해시킨

DMSO를 동일량 첨가하였다. 또한 콜레스테롤 분석용으로는 4시간 배양이 끝난 세포에 콜레스테롤을 100ug/dish되게 add up하여 2시간 더 배양한 후 세포중 콜레스테롤을 추출하였다.

나. 세포중 콜레스테롤 추출 및 분석

세포내의 콜레스테롤 함량은 미량이므로 일반적인 spectrophotometer를 이용한 enzymatic 방법으로는 정량이 불가능하여 GC를 이용한 세포내 콜레스테롤 정량법을 검토하였다. 즉 배양이 끝난 세포는 cold-PBS로 4회 washing 한 다음 세포를 harvest 하여 원심분리한 후 세포만 모아 hydrolysis 용액을 가해 가수분해한 다음 hexane으로 추출, 감암건조후 GC로 분석하였다.

다. HMG-CoA reductase 억제활성

cold-PBS로 washing한 세포는 2장 1절에서 확립된 방법으로 HMG-CoA reductase 측정용 효소원을 조제하여 radio isotope법으로 활성을 측정하였고 효소원의 단백질량은 Lowry법으로 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 세포내에서 외인성 콜레스테롤의 uptake

배양세포계에 있어서 각종 농도의 콜레스테롤을 배지에 첨가하여 배양시간에 따른 외인성 콜레스테롤의 세포내 거동을 조사한 결과 콜레스테롤의 uptake는 첨가농도 100ug/dish까지는 첨가량이 증가할수록 증가하였고 배양 4시간 까지는 배양시간이 길수록 증가하였다(Data not shown). Fig. 2-15에는 세포내 콜레스테롤함량에 미치는 수수와 기장 메탄올 추출물의 영향을 나타내었다. 기장 추출물은 세포내 콜레스테롤 변화에 크게 영향을 미치지 않았으나 수수메탄올 추출물은 대조군에 비하여 세포내 콜레스테롤 함량이 현저히 감소하여 콜레스테롤의 세포내 uptake를 억제하는 효과가 있는 것으

로 판단되었다.

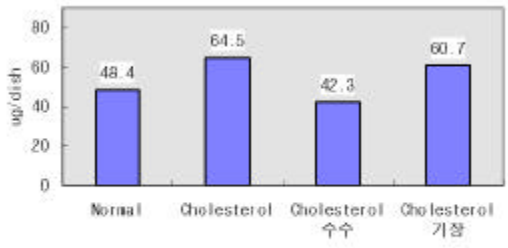


Fig. 2-15 Effect of sorghum and prosomillet methanol extract on cholesterol contents of HepG2 cell

나. 세포내 HMG-CoA reductase 억제활성

세포내 microsomal HMG-CoA reductase는 활성이 낮으므로 spectrophotometer로는 측정이 불가능하여 radiochemical method를 이용하여 효소활성을 측정하였다. Fig. 2-16에는 수수, 기장 추출물(100ug/dish)을 medium에 첨가하여 4시간 배양한 뒤 세포 microsome을 분리하여 HMG-CoA reductase억제 활성을 측정한 결과를 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 곡류 추출물을 첨가하지 않은 세포의 HMG-CoA reductase 활성은 약 60 pmol/min. mg protein 인데 비하여 수수메탄올 추출물을 첨가한 세포에서는 약 22 pmol/min. mg protein 로 그 활성이 1/3로 현저하게 감소하였다. 기장추출물의 경우도 첨가하지 않은 none에 비하여 현저히 낮

은 활성을 보였다.

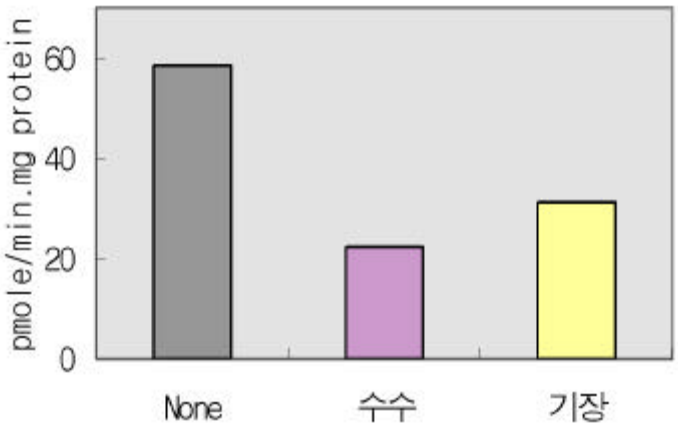


Fig. 2-16 Effect of sorghum and prosomillet methanol extract on microsomal HMG-CoA reductase activity of HepG2 cell

다. 각 분획물이 세포내 콜레스테롤 uptake에 미치는 영향

각 분획물 시료를 첨가하여 4시간 배양한 후 100ug/dish의 콜레스테롤 첨가하여 2시간 더 배양한 다음 세포내 콜레스테롤 함량의 변화를 검토하였다(Fig. 2-17). 콜레스테롤을 첨가하지 않은 normal 세포는 38ug/dish 인데 비하여 콜레스테롤을 첨가한 control은 73ug/dish로 현저히 높아져 첨가한 콜레스테롤이 세포내 uptake 되었음을 알 수 있었다. 그러나 수수의 각 분획물을 첨가한 경우 수용성 획분은 control 보다 오히려 높은 값을 나타내었고 클로르포름 획분은 control과 거의 동일한 값을 보여 두 획분은 세포내 콜레스테롤 함량에 영향을 미치지 않았으며 헥산획분은 62ug/dish로 control

의 약 85%였다. 부탄올 획분은 52ug/dish로 control의 약 70%였으며 에틸아세테이트 획분은 40ug/dish로 콜레스테롤을 첨가하지 않은 대조군과 거의 동일한 수준으로서 세포내 콜레스테롤 uptake를 현저히 저해하는 것으로 사료되었다.

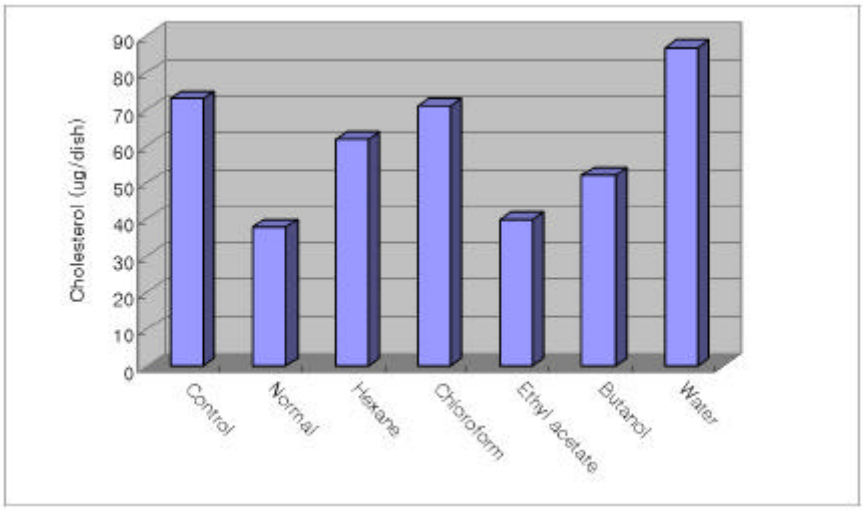


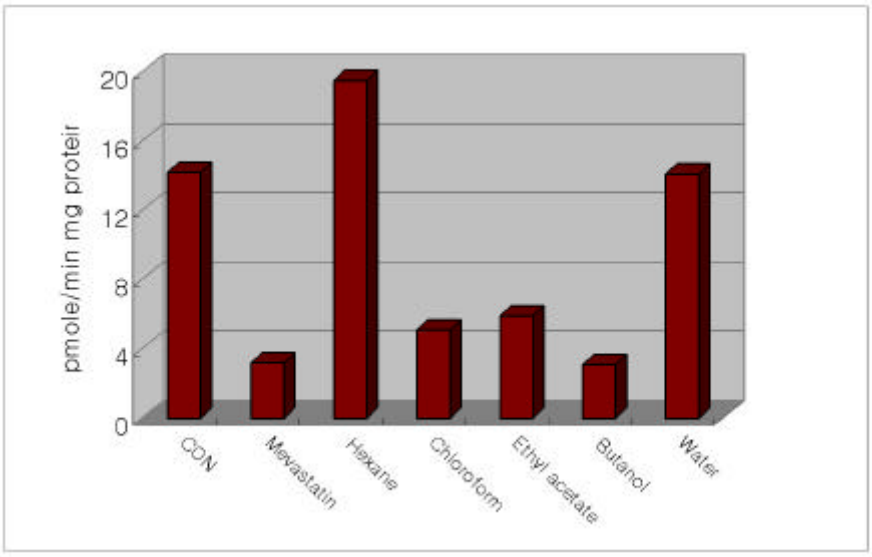
Fig. 2-17 Effect of each solvent fraction of sorghum methanol extract on cholesterol contents of HepG2 cell

라. 각 분획물의 HMG-CoA reductase 억제활성

HepG2 cell에 있어서 수수와 기장 메탄올 추출물의 각 분획물을 첨가하여 배양한 후 cellular microsomal HMG-CoA reductase활성을 분석하였다(Fig. 2-18). DMSO만 첨가한 control은 14 pmole/min.mg.protein인데 비하여 HMG-CoA reductase 저해제로 알려져 있는 mevastatin 첨가의 경우는 약 3.2 pmole/min.mg.protein 정도로서 75%의 저해활성을 나타내었다. 수수메탄올 추출물의 분획별로 보면 헥산 획분과 수용성 획분은 각각 19.5, 14.0

pmole/min.mg.protein으로 control 보다 오히려 높거나 동일한 값을 나타내어 활성이 없는 것으로 나타났다. 그러나 클로르포름 획분 과 에틸아세테이트 획분은 각각 5.1, 5.9 pmole/min.mg.protein으로서 약 64%의 억제활성을 나타내었다. 부탄올 획분은 3.1 pmole/min.mg.protein로 positive control 인 mevastatin과 동일한 매우 강한 활성을 나타내었다. 기장에 있어서(Fig 2-19)는 수용성 획분은 control 보다 높은 값을 나타내어 오히려 효소활성을 촉진하는 것으로 나타났다. 그러나 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 획분은 각각 9.8, 10.0, 10.9 pmole/min.mg.protein으로서 약 29% 전후의 활성을 나타내었다. 또한 기장 클로르포름획분은 1.94 pmole/min.mg.protein으로 약 86%의 저해활성을 보였는데 이는 mevastatin보다 높은 강력한 활성이 있는 것으로 사료되었다.

Fig. 2-18 Effect of each solvent fraction of sorghum methanol extract on microsomal HMG-CoA reductase activity of HepG2 cell


pmole/min mg proteir
20
16
12
8
4
0
CON
Mevastatin
Hexane
Chloroform
Ethyl acetate
Butanol
Water

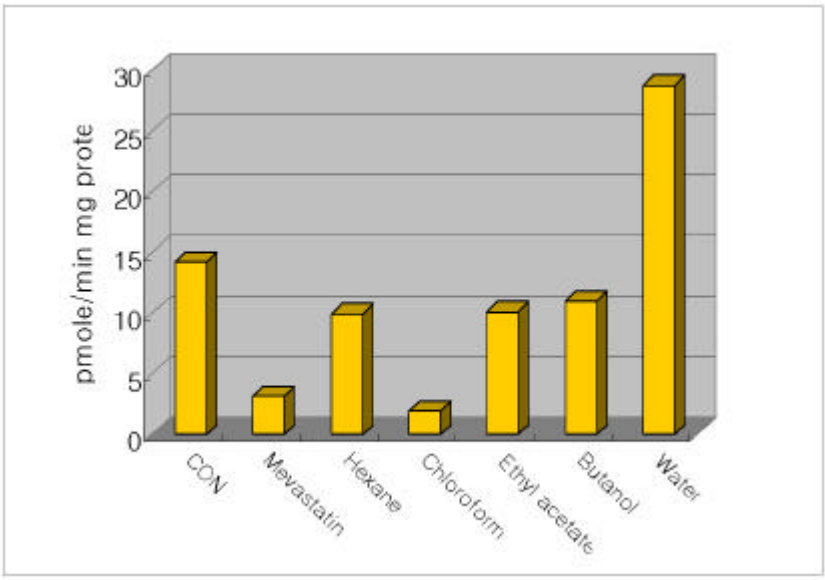


Fig. 2-17 Effect of each solvent fraction of prosomillet methanol extract on microsomal HMG-CoA reductase activity of HepG2 cell

이상 각 분획물이 HMG-CoA reductase**억제활성과 세포내 콜레스테롤** uptake**에 미치는 영향을 검토해 본 결과** rat liver microsomal HMG-CoA

reductase 억제활성과 다소 다른 양상을 보였다. 즉 기장의 경우 rat liver microsomal 계에서는 헥산, 클로르포름, 에틸아세테이트획분이 비슷하게 강한 활성을 보였으나 배양세포계에서는 클로르포름 획분에서 가장 강한 활성이 나타났고 수수에 있어서도 rat liver microsomal계에서는 헥산획분이 매우 강한 활성을 나타낸 반면 배양세포계에서는 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올 획분에서 강한 활성을 나타내었다. 또한 수수의 각분획물이 세포내 콜레스테롤 uptake에 미치는 영향에 관해서도 에틸아세테이트 획분에서 가장 강한 활성을 나타내는 등 rat liver microsomal계와 배양세포계에서 다소 다른 경향을 보였다.

참 고 문 헌

1. Sirtory, C.R.: Pharmacology and mechanism of action of the new

HMG-CoA reductase inhibitors. Pharm. Res., 22, 555 (1990)

2. Qureshi, A.A., Abuirmeileh, N, Din, Z.Z., Elson, C.E. and Burger W.C.: Inhibition of cholesterol and fatty acid biosynthesis in liver enzymes and chicken hepatocytes by polar fractions of garlic. Lipids, 18, 343 (1983)

3. Qureshi, A.A., Burger W.C. Peterson D.M. and Elson, C.E.: Suppression of cholesterogenesis by plant Constituents: review of wisconsin contributions to NC-167. Lipids, 20, 817 (1985)

4. Lee, Y.H., Shin, Y.M., Lee, J.E., Choi, Y.S. and Lee, S.Y.: In vitro screening of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from plant extracts. korean J. Biotechnol. Bioeng., 6, 55 (1991)

5. Park, J.R., Park, J.C. and Choi, S.H.: Screening and characterization of anticholesterogenic substances from edible plant extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26, 236 (1997)

6. Dennis, P. and Michael, S.: Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase synthesis by a non sterol mevalonate derived product in mev-1 cells. J. Biol. Chem., 260, 9949 (1985)

7. Qureshi, A.A., Burger W.C. Peterson D.M. and Elson, C.E.: The structure of an inhobitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley. J. Biol. Chem., 261, 10544 (186)

8. Hardeman, E.C., Endo, A. and Simoni, R.D.: Effects of compactin on the levels of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in compactin-resistant C100 and wild-type cells. Arch. Biochem. Biophys. 232, 549 (1984)

9. Kaneko, I., Hazama-Shimada, Y. and Endo, A.: Inhibitory effects on lipid metabolism in cultured cells of ML-236B, a poteny inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Eur. J. Biochem. 87, 313 (1978)

10. Brown, M.S., Faust, J.R. and Goldstein, J.L.: Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin(ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. J. Biol. Chem., 253, 1121 (1978)

11. Gould, M.R., Anderson, J.W. and O'Mahony, S.: in cereals for foods and beverages. Inglett, G.E., and Munk, L., eds, pp. 447, Academic press, New York (1980)

12. Anderson, J.W., Jones, A.E. and Riddell-Mason, S.: Ten different dietary fibers have significantly different effects on serum and liver lipids of cholesterol-fed rats. J. Nutr., 124,78 (1994)

13. Kahlon, T.S., Chow, F.I., Sayre, R.N. and Betschart, A.A.: Cholesterol-lowering in hamsters fed rice bran at various levels, defatted rice bran and rice bran oil. J. Nutr, 122, 513 (1992)

14. Ullrich, I.H.: Evaluation of high-fiber diet in hyperlipidemia: A review. J.Am.Col.Nutr., 6, 19 (1985)

15. Kahlon, T.S., Saunders, R.M., Sayre, R.N., Chow, F.I., Chiu, M.M. and Betschart, A.A.: Cholesterol-lowering effects of rice bran and rice bran oil fractions in hypercholesterolemic hamster. Cereal Chem., 69, 485 (1992)

16. Kahlon, T.S., Chow, F.I., Knuckles, B.E. and Chiu, M.M.: Cholesterol-lowering effects in hamsters of β-glucan-enriched barley fraction, dehulled whole barley, rice bran and oat bran and their combinations. Cereal chem., 70, 435 (1993)

17, Qureshi, A.A., Burger, W.C., pretice, N., Bird, H.R. and Sunde, M.L.: Regulation of lipid metabolism in chiken liver by dietary cereals supplemented with culture filtrate of *Trichoderma Viride* J. Nutr, 110, 388 (1980)

18. Choi, Y.S., Ahn C., Shim, H.H., Choe, M., Oh, S.Y. and Lee, S.Y.: Effects of instant buckwheat noodle on digestibility and lipids profiles of liver and serum in rats. J. Korean Soc. Food Nutr., 21, 478 (1992)

19. Choi, Y.S., Sur, J.H., Kim, C.H., Kim, Y,M, Ham, S.S. and Lee, S.Y.: Effects of dietary buckwheat vegetables on lipid metabolism in rats. J. Korean Soc. Food Nutr., 23, 212 (1994)

20. Park, Y.J., Lee, Y.S. and Suzuki, H.: Effect of Coix on plasma cholesterol and lipid metabolism in rats, Korean J. Nutr., 21, 89 (1988)
21. Kleinsek, D.A. Dugan, R.E., Baker, T.A. and Porter J.W.:

3- hydroxy- 3- methylglutaryl coenzyme A reductase from rat liver. Methods in enzymology, 71, 462 (1981)

22. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and randall, R.J.: Protein measurement with Folin phenol reagent . J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)

제 3 장 *in vivo* 계에서 고활성 곡류의 콜레스테롤 상승억제 효능 검토

국민영양조사 결과에 의하면 근년의 우리나라 식생활 패턴은 곡류 섭취가 현저히 감소되고 반대로 지방 섭취량이 현저히 증가하고 있다. 역학조사 결과 곡류의 섭취가 많은 지역에서는 혈청 콜레스테롤 수준이 낮고 그에 따른 심질환 발생율이 현저히 낮다고 보고되었으며 이후 동맥경화증의 제 1 위험인자로 알려진 혈청 콜레스테롤 수준과 곡류섭취와의 관련성에 대한 관심이 높아졌다. 또한 이러한 곡류의 콜레스테롤 저하작용은 주로 식이섬유 특히 수용성 식이섬유의 작용에 기인한다고 보고되어 왔다. 그러나 곡류 혼합식이가 콜레스테롤 대사에 미치는 영향에 대한 결과에는 논란의 대상이 되고 있다. 예를 들면 백미에 비하여 식이섬유 함량이 높은 현미는 혈중 콜레스테롤 농도에는 영향을 미치지 않았으나 간장중 콜레스테롤 함량은 감소시켰다는 보고가 있는 반면 rice bran oil이나 rice bran은 흰쥐 및 햄스터의 혈중 콜레스테롤을 유의하게 감소시킨다는 보고도 있다. 또한 수용성 식이섬유가 풍부한 보리, 귀리, 호밀을 섭취시킨 실험동물에서 혈장 콜레스테롤의 감소, 콜레스테롤 대사산물의 배설증가로 endogenious 콜레스테롤이 증가할 것으로 예상하였으나 이와는 반대로 간에서 콜레스테롤 합성이 감소되는 것으로 나타났다. 따라서 곡류 특히 보리에는 HMG-CoA reductase활성에 직접적인 저해효과를 가진 물질이 존재하여 식이섬유에 의한 콜레스테롤 상승억제 작용을 배가시켜주는 것으로 인식되었다. 곡류에는 이와 같은 섬유소 외에도 혈청 콜레스테롤을 저하시키는 것으로 메밀의 rutin, 율무성분 등이 보고되고 있다.

본 장에서는 제2장 *in vitro* 실험에서 활성이 높았던 3곡류 수수, 흑미, 기장에 대하여 고콜레스테롤 식이 및 고지방식이 모델에서 콜레스테롤을 비롯한 지질저하 효과여부를 검토하였다.

제1절 수수가 High-cholesterol 식이모델 흰쥐의 체내 지질함량에 미치는 영향

1. 실험재료 및 방법

가. 실험군, 식이조제 및 동물의 사육

동물실험용 흰쥐는 200g 전후의 SD계 숫컷 흰쥐를 대한실험동물센터로 구입하여 일주일간 일반고형사료로 환경에 적응시킨 후 초기체중이 동일하도록 무작위로 각군 8-10마리씩 4개의 실험군으로 나누었다. 즉 정상식이군, 고콜레스테롤 식이 대조군, 0.4% 수수메탄올 추출물군, 0.8% 수수메탄올 추출물군의 4 실험군으로 나누었다.

실험식이는 각 실험군에 따라 Table 3-1과 같은 구성으로 혼합하여 6종류를 조제하였는 데 식이중 탄수화물은 60%, 단백질 20%, 지방 10%, 비타민 mix. 1%, 무기질 mix 3.5%, 섬유질 5%되도록 첨가하였으며 비타민mix.와 무기질mix.는 AIN-76의 조성을 이용하였다. 또한 각 식이의 열량은 약 4100 kcal/kg이었고 식이와 물은 자유로이 섭취케하여 4주간 사육하였으며 체중과 식이섭취량을 측정하였다

나. 시료 채취

분변중 총 콜레스테롤 및 담즙산 배설량을 측정하기 위하여 분변은 마지막 4일동안 수거하여 분석시까지 - 70℃에 보관하였다. 실험식이가 끝난 후, 동물을 에테르로 마취시킨 뒤 개복하여 복부대동맥으로부터 혈액을 채취하고, 간장, 신장등 각조직을 적출하였다.

혈액은 실온에서 2시간 방치한 후 2500 rpm으로 원심분리하여 혈청을 얻었고, 각조직은 trimming 후 무게를 재고 사용시까지 -70℃에서 보관하였다.

Table 3-1. The composition of experimental diet (g/1000 g diet)

Ingredient	Normal	Control	0.3%-extract	0.8%-extract
Casein	200	200	200	200
Soybean oil	50	50	50	50
Shortening	50	50	50	50
Mineral mix.	35	35	35	35
Vitamin mix.	10	10	10	10
Choline	2	2	2	2
Cholesterol	-	5	5	5
Taurocholate	1.2	1.2	1.2	1.2
Methionine	3	3	3	3
Cellulose	50	50	50	50
Sucrose	93.8	93.8	93.8	93.8
Corn starch	506.2	500	500	500
Sorghum-ext	-	-	3	8
Kcal/ 1000g	4100	4075	4075	4075

다. 시료 분석

1) 지질 분석

혈청중 총지방함량과 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지방의 각종 지질함량은 효소키트를 이용하여 분석하였다. 간조직의 각종 지질함량은 $CHCl_3$/MeOH (2/1)로 추출한 후 총지질함량은 무게차에 의하여 측정하였고 콜레스테롤과 중성지방을 분광학적으로 측정하였다.

2) 변의 담즙산 분석

분변중의 담즙산 분석은 동결된 상태에서 변을 건조하고 분쇄하여 무게를 측정한 후 약 500 mg 정도를 사용하여 DeWeal 등의 법으로 담즙산을 추출한 뒤 효소법으로 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 체중의 변화

Fig. 3-1 에 사육기간중 체중의 변화를 나타내었다. 초기체중 299g에서 사육 8일까지는 각군에 따른 체중의 변화가 없었으나 사육이 끝날 무렵에는 정상군에 비하여 콜레스테롤 투여 대조군이 높은 체중을 나타내었고 수수추출물 첨가군은 대조군보다도 다소 높은 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다.

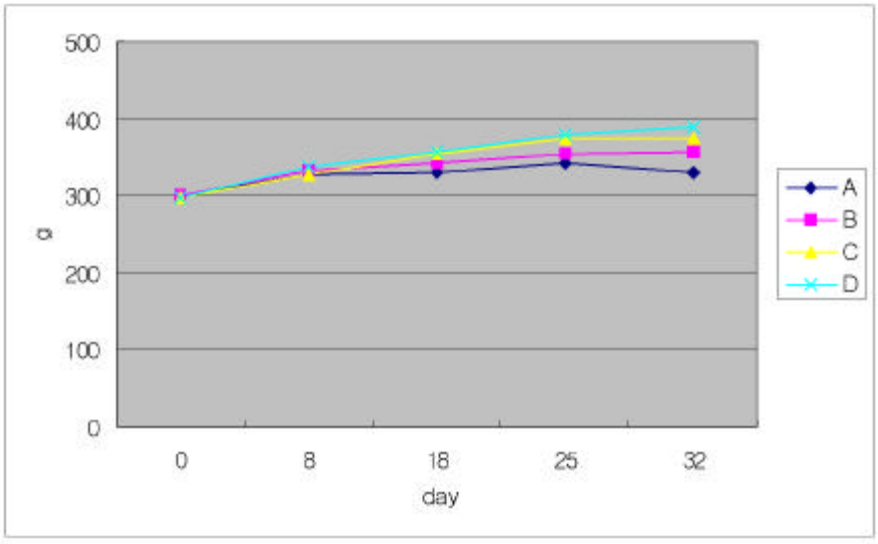


Fig. 3-1 Changes in body weight of experimental rats

(A:nomal, B:control, C:0.3% ext, D:0.8% ext.)

나. 혈청 지질 함량의 변화

콜레스테롤 공급식이와 동시에 수수추출물의 농도를 달리하여 사육한 뒤 혈청중의 각 지질함량을 측정한 결과를 Table 3-2에 나타내었다. 우선 총지질함량을 보면 콜레스테롤 공급 대조군은 유의하게 증가하였고 0.3% 수수추출물 첨가군은 대조군보다 유의하게 감소하였다. 혈청중 중성지방함량은 콜레스테롤 대조군은 정상군에 비하여 유의하게 증가하였으나 콜레스테롤 첨가군간에는 유의적인 차이가 없었다. total cholesterol함량도 콜레스테롤 첨가에 의하여 유의하게 증가하였으나 0.3% 수수추출물을 첨가함에 따라 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 그러나 고농도의 0.8% 수수추출물 첨가군에서는 오히려 혈중 콜레스테롤이 증가하였다. 또한 콜레스테롤을 첨가한 대조군의 HDL-cholesterol함량은 정상군에 비하여 유의하게 감소하였으며 수수추출물 고농도 투여에서는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으나 0.3% 수수추출물군은 대조군과 유의차는 없었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 성숙쥐에 있어서 콜레스테롤을 식이에 첨가하면 혈청중 중성지방, 총콜레스테롤 및 총지방함량이 증가하나 수수추출물을 투여하면 혈중 특히 총콜레스테롤 함량과 총지방함량의 상승을 유의하게 억제한다는 것을 알 수 있었다. 그러나 고농도 투여에 의해서는 오히려 혈중 총콜레스롤을 비롯한 총지질함량을 증가시킬 가능성이 시사되어 투여농도가 중요한 것으로 판단되었다.

Table 3-2. Effect of sorghum methanol extracts on the concentrations of serum lipids of rats fed high cholesterol diets

Group	Total lipid	HDL cholesterol	Total cholesterol	Triglyceride
		(mg/100ml)		
A	345.95±9.10c	60.74±2.96a	69.03±2.56c	44.81±3.72
B	467.04±24.91a	51.50±1.72b	106.29±5.82ab	56.91±5.68
C	384.35±10.98bc	45.88±2.24b	93.92±2.64b	51.53±4.73
D	425.46±20.85ab	37.63±1.70c	114.13±5.68a	55.45±3.78

(A:nomal, B:control, C:0.3% sorghum ext, D:0.8% sorghum ext.)

다. 신장, 간장의 무게 및 총지질함량

주요장기인 신장과 간장의 무게를 보면(Table 3-3) **콜레스테롤 투여 대조군은 정상군에 비하여 유의하게 높은 값을 나타내었고 수수추출물군은 대조군과 유의차가 없었다. 간장 조직중의 총지질함량을 보면 콜레스테롤 투여 대조군은 정상군에 비하여 유의적으로 높은 값을 나타내었으나** 0.3% **수수추출물군은 유의차는 없었으나 약간 낮은 경향을 나타내었다. 또한 간장 콜레스테롤과 중성지방량에는 수수첨가에 의한 영향이 거의 없는 것으로 나타났다.**

Table 3-3. Effect of sorghum methanol extracts on the weight of liver, kidneys and liver total lipid of rats fed high cholesterol diets

Group	Kidney weight	Liver weight	Liver total lipid
			(mg/g liver)
A	1.92±0.036b	9.38±0.237b	42±0.12b
B	2.19±0.060a	12.03±0.200a	107±0.67a
C	2.22±0.089a	12.21±0.135a	101±0.69a
D	2.22±0.059a	12.11±0.357a	110±0.91a

(A:nomal, B:control, C:0.3% sorghum ext, D:0.8% sorghum ext.)

라. 분변중의 콜레스테롤 및 담즙산의 배설량 변화

사육 마지막 4일간 배설되는 분변량과 담즙산의 함량 및 콜레스테롤 함량을 측정한 결과(Table 3-4, 5, Fig.3-2) 4일간 배설된 분변량은 정상군과 고콜레스테롤식 대조군사이에는 차이가 없었으나 0.3% 수수추출물 첨가군은 대조군보다 유의하게 증가하였다. 또한 하루에 대설되는 분변중 cholesterol함량의 변화를 보면 고콜레스테롤식 대조군은 정상군의 2배이상

높은 값을 나타내었고 0.3% 수수추출물 첨가군은 대조군보다도 약1.5배 증가하였다. 그러나 수수추출물간에는 농도차이에 따른영향이 없었다. 또한 담즙산 배설량의 변화를 보면 고콜레스테롤식 대조군은 정상군의 3배이상 높은 값을 나타내었고 수수추출물 첨가군은 대조군보다도 유의하게 증가하였다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때 수수추출물을 첨가하면 분변중으로 콜레스테롤 및 담즙산의 배설을 촉진시키는 작용이 있는 것으로 판단되었다.

Table 3-4. Effect of sorghum methanol extracts on the fecal cholesterol and weight of rats fed high cholesterol diets

Group	Fecal cholesterol		Fecal weight	
	mg/fecal g	mg/day	Dry (g/4days)	Wet (g/4days)
A	3.69±0.337	4.95±0.550	5.41±0.460	6.70±0.520
B	8.94±0.464	11.86±0.496	5.38±0.294	6.87±0.466
C	9.37±0.707	15.67±1.828	6.65±0.531	8.57±0.430
D	11.83±1.123	15.87±2.365	5.25±0.377	0.34±0.605

(A:nomal, B:control, C:0.3% sorghum ext, D:0.8% sorghum ext.)

Table 3-5. Effect of sorghum methanol extracts on excretion of fecal bile acids of rats fed high cholesterol diets

Group	Bile acid	
	mg/fecal g	mg/day
Normal	6.41±0.24c	8.79±0.86c
High-cholesterol control	23.69±2.43b	30.23±2.68b
0.3% sorghum ext.	25.78±0.72ab	41.96±3.93a
0.8% sorghum ext.	30.84±1.89a	39.74±1.90a

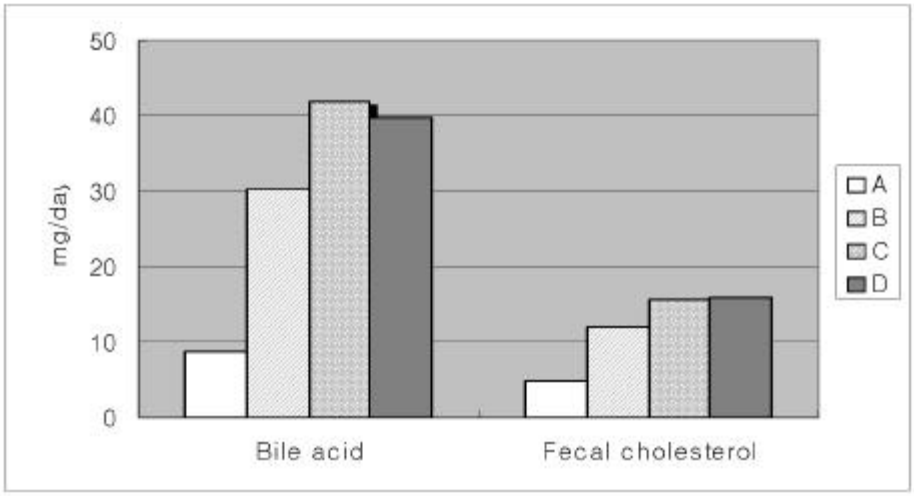


Fig. 3-2 Effect of sorghum methanol extracts on the excretion of fecal bile acid and cholesterol of rats fed high cholesterol diets

이상 수수메탄올 추출물이 고콜레스테롤 식이 모델 흰쥐의 지질함량에 미치는 영향을 조사한 결과를 종합해 보면, 수수 메탄올 추출물은 분변중의 콜레스테롤 및 담즙산의 배설을 증가시킴으로서 식이성 콜레스테롤에 의한 혈중 콜레스테롤의 상승을 억제하는 것으로 사료되었다.

제 2절 흑미가 high-fat 식이모델 흰쥐의 체내 지질함량에 미치는 영향

1. 실험재료 및 방법

가. 흑미시료의 조제

40매쉬로 분쇄한 흑미에 시료중량 10배의 80% 메탄올을 가하여 shaker에서 회전속도 200rpm에서 하룻밤 동안 shaking 하여 추출한 다음 여과(Toyo No. 2)하였다. 침전물에 다시 시료중량의 5배의 80% 메탄올을 가하여 3시간 추출하여 여과하였다. 여액을 모아 다시한번 여과한 다음 여액을 rotary evaporater로 감압농축한 뒤 동결건조시켜 시료로 사용하였다.

나. 실험식이 및 동물의 사육

실험동물(SD rat, 4주령)은 흰쥐사육용 케이지에 한마리씩 넣어 일반고형사료로 일주일간 환경에 적응시킨 다음 체중에 따라 난괴법에 의하여 5군으로 나누었다. 고지방식이를 급여한 대조군, 고지방식이에 흑미 메탄올 추출물

0.5% 또는 1% 되게 첨가한 군과, 흑미분말을 15%, 30% 첨가한 군으로 하였다. 실험식이는 AIN-76 diet조성을 참고로 하여 Table 3-6과 같이 조성하였다. 즉 casein을 20%로 하였고, 지방급원으로서는 lard를 첨가한 고지방식이로 하였으며 비타민과 미네랄은 AIN-76 mixture를 이용하였다. 실험식이와 물은 자유로이 섭취케 하고 식이섭취량은 매일 측정하였으며 체중은 매주 일정한 시간에 측정하여 5주간 사육하였다.

Table 3-6. Compositions of experimental diets (g/1000 g diet)

Ingredient	Control (high-fat/ sucrose)	0.5% ext	1.0% ext	15% powder	30% powder
Casein	200	200	200	190	180
DL-Met	3	3	3	3	3
Starch	150	150	150	13	26
Sucrose	400	400	400	400	250
Cellulose	50	50	50	50	50
Lard	100	100	100	100	100
Corn oil	50	50	50	47	44
Min Mix	35	35	35	35	35
Vit Mix	10	10	10	10	10
Choline	2	2	2	2	2
BR-ext		5	10		
BR-Pow				150	300

다. 시료 채취

사육이 끝난 실험동물은 12시간 동안 절식시킨 뒤 dithyl ether로 마취시키고 복부대동맥으로 혈액을 채취하고 간장, 신장, 비장을 적출하였다. 채취한 혈액은 2500 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었고 적출한 장기는 생리식염수 냉용액으로 가볍게 씻은 후 trimming 하여 무게를 잰 뒤 분석시까지 -70℃에서 보관하였다. 담즙산 및 지질배설을 측정하기 위한 분변은 마지막 3일간의 량을 수거하여 - 70℃에서 냉동보관하였다가 동결건조후 분쇄하려 사용하였다.

라. 혈청과 간장의 지질함량 분석

혈청중 각종 지질함량은 효소법을 이용한 각각의 검사 kit(Eiken, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 중성지방은 Triglyzyme-V, 총콜레스테롤은 Cholestezyme-V, HDL-콜레스테롤은 으로 각각 측정하였다.

간장의 지질은 Folch 등의 방법으로 추출하여 총콜레스테롱은 Pearson 등의 방법으로 TG는 Sale 등의 방법을 참고로 하되 chloroform에 용해된 지질추출물을 일정량 시료로 취하여 N2 gas로 건조시킨 후 triton X-100 과 ethanol에 용해시킨 후 효소법에 의한 kit를 사용하여 정량하였다.

마. 분변중 지질 및 담즙산의 분석

분변중 담즙산과 콜레스테롤의 분석은 냉동건조하여 분쇄한 분변시료 200 mg을 시료로 채취하여 DeWeal 등의 방법에 의해 곱게 분쇄한 뒤 KOH 용액을 1 ml를 넣어 3시간 autoclave한 다음 20% NaCl 용액 1 ml을 첨가하고 에테르 20 ml로 2회 추출하고, 하층액에 c-HCl 0.2 ml를 첨가하여 에테르 20 ml씩 가하여 4회 추출하였다. 수집한 상등액을 감압 농축시킨 후 액체질소로 완전히 건조시켜 MeOH:H_2O(5:1, v/v) 혼합액에 용해시켜 일정량을 시료로 취하여 효소 kit(Kyokudo, Tokyo, Japan)를 이용하여 정량하였으

며 Cholesterol은 Pearson 등의 방법에 의해 550 nm에서 정량하였다.

바. 통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차로 표시하였으며 통계처리는 SAS program을 이용한 ANOVA와 Duncan Multiple range test로 각 군간의 차이에 대한 유의도성을 검증하였다($p< 0.05$)

2. 결과 및 고찰

가. 체중의 변화와 식이효율

고지방식이에 흑미 추출물 및 분말을 급여한여 5주간 사육한 후 체중의 변화와 식이섭취량, 식이효율을 Table 3-7에 나타내었다. 우선 사육기간중의 체중의 변화를 보면 대조군의 체중증가량이 가장 높았고 실험군간에는 통계적인 유의차는 없었으나 흑미 추출물 및 15% 흑미 분말 투여군에서는 대조군에 비하여 유의하게 낮은 값을 나타내었다. 사료섭취량은 분말섭취군이 약간 낮은 경향을 나타내었다. .

Table 3-7. Effect of dietary black rice on the growth of rats fed high fat diet.

	Initial BW(g)	Weight gain(g)	Total intake(g)	FER
High fat control	281.1±6.16ns	167.7±5.74a	821.4±14.5ns	0.18±0.01ns
0.5% extract	281.0±4.11	163.0±9.27a	823.2±15.77	0.20±0.01
1% extract	281.3±7.34	167.8±6.49a	812.4±9.52	0.21±0.01
15% powder	281.4±4.64	154.4±6.56b	796.1±6.99	0.19±0.01
30% powder	281.5±4.48	164.2±10.04a	809.2±6.7	0.20±0.01

나. 각 장기의 무게

Table 3-8에는 고지방식이에 흑미추출물 및 흑미분말을 첨가하여 사육한 뒤 각종 장기의 무게변화를 나타내었다. 간장의 무게는 1% 추출물군에서 가장 높았고 나머지는 거의 비슷하였으며 통계적인 유의차는 없었다. 신장, 비장 및 심장의 무게에 있어서도 실험식이군과 대조군이 거의 비슷하여 흑미 투여에 의한 차이가 없었다. 한편, 해부시 관찰에 의하면 간장의 색깔이 흑미의 섭취에 호전되는 경향을 보였다.

Table 3-8. Effect of dietary black rice on various organ weight of rats fed high fat diets

	Liver	Kidney	Spleen	Heart
				(g)
High fat control	14.87±0.28rs	2.86±0.14rs	1.10±0.07rs	1.25±0.02rs
0.5% extract	14.17±0.63	2.89±0.12	1.17±0.08	1.25±0.02
1% extract	15.57±0.46	2.97±0.07	1.15±0.06	1.32±0.23
15% powder	14.75±0.44	2.79±0.07	1.09±0.06	1.28±0.01
30% powder	14.62±0.73	3.00±0.10	1.05±0.05	1.29±0.04

다. 혈청 지질 함량

흑미 추출물 및 분말 급여에 따른 혈청 중성지방 (TG), **총 콜레스테롤** (T-Chol)**과** HDL-Chol **함량의 변화를** Table 3-9**에 나타내었다. 혈청중 총 콜레스테롤 함량은 고지방식 대조군에서 현저히 높았으며 흑미 첨가에 의하여 감소하는 경향이었고 특히** 15% **흑미분말 첨가시는 현저하게 감소하였다. 중성지방은 추출물 첨가시 감소하는 경향을 보였으나 분말 첨가시는 대조군과 거의 비슷한 값을 보였고 실험군간에 통계적 유의차는 없었다. 한편,** HDL-cholesterol**은 대조군에 비하여 흑미투여군에서 증가하는 경향을 보여 흑미를 섭취함으로서 혈중 콜레스테롤 함량이 개선되는 경향이 있는 것으로 사료되었다.**

Table 3-9. Effect of dietary black rice on the contents of serum lipids of rats fed high fat diets.

	Triglyceride	Cholesterol	HDL cholesterol
		(mg/dl)	
High fat control	131.84±14.15rs	95.07±6.41rs	54.96±7.09rs
0.5% extract	124.92±22.01	90.45±19.60	58.90±11.02
1% extract	121.08±36.27	84.59±21.02	53.68±8.30
15% powder	132.17±35.20	80.96±23.61	60.73±12.40
30% powder	134.25±28.67	87.37±11.79	58.68±7.25

라. 혈청 GOT 및 GPT 활성의 변화

Table 3-10 **에는 흑미 추출물 및 분말 급여에 따른 혈청** GOT **및** GPT**활성의 변화를 나타내었다. 표에서 보는 바와 같이** GOT**활성은** 0.5% **추출물 투여군은 고지방식 대조군과 차이가 없었으나** 1% **추출물 첨가군에서는 유의하게 낮은 값을 나타내었다. 분말 투여군에서도 대조군에 비하여 낮은 값을 나타내었다.** GPT**활성에는 흑미추출물 및 분말 투여에 따른 변화가 없었다.**

Table 3-10. Effect of dietary black rice on the activities of serum GOT and GPT of rats fed high fat diets.

	GOT	GPT
	(karmen)	
High fat control	19.02±3.09ab	30.97±4.55ns
0.5% extract	20.60±4.58a	29.60±4.25
1% extract	15.36±3.91b	32.11±5.23
15% powder	16.39±6.50ab	33.54±7.26
30% powder	16.57±5.01ab	31.96±7.97

마. 간장 지질 함량

Table 3-11 **에는 흑미의 첨가가 고지방식이 섭취 흰쥐의 간장 콜레스테롤과 중성지방에 미치는 영향을 나타내었다. 총 콜레스테롤 함량은 대조군에 비하여 실험군에서 현저하게 낮은 값을 나내었고 통계적 유의차가 있었으며 실험군간에는 특히** 1% **추출물군 및** 30% **분말군이 더 낮은 값을 나타내어 추출물 및 분말의 첨가농도가 높을수록 더 뚜렷하였다. 중성지방의 함량에 있어서도 흑미 첨가군이 대조군에 비하여 유의하게 낮은 값을 나타내었고 실험군간에서는 추출물 첨가군이 분말첨가군보다 더 뚜렷하게 감소하였다. 이상의 결과로 볼 때 흑미의 섭취는 체내 지질함량을 감소시키는 효**

과가 있는 것으로 사료되며 특히 간장의 지질함량을 감소시키는 효과가 뚜렷한 것으로 나타났다.

Table 3-11. Effect of dietary black rice on the contents of liver lipids of rats fed with high fat diets.

	Cholesterol	Triglyceride
		(mg/g.liver.wet.wt)
High fat control	3.96±0.10a	19.52±0.74a
0.5% extract	3.32±0.07ab	16.12±1.41ab
1% extract	2.98±0..08b	14.71±1.13b
15% powder	3.48±0.09ab	16.51±0.64ab
30% powder	3.02±0.13b	16.85±1.29ab

마. 분변 중의 콜레스테롤, 중성지방 및 담즙산 배설

흑미의 섭취가 분변량 및 분변중 담즙산 배설량, 콜레스테롤과 중성지방 배설량에 미치는 영향을 Table 3-12 에 나타내었다. 분변 배설량을 보면 30% 분말군에서 대조군과 다른 실험군에 비하여 유의하게 높았으나 다른 군간에서는 유의차가 없었으며 담즙산의 배설량은 추출물군에서 약간 높은 경향을 보였으나 역시 군간에 유의차는 없었다. 중성지방의 함량에 있어서는 30% 분말군에서 대조군과 다른 실험군에 비하여 유의하게 높았으며 콜레스테롤 배설량도 중성지방량과 유사한 경향을 보였다. 이러한 점으로 미

루어 볼 때 흑미 섭취시 나타나는 간장에서의 지질함량의 감소는 분변중의 담즙산 및 지질배설에 의한 것은 아닌 것으로 사료되며 이에 대해서는 더 자세한 연구가 요구된다.

Table 3-12. Effect of dietary black rice on the excertion of feccal bile acid, cholesterol and triglyceride of rats fed high fat diets.

	Fecal Weight	Bile acid	Triglyceride	Cholesterol
	(g/day)	(mg/day)	(mg/day)	(mg/day)
High fat control	2.86±0.09b	10.14±1.69rs	6.28±0.32b	13.95±1.18b
0.5% extract	3.20±0.29b	11.93±1.98	6.66±1.01b	16.90±1.70a
1% extract	2.83±0.10b	11.78±0.35	6.41±0.21b	13.20±1.21b
15% powder	2.93±0.17b	10.55±1.87	6.72±0.41b	13.10±1.75b
30% powder	3.98±0.24a	10.91±1.51	8.41±1.03a	16.74±0.24a

제 3절 기장이 흰쥐의 체내 지질함량에 미치는 영향

I. High-fat 식이모델

1. 실험재료 및 방법

가. 식이조제 및 동물의 사육

조제식이의 구성은 6 개의 실험군 수와 같이 6종류를 Table 3-13과 같은 구성으로 혼합하여 조제하였다. 실헌식이에 첨가한 기장(곡류)성분은 메타놀추출물의 형태와 분말의 형태의 2종을 사용하였다. 기장추출물은 70-75%의 methanol로 추출한 후 다시 diethyl ether로 처리한 부분을 감압농축하여 제조하였고, 분말은 300-400 mesh로 분쇄하여 사용하였다. 조제식이의 기본을 지방을 15%(w/w)으로 하는 고지방식이를 대조군(control)과 4종류의 실험군 (기장추출물 섭취 2군과 기장분말 섭취군 2군)에게 주었으며 이러한 고지방식이 자체와 비교하기 위하여 지방을 5%(w/w)을 포함하는 normal 식이를 하나 더 조제하여 그 해당하는 동물에게 급이하였다. 6종의 식이 중에 탄수화물은 60-65%, 단백질 20%, 비타민 mix 1%, 무기질 mix 3.5%, 섬유소 5%로 되도록 하였다. 기장분말을 사용한 실험군에서는 기장에 들어 있는 단백질과 섬유소양을 참작하여 casein과 cellulose의 양을 첨가하였다.

사용한 동물은 이유한지 4주되는 100 g 내외의 Sprague-Dawley 숫쥐를 대전의 생명공학연구소로부터 분양을 받아 4-5일 환경에 적응시킨 후 군당 8-9 마리를 배정하여 해당 조제식이를 주어 4주간 사육하였다.

Table 3-13 . Compositions of experimental diets (g/1000 g diet)

Ingredient	Normal (low fat/ starch)	Control (high-fat/ sucrose)	1% ext	0.3% ext	20% powder	70% powder
Casein	200	200	200	200	177	121
DL-Met	3	3	3	3	3	3
Starch	650	150	150	150	0	0
Sucrose	0	405	405	405	405	0
Cellulose	50	50	50	50	46	37
Lard	0	95	95	95	95	95
Corn oil	50	50	50	50	46	35
Min Mix	35	35	35	35	35	35
Vit Mix	10	10	10	10	10	10
Choline	2	2	2	2	2	2
Proso-ext			10	3		
Proso -Powder					200	700
Kcal/ 1000g	3850	4330	4240	4240	4080	4080

나. 성장 및 식이효율 조사

조제 실험식이로 4주간 사육하는 동안 1-2일 간격으로 체중의 변화와 먹이섭취량을 측정하였고, 그로부터 사료효율을 환산하였다.

다. 시료 채취

담즙산 배설을 측정하기 위한 분변은 마지막 2주 동안 수거하여 - 50℃에 분석시까지 보관하였고, 4주 식이가 끝난 후, 동물을 에테르로 마취시킨 뒤 개복하여 심장으로부터 혈액을 채취하고, 간조직을 saline으로 perfusion으로 세척한 후 떼어내었다.

혈액은 상온에 두었다가 2500 rpm으로 원심분리하여 혈청을 얻었고, 간조직은 0-4℃의 buffer A(인산완충용액, pH 7.0, 50 mM, sucrose 0.2 M, dithiothreitol 2 mM)로 세척, homogenize하거나 (HMG-CoA reductase 활성 측정용) TEDKSF buffer (pH 7.4, Cholestero 7-alpha hydoxylase 활성 측정용) 로 homogenize 하여 단계적 원심분리하여 마지막으로 100,000g에서 60분간 원심분리하여 얻은 microsome pellet을 액체 질소로 동결시켜 -70 ℃에 보관하였다. Microsome 분획을 분리할 때, 같이 얻은 cytosol분획도 역시 -70 ℃에 보관하였다.

라. 시료 분석

1) 지질 분석

혈청과 간에서 콜레스테롤과 중성지방을 효소키트를 이용하여 분석한다. 간조직의 시료준비시에는 $CHCl_3$/MeOH (2/1)로 추출하여 콜레스테롤과 중성지방을 분광학적으로 측정하였다.

2) 변의 담즙산 분석

동결된 상태에서 변을 건조하고 분쇄하여 무게를 측정한 후 약 500 mg 정도를 사용하여 DeWeal 등의 법으로 담즙산을 추출하고 효소법으로 측정하

였다.

3) 간장 HMG-CoA reductase과 Cholesterol 7-alpha hydroxylase 및 G6PDH 활성과 단백질 측정

2장에서 확립한 radiochemical assay법을 사용하여 측정하였다. Microsome내의 HMG-CoA reducatse 활성과 Cholesterol 7-alpha hydroxylase 활성은 반응 후 생성된 mevalonate-lactone 및 7-alpha hydroxycholesterol을 TLC로 분리하여 scintillation counter를 이용하여 측정하고. G6PDH는 cytosol에서 분광학적 방법으로 측정하였다. 단백질 함량은 Lowry법에 따라 분광학적으로 측정하였으며, 이 때 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 체중의 변화와 식이효율 및 간장조직의 무게

Fig. 3-3에 사육기간동안 6군의 체중의 변화를 나타내었다. 초기에서부터 체중이 다소 낮았던 0.3% M-ext군과 20과 70% 기장분말군이 끝까지 체중이 다소 작았으나 성장에는 큰 문제가 없었던 것으로 보인다. 그러나 Table 3-14에서 나타난 바와 같이 역시 그 3군의 체중 증가가 normal, control 그리고 1% M-ext군에 비하여 10g 내외로 적었다. 이것은 먹이섭취량이 적은데 어느 정도 기인하는 것으로 식이효율에서는 큰 차이가 없었다.

간조직의 무게를 체중 100 g당 환산하였을 때, 고지방 대조군인 control군이 가장 높았고, 기장의 methanol 추출물을 섭취하거나 기장 분말을 섭취한 4군은 저지방 normal군과 같은 수준이었다.

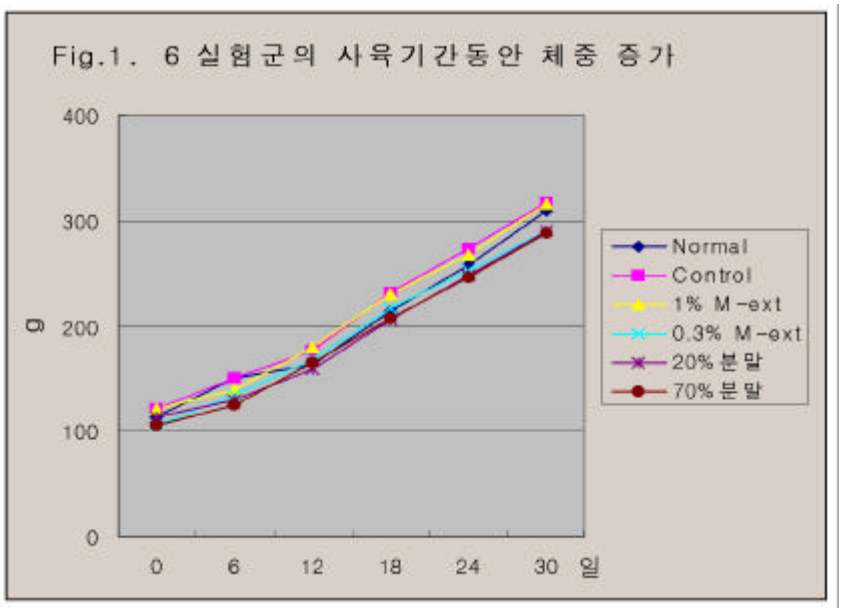


Fig 3-3. Changes of body weight during experimental period

Table. 3-14 Effect of dietary prosomillet on growth of rats fed high fat diet

	Normal	Control	1% M-ext	0.3% M-ext	20% powder	70% powder
Initial(g)	114	122	123	106	114	106
Final(g)	309	318	316	290	291	289
Gain(g)	195	196	193	184	177	183
Food intake(g)	18.6	17.7	17.8	17.7	17.8	16.3
FER	0.39	0.41	0.40	0.39	0.37	0.42
Liver wt. (g/100g bw)	4.51	4.81	4.51	4.59	4.49	4.14

나. 혈청의 지질 함량

Fig. 3-4에 6개의 실험군의 혈청 중성지방 (TG), 총 콜레스테롤 (T-Chol)과 HDL-Chol 수준을 나타내었다. Fig.에서 보는 대로 혈청 TG는 고지방/설탕식이를 한 Control군에서 가장 높은 경향이었고, 기장의 methanol추출물을 섭취하거나 기장 분말을 섭취한 군은 Control군 보다 낮아 저지방/전분식이를 한 Normal군과 같거나 낮은 수준이었다. 특히 Control과 같은 고지방.설탕식이를 한 methanol추출물(M-ext) 섭취군에서 낮은 것이 중요하다 하겠으며 0.3% M-ext군은 70% 기장 분말 섭취군과 함께 가장 낮은 수준이었다. 그러나 혈청 총 콜레스테롤은 70% 기장 분말 섭취군이 타군들에 비하여 높았다. 또한 methanol 추출물 섭취군들도 Control군 보다 높은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. HDL-Chol도 T-Chol 수준과 같은 경향이었으며 이 두 값으로부터 산정된 HDL-Chol/T-Chol의 비는 Table 3-15

에서 보는 바와 같이 저지방/전분식이를 한 Normal군이 단연히 높고 다른 군들간에는 차이가 없었다.

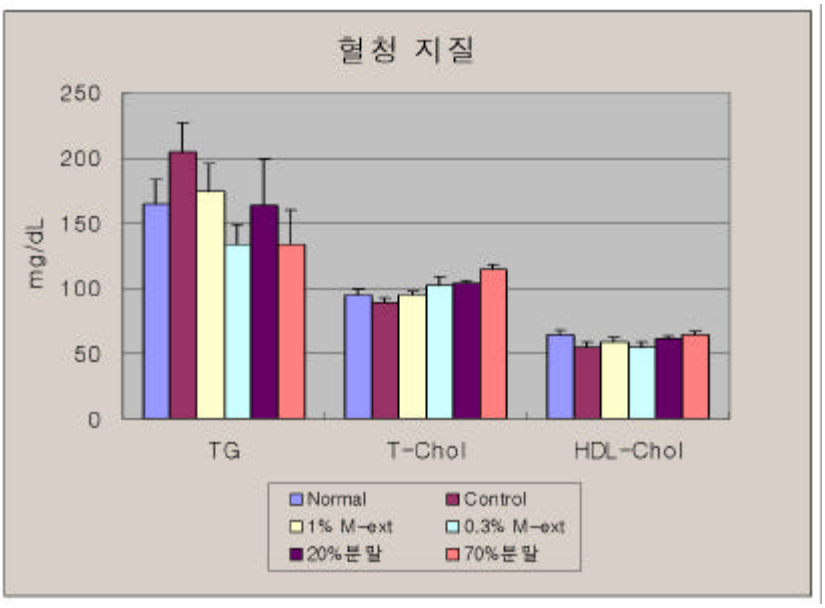


Fig. 3-4 Effect of prosomillet methanol extracts on serum lipids of rats fed high fat diets
(Mean+ SEM of 8 rats per group)

Table 3-15. Effect of prosomillet methanol extracts on serum HDL-cholesterol/total cholesterol ratio of rats fed high fat diets

Normal	Control	1% M-ext	0.3% M-ext	20% powder	70% powder
0.69∓0.03	0.61∓0.03	0.63∓0.04	0.55∓0.04	0.59∓0.02	0.56∓0.02

다. 간장의 지질 함량

간조직의 지질 성분인 콜레스테롤, 중성지방, 인지질을 각각 측정한 결과가 Fig. 3-5**에 나타나 있다. 고지방식에 기장 성분을 첨가하지 않은** control**군이** 1.675±0.115 mg/g**으로 가장 높고 기장의** MeOH **추출물을** 0.3%, 1% **첨가한 군과** 20% **기장 분말을 섭취한 군에서는** 1,433±0.062, 1.455±0.058, 1.436±0.080 mg/g**으로 콜레스테롤이 낮았으나 기장 분말을 식이에** 70% **첨가하여 섭취한 군에서는** 1.642±0.053 mg/g **으로** control**군과 유사하게 나타났다. 따라서 간조직 콜레스테롤을 낮추는데 기장의** MeOH **추출물이 효과가 있는 것으로 판단된다.**

간조직 중성지방 함량의 경우는 고지방식에 의하여 확실히 증가되어지나 기장 분말에 의한 효과가 MeOH **추출물 보다 우수한 것으로 보인다.** Control, 1% **기장** MeOH **추출물,** 0.3% MeOH **추출물군이** 10.30±1.13, 10.53±0.07, 10.55±0.27 mg/g**으로 차이가 없었던 반면 저지방식이를 한** normal**군은** 7,29±0.78 mg/g**으로 거의** 30% **정도 낮고,** 20% **기장 분말군도** 6.99±0.42 mg/g**으로 낮았다.**

인지질의 경우는 기장성분을 섭취하지 않은 control **군이 다른** 5**군에 비하여 유의하게 낮았으며 다른 군간에는 차이가 없었다. 따라서 기장성분은 인지질 합성을 원활히 하여 지방성분을 간 외로 내보내는데 주요역할을 하는 것으로 사료된다.**

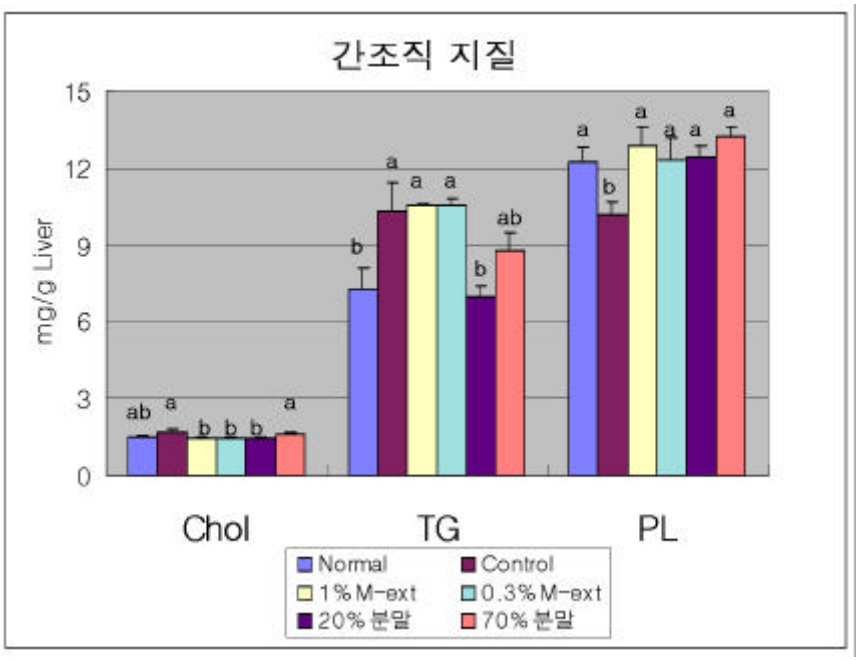


Fig. 3-5 Effect of prosomillet methanol extracts on liver lipids of rats fed high fat diets

(Mean+ SEM of 8 rats per group)

라. 간장조직의 HMG-CoA reductase의 활성

Fig. 3-6에 간조직의 콜레스테롤 합성 율속효소인 HMG-CoA Reductase의 활성이 나타나 있다. Fig.에서 보는 바와 같이 저지방식이를 준 normal군이 가장 낮았다. 그러나 기장의 methanol추출물 첨가 식이군들이 지방과 탄수화물 급원이 같았던 Control군 보다 대체로 낮은 수준을 유지하였고 기장을 분말로 섭취시켯을 때는 70% 정도를 주었을 때 낮아지는 경향을 보였다. 이는 기장의 methanol추출물속에 HMG-CoA reductase 활성 저해 물질이 포함되었을 가능성을 시사해 준다. 분말 섭취군에서는 추출물로 하여 섭취시켰을 때 보다 적게 흡수되었을 가능성이 높으며 분말 섭취군에서는 분말 함량이 많아지면(70%) 활성 물질의 섭취가 증가될 것으로 기대되어 효소활성이 20% 분말 섭취군 보다 낮아진 것으로 사료된다. 반면 추출물로 주었을 때, 0.3% M-ext 투여로도 활성이 1% M-ext과 같다는 것은 0.3% 추출물 섭취시에도 활성 물질이 충분히 체내로 유입된 것으로 사료된다.

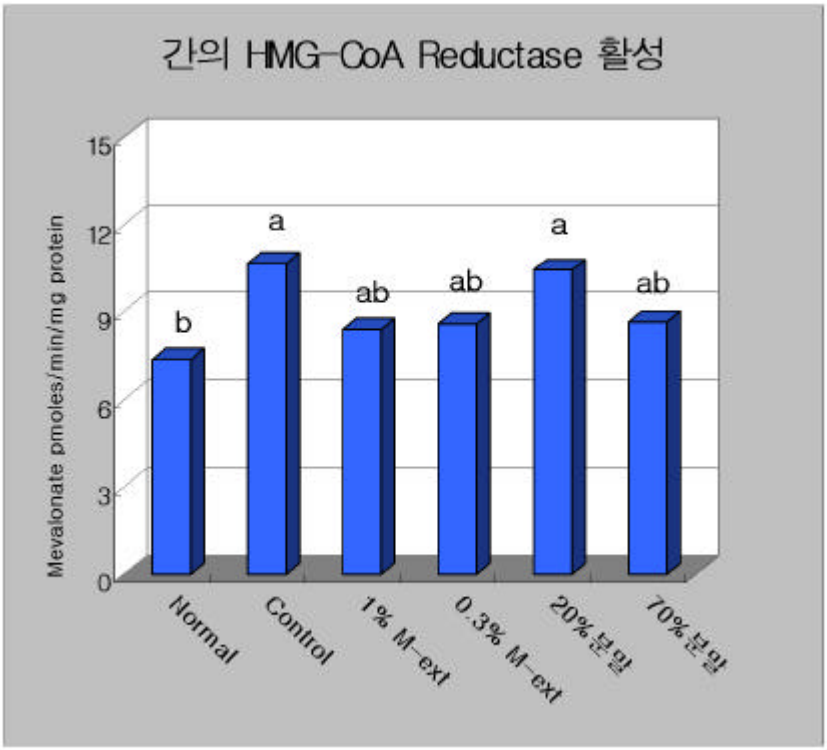


Fig. 3-6 Effect of prosomillet methanol extracts on activities of liver microsomal HMG-CoA reductase of rats fed high fat diets

(pmoles of mevalonic acid/min/mg microsomal protein
Mean+ SEM of 8 rats per group
Different alphabet letters in HMG-CoA reductase activity denotes significant different among groups)

마. 간장조직의 Cholesterol 7- α-hydroxylase **활성**

Fig. 3-7 **에** cholesterol **전환에서 중요한** cholesterol 7- α-hydroxylase**의 활성이** 6**개의 실험군별로 나타나 있다. 저지방식이의** normal**군과** 20% **기장분말군에서 각각** 10.47±1.10, 9.95±1.20 pmol/min/mg protein **으로 낮은 경향인 반면** 70% **기장분말군에서** 13.72±1.59 pmol/min/mg protein **으로 가장 높은 경향이었다. 기장을 섭취하지 않은** control**군과** 1% MeOH **추출물 섭취군이** 11.27±0.59, 11.11±0.62 pmol/min/mg protein **으로 같은 수준인 반면** 0.3% MeOH **추출물 섭취군에서는** 11.99±1.03 pmol/min/mg protein**로 이들 보다 다소 높은 경향을 나타냈다**.

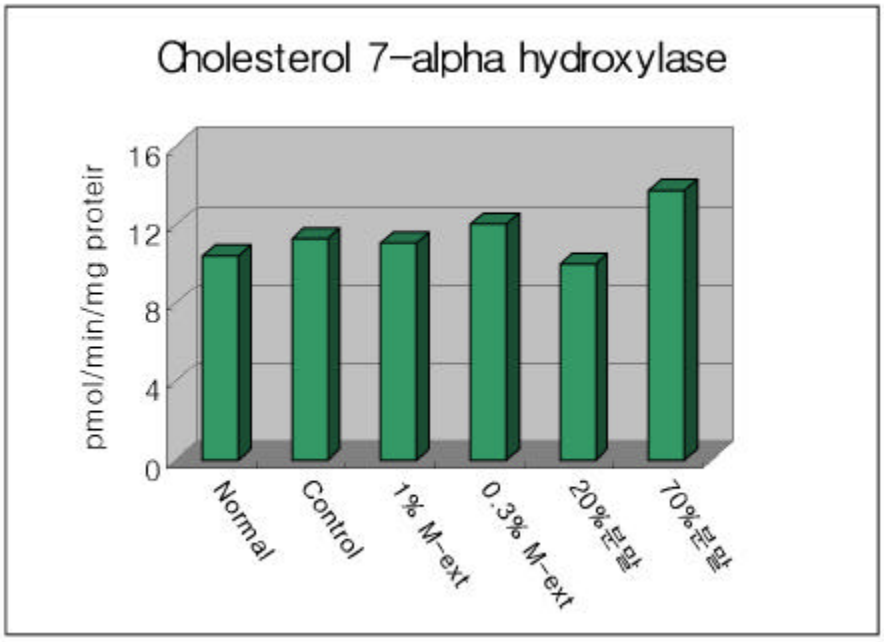


Fig. 3-7 Effect of prosomillet methanol extracts on activities of

liver microsomal cholesterol 7a-hydroxylase of rats fed high fat diets
(Mean+ SEM of 8 rats per group)

바. 간장조직의 Glucose-6-phosphate dehydrogenase **활성**

지방산 합성에 관여하며 체내에서 NADPH**를 생성하여 지방 및 콜레스테롤 합성에 필요한** reducing equivalent**를 공급해 주는 작용을 하는** glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) **의 활성이** Fig. 3-8 **에** 6**군의 실험군의 간조직** cytosol**에서 측정한** glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) **활성의 결과가 나타나 있다.** Fig.**에서 보는대로** G6PDH **활성은 기장성분을 섭취하지 않은** control **군에서 단연 높고, 나머지들은 낮았으며 특히 기장의** 3% MeOH **추출물을 섭취한 군과** 70% **기장분말을 섭취한 군에서 매우 낮았다.**

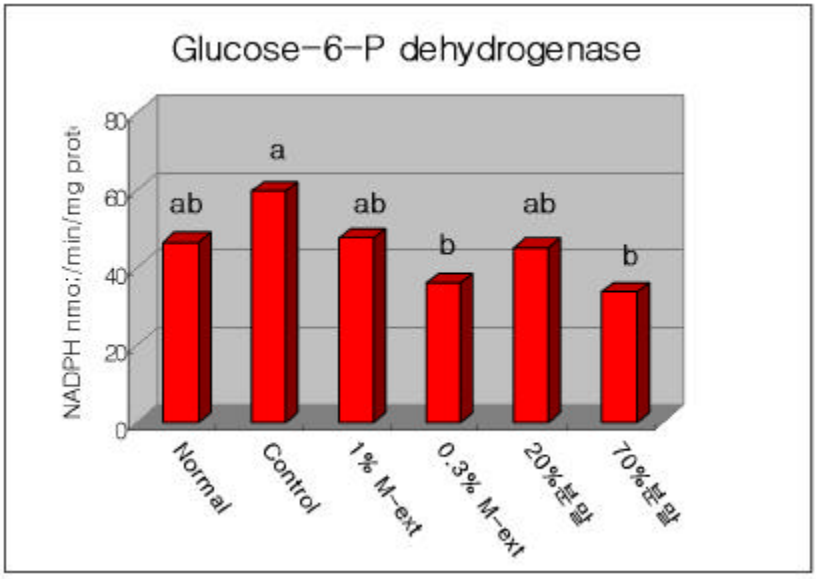


Fig. 3-8 Effect of prosomillet methanol extracts on activities of

liver microsomal cholesterol 7a-hydroxylase of rats fed high fat diets
(Mean+ SEM of 8 rats per group)

사. 분변 중의 담즙산 배설

Fig. 3-9 에 식이 마지막 3일의 분변 중의 담즙산 배설이 나타나 있다. 보는 바와 같이 담즙 배설을 가장 많이 증가시켜 주는 것은 70% 기장 분말 섭취군으로 나타났다. 이 군의 식이는 Table 3-14에 나타나 있듯이 cellulose가 3.7%이며 기장자체 섬유소가 1.3% 들어 있는 것이 중요한 차이였다. 담즙산 배설에 불용성인 celllulose보다 수용성 섬유소의 효과가 크다는 것은 잘 알려져 있는데, 기장의 섬유소의 종류를 규명해야 하며 methanol 추출물에 포함되지 않은 섬유소외의 다른 성분인지의 조사도 필요하다고 본다.

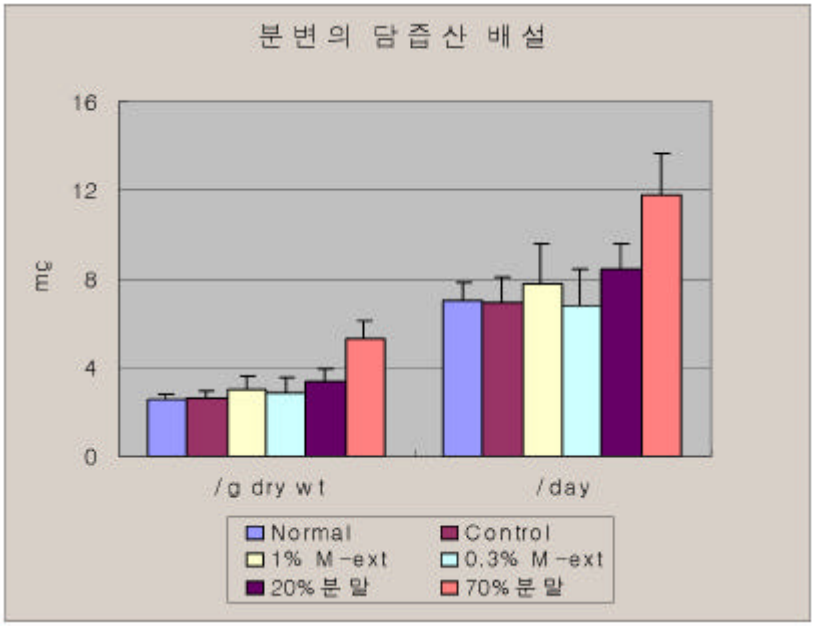


Fig. 3-9 Effect of prosomillet methanol extracts on fecal bile acid excretion of rats fed high fat diets
(Mean+ SEM of 8 rats per group)

이상의 실험 결과를 보건대 기장의 MeOH 추출물은 콜레스테롤과 지방 합성에 관련된 효소 활성을 저해하여 체내 지질의 축적을 억제할 수 있는 기능을 가진다고 여겨지며, 또한 MeOH로 추출되지 않은 기장분말에 함유된 물질은 주로 섬유소라고 생각되며 이 섬유소에 의한 담즙산 배설 증가가 확인되므로서 기장이 고지혈증 억제 식품임이 입증되었다고 할수 있다. 기장의 MeOH 추출물에 대한 효과는 식이의 0.3% 수준에서 더 좋은 결과를 얻어 차후의 가공품 개발시 dose 에 대한 연구가 더 요구된다.

II. high-cholesterol 식이모델

1. 실험재료 및 방법

가. 동물의 사육

체내 콜레스테롤이 증가된 상태에서 기장의 효과를 보기 위하여 기본식이에 콜레스테롤을 1%(w/w) 첨가하는 고콜레스테롤식이로 하였다. 이러한 조건에서 기장의 메탄놀을 0.3, 0.6%(w/w)의 두 수준을 첨가하는 군과 기장분말을 15와 30%(w/w)을 첨가하는 기장 실험군을 4개 두었고, 콜레스테롤이 첨가 되지 않은 군을 정상군으로 하고, 기장성분 없이 고콜레스테롤만을 첨가한 군을 대조군으로 하여 총 6종류의 식이를 Table 3-15과 같이 조제하여 각각의 동물군에게 섭취시켰다.

사용한 동물은 150-170 g 내외 Sprague-Dawley 숫쥐를 대한실험동물센터로부터 구입하여 1주일간 환경에 적응시킨 후 군당 8-9 마리를 배정하여 해당 조제식이를 주어 4주간 사육하였다.

나. 성장 및 식이효율 조사

조제 실험식이로 4주간 사육하는 동안 1-2일 간격으로 체중의 변화와 먹이 섭취량을 측정하였고, 그로부터 식이효율을 환산하였다.

Table 3-15. General composition and contents of prosomillet powder and methanol extract of high cholesterol diet (g/1,000g)

Group / Ingredient	C-Normal (free cholesterol)	C-Control (high-fat/ sucrose)	MeOH-ext		Powder	
			0.3%	0.6%	15%	30%
Casein	200	200	200	200	183	166
DL-Methionine	3	3	3	3	3	3
Starch	150	150	150	150	36	0
Sucrose	450	450	450	450	450	422
Cellulose	50	50	50	50	47	45
Lard	100	100	100	100	97	93
Mineral Mix	35	35	35	35	35	35
Vitamin Mix	10	10	10	10	10	10
Choline	2	2	2	2	2	2
Cholesterol		10	10	10	10	10
Na-tauro -cholate		3	3	3	3	3
MeOH-ext1			3	6		
Powder2					150	300
Kcal/1000g	4100	4047	4035	4023	3996	3765

1 : Prosomillet methanol extract

2 : Prosomillet powder

다. 분석시료의 채취

1) 혈청 및 간조직

Cholesterol 무첨가 식이 실험에서는 4주 식이가 끝난 다음 실험동물을 ether로 마취시킨 뒤 개복하여 간문맥으로 부터 혈액을 채취하였고, cholesterol 첨가 식이 실험에서는 4주 식이 후 16시간 절식시킨 다음 실험동물을 ether로 마취시킨 뒤 개복하여 heparin으로 처리한 주사기를 이용하여 간문맥으로 부터 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 2,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 각각 혈청 및 혈장을 얻었다.

간조직은 cholesterol 무첨가 식이 실험에서는 혈액을 채취한 다음 간을 saline으로 perfusion한 후 떼어내었고, cholesterol 첨가 식이 실험에서는 혈액 채취 후 바로 적출하였다. 적출한 간은 무게를 잰 다음 3 4 g을 절단하여 효소원 제조용으로 사용하고 나머지 간조직은 액체질소로 냉각시킨 알루미늄 압착기로 급속 냉동시켜 분석시 까지 -50℃에 보관하였다.

2) 분 변

Cholesterol 무첨가 식이 실험에서의 담즙산 배설량 그리고 cholesterol 첨가 식이 실험에서의 담즙산 및 cholesterol 배설량을 측정하기 위한 분변은 각각 마지막 2주 혹은 3일 동안 수거하여 -50℃에서 분석시 까지 보관하였다.

3) 간조직 효소원 제조

효소활성 측정용 liver cytosol, microsome 은 4℃에서 다음과 같은 과정에 의해 얻었다.

가) Cholesterol 7α-hydroxylase

적출한 간조직을 4℃ 이하의 300 mM sucrose와 TEDKSF buffer(300

mM sucrose pH 7.4, 40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol, 50 mM KCl, 50 mM KF)로 세척한 다음 Potter-Elvehjem type glass homogenizer로 homogenize시킨 간조직 분쇄액을 아래의 단계로 원심분리하였다.

간조직 분쇄액을 15,000 g에서 10분간 원심분리하여 지방층을 gauze와 면봉으로 제거한 다음 상등액을 105,000 g에서 75분간 초원심분리하여 microsome pellet을 얻었다. 이 microsome pellet를 소량의 TEDKF buffer(40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol, 50 mM KCl, 50 mM KF)로 suspension시켜 cholesterol 7α-hydoxylase 분석용으로 50-100 μℓ씩 나누어 -70℃에서 보관한 후 측정 효소원으로 사용하였다.

나) 지방산합성 관련 효소

적출한 간조직을 4℃ 이하의 A(pH 7.0, KH_2PO_4 50 mM, sucrose 0.2 M, dithiothreitol 2 mM)로 세척한 다음 Potter-Elvehjem type glass homogenizer로 homogenize시킨 간조직 분쇄액을 아래의 단계로 원심분리하였다. 간조직 분쇄액을 15,000 g에서 10분간 원심분리하여 지방층을 gauze와 면봉으로 제거한 다음 상등액을 취하였다. 이 상등액을 100,000 g에서 75분간 초원심분리한 다음 상층의 cytosol을 lipogenic enzyme 효소원으로 -70℃에서 보관한 후 사용하였다.

라. 시료의 분석

1) 혈청과 간조직의 지질분석

혈청의 cholesterol, HDLc, TG의 분석은 효소법에 의한 kit를 이용하여 각각 500, 555, 505 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다.

간조직의 지질은 Folch 등의 방법으로 추출하여 T-chol은 Pearson 등의

방법, PL은 Chen 등의 방법에 준해 각각 550 nm, 660 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. TG는 Sale 등의 방법에 준하되 chloroform에 용해된 지질추출물을 일정량 시료로 취하여 N2 gas로 건조시킨 후 triton X-100과 ethanol에 용해시킨 후 효소법에 의한 kit를 사용하여 정량하였다.

2) 분변의 담즙산 및 cholesterol 분석

실험전 마지막 2주간 변을 freezer dryer(-70℃)에서 항량에 도달할 때까지 냉동건조 시킨 뒤 건조중량을 측정하였다. 이 중 200 mg을 시료로 채취하여 DeWeal 등의 방법에 의해 곱게 분쇄한 뒤 KOH 용액을 1 ml를 넣어 3시간 autoclave한 다음 20% NaCl 용액 1 ml을 첨가하고 에테르 20 ml로 2회 추출하고, 하층액에 c-HCl 0.2 ml를 첨가하여 에테르 20 ml씩 가하여 4회 추출하였다. 수집한 상등액을 감압 농축시킨 후 액체질소로 완전히 건조시켜 MeOH:H2O(5:1, v/v) 혼합액에 용해시켜 일정량을 시료로 취하여 효소 kit를 이용하여 Crowell 등의 방법에 따라 500 nm에서 정량하였다. Cholesterol은 Pearson 등의 방법에 의해 550 nm에서 정량하였다.

3) Cholesterol 7α-hydoxylase 활성 측정

Cholesterol 7α-hydoxylase 활성은 〔4-^{14}C〕cholesterol을 이용하여 Junker와 Story에 의하여 서술된 방사선 동위원소법을 사용하였다.

기질성분인 mixed soybean phophatidyl-choline(asolectin)은 다음과 같이 정제하여 사용하였다. D-α-phosphatidyl choline 5 g에 무수아세톤 100 ml, BHT 0.5 mg을 넣고 불순물을 제거한 다음 무수에틸에테르로 asolectin을 여과지를 통해 녹여낸 후 감압 농축시켰다. 이것을 빛을 차단시킨 진공상태의 실내온도에서 보관하였다.

Substrate는 Tween 1.5 mg/assay, asolectin 0.5 mg/assay, cholesterol 0.1 ㎛/assay〔180 μM〕, [4-^{14}C]-cholesterol 0.1 μCi/assay를 질소로 용매를 제거하고 TEDKF buffer 100 ㎕/assay를 첨가하여 1-3분간 microtip을

사용하여 sonication한 후 다시 bath sonication시켜 맑은 용액의 기질을 얻었다. Cholesterol 7α-hydroxylase 활성을 측정하기 위한 반응용액의 구성은 총용량 500 μℓ로서 먼저 TEDKF buffer(pH 7.4), substrate 용액 100 μℓ (200-500 μM cholesterol with 0.1 μCi [4-^{14}C]-cholesterol/assay), microsome 400 800 μg protein(20 30 mg/ml 용액 10-40 μℓ)의 혼합용액을 빛이 차단된 37℃에서 60분간 preincubation 시킨 뒤, NADPH, 0.6 nmole 첨가하여 50분 반응시킨 후, $CHCl_3$:MeOH(2:1, v/v) 7.5 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 1 ml의 물을 가하여 vortex한 다음 4℃에서 한 시간 방치하여 층을 분리하고, 하층을 취한 다음, 상층은 다시 3 ml의 $CHCl_3$으로 재추출하여 처음 추출물과 합하였다. 이 추출물을 질소로 말린 후 80 μℓ의 $CHCl_3$에 용해시켜 ethylacetate:hexane(8:2, v/v)을 전개용매로 TLC를 시행하였다.

TLC상에서 생성물인 7α-hydroxycholesterol의 위치를 확인하기 위하여 표준품을 다음과 같이 합성하여 사용하였다. 7-ketocholesterol 100 mg을 6 ml의 methanol에 녹인후 100 mg의 $NaBH_4$를 가하여 상온에 1시간 둔 다음 10 ml의 물을 가하였다. 이것을 ether:benzene(1:1, v/v) 20 ml로 2회 추출한 다음 5 ml의 물로 3회 세척하여 취한 상층액에 무수 Na_2SO_4을 가하였다. 그 다음날 용액을 여과, 건조시켜 얻은 표준품을 $CHCl_3$에 일정량을 녹여 사용하였다. 이 표준용액을 TLC한 다음 요오드 증기나 image analyzer로 재확인 후 분획을 잘라 방사능을 scintillation counter로 측정하였다.

효소활성도 단위는 반응시간 1분간 microsome 단백질 1 mg이 생성하는 7α-hydroxycholesterol의 양을 pmole로 나타내었다.

4) 지방산합성 관련 효소활성 측정

가) Glucose-6-phosphate dehydrogenase

Cuvette에 tris buffer(pH 7.4) 37 mM, glucose-6-phosphate disodium

salt 7.4 mM, NADP 0.07 mM, MgCl2 7.4 mM을 함유하는 반응혼합액에 간 cytosol 0.1 ml를 가하여 반응용액을 2.7 ml로 한 후 잘 혼합하여 상온에서 NADP가 G6P를 산화시켜 NADPH가 생성되는 것을 340 nm에서 측정하였다.

나) Malic enzyme

Cuvette에 triethanolamine(pH 7.4) 68 mM, L-malate 0.51 mM, MnCl2 4.7 mM, NADP 0.14 mM을 함유하는 반응혼합액에 간 cytosol 0.1 ml를 가하여 반응용액을 총 2.95 ml로 한 후 잘 혼합하여 NADPH 생성율을 340 nm에서 측정하였다.

마. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준품으로 사용하여 간조직 cytosol, cell microsome은 Lowry 방법 그리고 간조직 microsome은 Biuret 방법에 의하여 정량하였다.

바. 통계처리

실험결과는 평균치와 표준오차를 산출하였으며 각 실험치 간의 검증은 SAS를 이용한 ANOVA와 Tukey test로 각 군간의 차이에 대한 유의도로 판정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 체중의 변화와 식이효율 및 간장조직의 무게

Table 3-16에 각 실험군의 체중변화 및 식이섭취량, 식이효율과 간장의 무게를 나타내다. 체중의 변화나 식이효율은 실험군간에 차이가 없었으나 cholesterol을 섭취한 대조군(Control)과 기장 메탄올 추출물(MeOH-ext) 및 기장분말(Powder)군이 cholesterol을 첨가하지 않은 정상군(Normal)에 비해 식이효율이 높았다. 그리고 cholesterol 첨가식이를 한 다섯군은 Normal군에 비해 간장의 무게(g/100g bw)가 더 증가되었다. 뿐만 아니라 해부시 간장 조직을 관찰한 결과 cholesterol을 첨가한 군들은 육안으로 확인된 간장의 색깔 또한 Normal군에 비해 현저히 황색을 띄워 지방 축적이 되었음을 보여 주었다. 그러나 기장 메탄올 추출물 및 분말을 첨가한 네 군들의 간 색깔은 Control군에 비해 호전되는 경향을 보였다.

Table 3-16. Effect of dietary prosomillet on growth of rats on high cholesterol diets

Group	Body weight (g)			Feed efficiency g/100g diet	Relative liver weight g/100g bw
	Initial	Final	Gain		
C-Normal1	197.3±9.7	313.8±6.4	116.5±10.9	22.0±0.02	2.67±1.43
C-Control2	193.0±9.1	320.0±8.3	127.0± 5.3	24.9±0.01	4.02±2.62
MeOH-ext					
0.3%	190.5±7.3	320.6±4.1	130.1± 5.0	23.4±0.02	4.17±5.15
0.6%	193.5±7.9	313.8±8.2	120.3±12.6	24.9±0.02	4.20±1.53
Powder					
15%	187.9±7.2	308.8±7.7	120.9±12.9	24.0±0.02	4.15±2.61
30%	188.9±8.4	300.6±4.8	111.8± 6.4	18.9±0.02	3.80±0.14

1 : High fat-sucrose without cholesterol diet group

2 : High fat-sucrose with 1% cholesterol diet group

Mean ± SE of 8 rats per group

나. 혈장과 간조직의 지질 함량

Table 3-17에 각 실험군의 혈장 T-chol, TG, HDLc, PL 및 HDLc/TC ratio 수준을 나타내다. T-chol 수준은 cholesterol를 첨가하지 않은 정상군(C-Normal)에 비하여 cholesterol 첨가식이를 한 나머지 다섯군이 현저히 높았다. 혈장 T-chol은 0.3% 메탄올 추출물(MeOH-ext)군에서 가장 많이 감소하였으며 기장분말(Powder)군에서는 분말 함량에 따라 감소하는 경향을 보였으나 0.6% MeOH-ext군에서는 감소되지 않았다.

TG는 모든 기장 섭취군에서 대조군(C-Control) 보다 또한 C-Normal군 보다도 낮은 경향이었다. 그러나 HDLc은 cholesterol 첨가식이를 한 5군에서 모두 C-Normal군 보다 낮아 기장섭취에 의한 효과가 나타나지 않았다. 혈장 PL 수준은 기장 섭취군이 C-Control군 보다 다소 높은 경향을 보였으나 큰 차이가 없었다. HDLc/TC ratio는 C-Normal군에 비해 cholesterol 첨가식이군 모두 낮았다.

Table 3-18에서 보는바와 같이 간조직의 T-chol, TG는 혈장에서와 같이 cholesterol 첨가식이를 섭취한 5군이 cholesterol을 첨가하지 않은C-Normal군에 비해 현저히 높아 간의 무게증가와 육안적으로 황색(Fig. 7)을 띄웠던 원인이 이러한 지질 축적의 결과임을 알 수 있었다. 그러나 C-Control에 비하여 간조직의 T-chol, TG 모두 기장 메탄올 추출물이나 분말 섭취로 감소하였으며 그리고 간의 육안적인 색깔 또한 모든 기장 섭취군에서 호전된 것으로 미루어 기장성분이 간의 지질축적을 억제하는 효과가 있었음을 알수 있었다. 그러나 PL은 오히려 C-Control에 비하여 기장 섭취군에서 증가하였는데 MeOH-ext군 보다 Powder군에서 다소 높았다.

Table 3-17. Concentrations of plasma lipids of rats on high cholesterol diets

Group	Tchol (mg/100ml)	HDLc (mg/100ml)	HDLc/T-chol	TG (mg/100ml)	PL (mg/100ml)
C-Normal1	100.6±11.0c	45.1±2.0a	0.488±0.06a	34.1±7.5ab	16.62±0.86a
C-Control2	273.1±47.3a	19.4±2.4b	0.103±0.03b	42.6±6.8a	15.18±2.74b
MeOH-ext					
0.3%	188.2±43.1b	16.5±1.5bc	0.088±0.02b	20.4±6.0b	15.67±0.60ab
0.6%	285.3±15.8a	13.6±1.1c	0.070±0.026b	26.9±2.4ab	15.48±1.12ab
Powder					
15%	249.0±21.4ab	18.3±1.5bc	0.079±0.012b	22.1±3.4b	16.19±1.25ab
30%	218.6±29.2ab	15.7±1.9bc	0.083±0.018b	23.5±2.8b	14.82±1.56ab

1 : High fat-sucrose without cholesterol diet group
2 : High fat-sucrose with 1% cholesterol diet group
Mean ±SE of 8 rats per group.
Values in the same column not sharing common superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

Table 3-18. The concentration of liver lipids of rats on high cholesterol diets

Group	Liver (mg/g liver)		
	cholesterol	TG	PL
C-Normal1	1.90±0.31b	14.82±1.24c	3.93±0.16a
C-Control2	27.88±4.39a	37.91±4.8a	3.43±0.12b
MeOH-ext			
0.3%	22.88±4.02a	32.06±4.10b	3.47±0.10ab
0.6%	24.42±2.25a	34.31±2.97b	3.54±0.17ab
Powder			
15%	25.06±3.68a	29.97±3.19b	3.72±0.19ab
30%	25.28±3.20a	35.62±3.15ab	

1 : High fat-sucrose without cholesterol diet group
2 : High fat-sucrose with 1% cholesterol diet group
Mean ±SE of 8 rats per group.
Values in the same column not sharing common superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

다. 분변중의 담즙산 및 cholesterol 배설량

Table 3-17에 식이 마지막 3일의 분변중의 담즙산 및 cholesterol 배설량의 변화를 나타내었다. 정상군(C-Normal)에 비하여 cholesterol 첨가식이를 한 5군 모두 분변중 담즙산 및 cholesterol 배설이 현저히 증가하였다. 그러나 분변중의 담즙산 및 cholesterol 배설은 대조군(C-Control)에 비하여 기장 섭취군에서 증가경향을 보였는데 그 효과는 기장분말군(Powder)에서 더 컸다.

Table 3-19. Fecal excretion of bile acid and cholesterol of rats on high cholesterol diets

Group	Bile acid		Cholesterol	
	mg/g fecal	mg/day	mg/g fecal	mg/day
C-Normal1	10.12±1.57c	11.18±1.32c	9.94±0.39b	11.50±1.20c
C-Control2	35.16±0.69ab	51.22±3.26ab	65.11±10.99a	92.70±15.33b
MeOH-ext				
0.3%	38.5±2.16a	56.13±2.88ab	75.10±3.20a	109.68±4.97ab
0.6%	31.14±2.37b	46.86±2.90b	68.13±2.01a	104.52±8.15ab
Powder				
15%	37.77±2.38a	59.56±2.10a	75.21±4.24a	118.90±4.28a
30%	39.43±3.69a	61.55±9.30a	74.06±3.32a	114.09±9.20ab

1 : High fat-sucrose without cholesterol diet group
2 : High fat-sucrose with 1% cholesterol diet group
Mean ±SE of 8 rats per group.

Values in the same column not sharing common superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

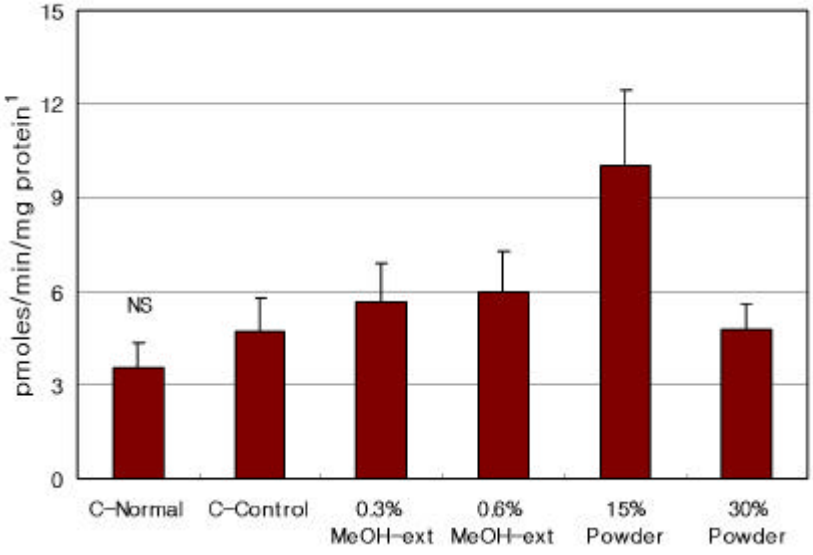
라. 간조직의 cholesterol 7α-hydroxylase **활성**

Cholesterol **무첨가식이 실험에서 기장섭취에 의한** cholesterol **합성과정의 율속효소인** HMG-CoA reductase**의 활성저해 효과를 보였다. 그러나** cholesterol **첨가식이 실험에서는 고**cholesterol **식이에서의 기장 섭취 효과를 확인하고자 하였으므로** cholesterol **투여에 따른 활성저해가 큰** HMG-CoA reductase **활성은 측정하지 않고** cholesterol **배설과정의 율속효소인** cholesterol 7α-hydroxylase **활성만을 측정하였다.** Fig. 3-10**에서 보는 바와 같이 각 군간에 유의성은 없었으나 대조군**(C-Control)**이 정상군**(C-Normal)**에 비하여** cholesterol 7α-hydroxylase **활성이 증가하는 경향을 보였다.** cholesterol 7α-hydroxylase **활성은 기장 메탄올 추출물 섭취로 더 많이 증가되었으며 특히** 15% **기장 분말**(Powder)**군이 가장 활성이 높았다. 그러나** 30% Powder**군에서는 오히려 활성변화가 없었다.**

Fig. 3-10. Activities of liver microsomal cholesterol 7α-hydroxylase of rats on high cholesterol diet

마. 간조직의 지방산합성 관련 효소활성

지방산 합성에 관여하며 체내에서 NADPH**를 생성하여 지방 및** cholesterol **합성에 필요한** reducing equivalent**를 공급해 주는** glucose-6-phosphate dehydrogenase**와** malic enzyme**의 활성이** Fig. 3-11 **에 나타나 있다.** Fig**에서 보는바와 같이 두 효소활성이 정상군**(C-Normal)**이나 대조군**(C-Control)**에 비해 기장 메탄올 추출물과 분말 섭취로 감소하는**



경향을 보였는데, 특히 G6PDH 활성에서 더 유의하게 나타났다. 이 효소의 활성저하로 기장 섭취군에서 혈장 및 간조직의 TG가 감소하였다고 생각되며 이러한 경향은 cholesterol 무첨가식이 실험에서 보였던 기장효과와 같은 경향이었다.

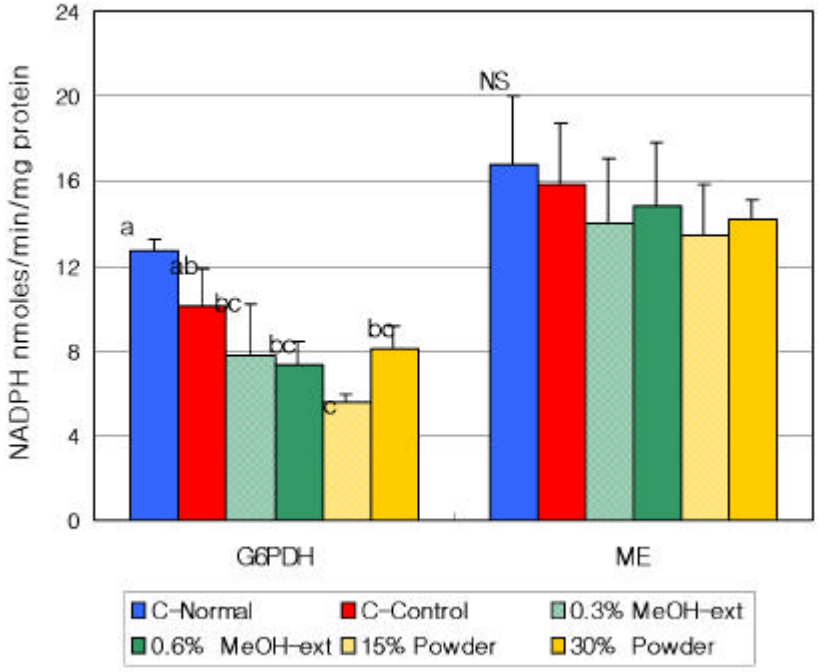


Fig. 3-11. Activities of liver cytosolic lipogenic enzyme of rats on high cholesterol diet

제 4절 흑미 유효성분의 흰쥐체내 지질 저하효과의 작용기작

본 절에서는 제 2장에서 분리한 흑미 유효성분(CA)이 고지방식이 및 고콜레스테롤 식이를 섭취한 흰쥐 체내 지질 저하효과와 그 작용기작을 검토하였다.

1. 실험재료 및 방법

가. 실험군, 식이조제 및 동물의 사육

동물실험용 흰쥐는 200-220g의 SD계 숫컷 흰쥐를 대한실험동물센터로 구입하여 일주일간 일반고형사료로 환경에 적응시킨 후 초기체중이 동일하도록 무작위로 각군 8-10마리씩 4개의 실험군으로 나누었다. 즉 고지방식이

대조군, 고지방식이+0.15% CA군, 고콜레스테롤 식이 대조군, 고콜레스테롤 식이+0.15% CA군의 4 실험군으로 나누었다.

고지방식이와 고콜레스테롤 식이는 앞의 3장 1,2,3,절과 동일하게 하고 각 대조식이에 유효성분을 0.15% 되게 첨가하고 식이와 물은 자유로이 섭취케 하여 4주간 사육하였으며 체중과 식이섭취량을 측정하였다

나. 시료 채취 및 분석

각 시료의 채취 및 분석은 앞절과 동일하게 하였으며 혈액중 지질함량의 경시적 변화는 절식시키지 않은 상태에서 채혈하여 혈청중 total cholesterol 과 triglyceride를 분석하였다.

다. 통계처리

각 실험결과의 유의성은 T-test를 이용하여 검정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 체중의 변화 및 장기의 무게

사육기간중 체중의 변화 및 장기무게를 보면(Table 3-20, 21) 고콜레스테롤 식이에서는 CA의 첨가영향이 없었으나 고지방식이에서는 체중증가량이 약간 감소하였으나 통계적 유의차는 없었다. 장기무게에도 각군에 따른 유의차는 없었다.

나. 혈청 지질함량의 변화

Table 3-22에는 고지방식이 및 고콜레스테롤 식이에 있어서 혈청지질함량에 미치는 CA의 영향을 나타내었다. 혈청 중성 지방함량은 고지방식,

고콜레스테롤식 모두 CA를 첨가함으로서 유의하게 감소하여 고지방식이에서는 35%, 고콜레스테롤 식이에서는 31%의 감소효과를 나타내 CA가 혈청 중성지방 감소효과가 뚜렷한 것으로 나타났다. 혈청 total cholesterol은 고지방식이에서는 CA 첨가에 의하여 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의차가 없었고 고콜레스테롤 식이에서는 유의하게 감소하였다. free cholesterol도 total cholesterol과 비슷한 경향으로 고콜레스테롤식이에서만 유의하게 감소하였다. free fatty acid 는 고지방식이에서 유의하게 감소하여 약 30% 감소하였고 고콜레스테롤 식이에서는 CA에 의하여 현저하게 낮았으나 통계적 유의차는 없었다. 제 2절에서 흑미 메탄올 추출물 및 분말을 급여하였을 때에는 흑미가 혈청지질함량을 감소시키는 경향은 보였으나 유의차가 없었다. 본 절에서 CA를 분리하여 검토한 결과 흑미의 CA성분은 혈청 콜레스테롤을 비롯한 지질을 감소시키는 좋은 소재인 것으로 판단되었다.

Table 4-20. Effect of CA onbody weight gain, food intake of experimental rats.

	High fat control	High fat 0.15%CA	High chol control	High chol 0.15% CA
Initial BW (g)	230.6±7.41	230.4±3.59	231.3±2.43	235.5±3.48
Final BW (g)	382.1±8.98	373.4±13.03	386.0±6.08	389.5±13.5
Total intake(g)	555.4±15.1	547.1±20.4	594.6±10.4	614.1±24.3
Weight gain (g)	148.4±7.99	143.0±14.0	154.6±7.79	154.0±11.2
FER	0.27±0.01	0.26±0.02	0.26±0.01	0.25±0.01

Table 4-21. Effect of CA on organ weights of experimental rats

	Liver	Kidney	Spleen
	(g)	(g)	(g)
High fat control	17.22±0.61	2.73±0.08	0.90±0.05
High fat +0.15% CA	16.57±1.19	2.57±0.12	0.81±0.06
High chol control	13.96±0.42	2.69±0.04	0.80±0.06
High chol +0.15% CA	14.49±0.59	2.86±0.04*	0.82±0.03

Table 4-22. Effect of CA on concentration of serum lipids of experimental rats

	High fat control	0.15% CA	High cholesterol control	0.15% CA
Triglyceride (mg/dl)	110.4±11.8	71.95±3.48*	141.56±13.9	97.61±5.98**
Total Cholesterol (mg/dl)	77.8±3.59	74.71±2.75	75.36±4.51	62.62±3.04*
HDL cholesterol (mg/dl)	37.8±2.95	40.46±2.29	40.41±3.15	38.80±2.35
Free cholesterol (mg/dl)	13.69±1.14	13.93±0.82	13.08±1.24	10.26±0.65*
Free fatty acid (μEq/L)	995.7±47.2	697.4±39.3***	914.0±107.1	756.7±26.92

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

다. 간장의 지질함량과 TBARS

Table 4-23에는 간장 조직중의 지질함량과 TBARS에 미치는 CA의 영향을 나타내었다. 우선 중성지방 함량을 보면, 고지방식, 고콜레스테롤 식 모두 CA투여의 영향이 없었으나 콜레스테롤 함량은 유의하게 감소하였다. 특히 고콜레스테롤식이에서는 CA가 간장 콜레스테롤을 34% 감소시키는 효과가 있었다. 또한 CA는 강한 항산화 작용이 있는 것으로 보고되어 있는데 본 실험에서도 TBARS 함량을 유의하게 감소시켰다.

Table 4-23. Effect of CA on contents of liver triglyceride, cholesterol and TBARS of experimental rats

	Cholesterol (mg/g liver)	Triglyceride (mg/g liver)	TBARS (MDA nmole/g liver)
High fat con	3.56±0.19	18.22±1.46	45.28±2.14
0.15% CA	3.02±0.12*	17.59±2.20	35.86±1.31**
High chol con	29.7±1.53	25.89±1.93	51.43±3.54
0.15% CA	19.6±1.45**	26.51±1.51	37.30±5.79

라. 간장 malic enzyme**과** G6PDH**의 활성**

간장중의 지방산 합성관련효소인 malic enzyme**과** glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)**의 활성에 미치는** CA**의 영향을** Table 4-24**에 나타내었다.** Table**에서 보는 바와 같이 고지방식, 고콜레스테롤식이 모두에서** CA**를 첨가함에 따라** malic enzyme**과** G6PDH **활성을 유의하게 감소시켰다.** Malic enzyme**과** G6PDH**는 지방산 합성에 관여하며 체내에서** NADPH**를 생성하여 지방 및** cholesterol**합성에 필요한** reducing eqivalent**를 공급해 준다. 본 실험에서** CA **첨가에 의하여 이들 효소의 현저한 감소는 혈청** TG **및** free fatty acid **함량의 감소와 일치하며** CA**에 의한 혈청** TG **의 저하효과는 이들 효소활서의 저하에 기인한 것으로 판단되었다. 또한** CA**는 이 지방산 합성 관련효소뿐만 아니라** HMG-CoA reductase **활성을 감소시킴으로서 혈청 및 간장중의 콜레스테롤** level**을 감소시키는 것으로 판단되었다.**

Table 4-24. Effect of CA on activities of malic enzyme and G6PDH of liver in experimenatal rats

	Malic enzyme (nmoles/min mg protein)	G6PDH (nmoles/min mg protein)
High fat con	1.523±0.03	2.718±0.173
0.15% CA	1.128±0.07**	2.130±0.141*
High chol con	1.833±0.06	6.06±0.20
0.15% CA	1.562±0.03**	2.73±0.10***

마. Postprandial triglyceride**에 미치는 영향**

CA**와 증류수를 각각** 1**주일간 섭취시킨 후** 2**시간 동안 밥을 빼고** 0 time **의 안정맥 채혈을 실시하였다. 그 후** soybean oil, 1ml/rat**과** CA **또는 증류수(대조군)를 동시에 경구투여한 다음** 1**시간 간격으로 안정맥 채혈을 하여 혈청** TG**의 변화를 측정하였다.**

그 결과 대조군은 투여 3**시간 까지 혈중** TG **함량이 급격하게 증가하는 반면** CA**군은 서서히 증가하여 식후** 2**시간 이후에는 거의 증가하지 않았으며 이후** 2**군 모두 감소하였다. 증가폭이 완만하고** CA**투여군이 측정** 6**시간 까지 계속 낮은 혈청**TG **값을 유지하였다. 이 결과로 보아** CA**는** oil**의 흡수를 억제하는 효과가 있는 것으로 생각되었다.**

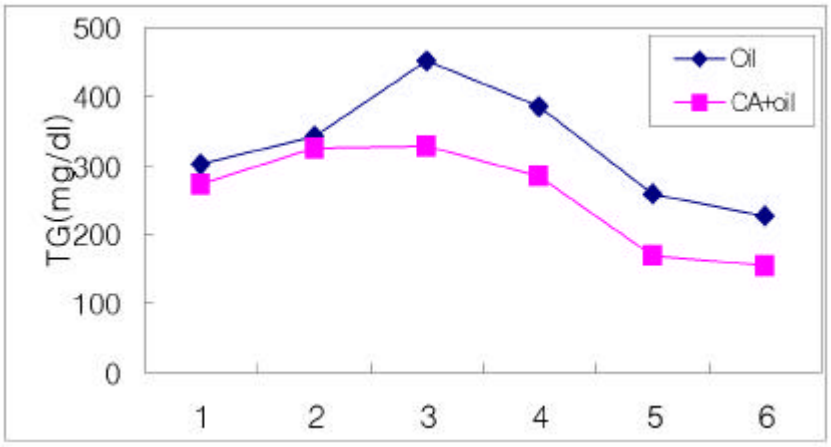


Fig. 3-12 Effect of CA on postprandial triglyceride of rat

참 고 문 헌

1) Brown WV, Karmally W. 1985. Coronary heart disease and the consumption of diets high in wheat and other grains. *Am J Clin Nutr* 41(5 *suppl*): 1163-71.

2) Zhang J-X, Lundin E, Andersson H, Bosaeus I, Dahlgren S, Hallamns G, Stenling R, Aman P. 1991. Brewer's spent grain, serum lipids and fecal sterol excretion in human subjects with ileostomies. *J Nutr* 121:778-784.

3) Illman RJ, Storer GB, Topping DL. 1993. White wheat flour lowers plasma cholesterol and increases cecal steroids relative to whole wheat flour, wheat bran and wheat pollard in rats. *J Nutr* 123:1094-1100.

4) Jackson KA, suter DAI, Topping DL. 1994. Oat bran, barley and malted barley lower plasma cholesterol relative to wheat bran but differ in their effects on liver cholesterol in rats fed diets with and without cholesterol. *J Nutr* 124: 1678-1684.

5) Illman RJ, Topping DL, Dowling K, Trimble RP, Russell GR, Storer GB. 1992. Effects of solvent extraction on the hypocholesterolemic action of oat bran in the rat. *Br J Nutr* 65:435-443.

6) Qureshi AA, Buger WC, Peterson DM, Elson CE. 1985. Suppression of cholesterogenisis by plant constituents: review of Wisconsin contribution to NC-167. *Lipids* 20: 817-824.

7) Qureshi AA, Buger WC, Peterson DM, Elson CE. 1986. The structure of an inhibitior of cholesterol biosynthesis isolated from barley. *J Biol Chem* 23: 10544-10550.

8) Qureshi AA, Bradlow BA, Brace L, Manganello J, Peterson DM, Pearce BC, Wright JJ, Gapor A, Elson CE. 1995. Response of

hypercholesterolemic subjects to administration of tocotrienols. *Lipids* 30: 1171-7.

9) Pearce BC, Parker RA, Deason ME, Quershi AA, Wright JJ. 1992. Hypocholesterolemic activity of synthetic and natural tocotrienols. *J Med Chem* 35: 3595-606.

10) Salunkhe DK, Jadhav SJ, Kadam SS, Chavan JK. 1982. Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *Crit Rev Food Sci Nutr* 17: 277-305.

11) Yuganari T, Tan BK, Teh M, Das NP. 1992. Effects of polyphenol natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. *Lipids* 27: 181-6.

12) Park YJ, Lee YS, Suzuki H. 1988. Effect of coix on plasma cholesterol and lipid metabolism in rats (*in Korean*) *Korean J Nutr* 21:89-98.

13) Choi YS, Ahn C, Shin HH, Choe M, Oh SY, Lee SY. 1992. Effect of instant buckewheat noodle on digestibility and lipid profiles of liver and serum in rats (*in Korean*). *J Korean Soc Food Nutr* 21:478-483.

14) Ha TY, Cho IJ, Lee SH. 1998. Screening of HMG-CoA reductase inhibitory activity of ethanol and methanol extracts from cereals and legumes. (*in Korean*) *Korean J Food Sci Technol* 30: 224-229.

15) The American Institute of Nutrtion. 1977. Report of the American Institute of Nutrtion Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J Nut*r 107: 1340-1348.

16) Food Composition Table (*in Korean*). 1996. National Rural Living Science Institute, Korea.

17) Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. 1957. a simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*

226: 497-509.

18) Pearson S, stern S, McGavack TH. 1953. A rapid accurate method for the determination of total cholesterol in serum. *Anal Chem* 25: 813-814.

19) Chen PS, Toribara TY, Warner H. 1956. Microdetemination of phosphorus. *Anal Chem* 28: 1756-1758.

20) Sale FO, Marchesini S, Fishman PH, Berra B. 1984. a sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts. *Anal Biochem* 142: 347-350.

21) Crowell MJ, Macdonald IA. 1980. Enzymatic determination of 3α-, 7α-, and 12-hydroxyl groups of fecal bile salts. *Clin Chem* 26: 1298-1300.

22) Qureshi AA, Buger WC, Elson CE, Norlin J. 1982. Effects of cereals and culture filtrate of Trichoderma viride on lipid metabolism of swine. *Lipids* 17: 924-934.

23) Junker LH, Story JA. 1985. An improved asay for cholesterol 7α-hydroxylase activity using phospholipid liposome solubilized substrate. *Lipids* 20: 712-718.

24) Baginski ES, Foa PP, Zak B. 1974. Glucose-6-phosphatase. *In*: Methods in Enzymatic Analysis (Bergermeyer HU ed) Vol 2, p 867-880, Academic Press, New York

25) Ochoa, S. 1969. Malic enzyme. *In*: Methods in Enzymology (Lowenstein JM ed) Vol 13, p 230-237, Academic Press, New York

26) Lowry OH, Rosebrough MJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with folin reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

27) Kawada T. Hagihara K, Iwai K. 1986. Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *J Nutr* 116:1272-8

28) Gebhardt R, Beck H. 1996. differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosymthesis in promary rat hepatocyte cultures. *Lipids* 31: 1269-76.

29) Gebhardt R. 1998. Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichole (*Cynara scolymus L.*) extracts. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 1122-8.

30) Matheson HB, Colon IS, Story JA. 1995. cholesterol 7α-hydroxylase activity is increased by dietary modification with psyllium hydrocolloid, pectin, cholesterol and cholestyramine in rats. *J Nutr* 125: 454-458.

31) Gibson DM, Lyons RT, Scott DF, Mutto Y. 1972. Synthesis and degradation of the lipogenic enzymes of rat liver. *Adv Enz Reg* 10:187-204.

32) Hsu JC, Tanaka K, Ohtani S, Collado CM. 1987. Effects of pathethine supplemetation to diets with different energy cereals on hepatic lipogenesis of laying hens. *Poult Sci* 66: 280-8.

33) Qureshi AA, Abuirmeileh N, Din ZZ, Elson CE. 1983. Inhibition of cholesterol and fatty acid biosynthesis in liver enzymes and chicken hepatocytes by polar fractions of garlic. *Lipids* 18: 343-348.

제 4장 고활성 곡류의 가공특성 및 제품개발

우리나라에서 보리, 기장, 수수등의 잡곡은 쌀을 제외한 중요한 곡물로 주로 식용으로 소비하고 있으나 근년 들어서는 소비량의 감소로 인하여 연간 생산량이 계속 감소되고 있다.

그러나 최근에는 이러한 잡곡류들가 인체에 다양한 효능이 있다고 보고됨에 따라 이러한 곡류의 섭취에 관심이 집중되고 있다. 예를 들면, 보리의 수용성 식이섬유인 b- glucan을 비롯하여 수수의 식이섬유, phenolic compounds, 메밀의 rutin 등 다양한 유효성분이 보고되고 있다. 본 연구에서도 2, 3장에서 검토한 바와 같이 특히 수수, 기장, 흑미는 *in vitro* 실험에서 HMg-CoA reductase 활성을 억제할 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 콜레스테롤상승을 억제하는 효과가 있었다. 이와 같이 곡류에는 다양한 생리적 기능이 있어 이를 활용한 고부가치의 가공제품 개발이 기대되고 있다. 우리나라에서는 잡곡류가 쌀의 대체식량으로만 여겨져 경시되어 왔고 현재에도 이러한 곡류의 이용은 잡곡밥의 원료 및 일부 떡에만 국한되어 왔을 뿐 가공제품 및 기능성 식품으로서의 개발은 전무한 실정이다.

따라서 본 장에서는 비교적 활성이 높았던 곡류를 대상으로 가공특성을 검토하고 제빵으로의 응용과 음료제품을 개발하였다.

제 1절 고활성 곡류의 이화학적 특성

1. 실험재료 및 방법

가. 실험재료

실험재료는 in vitro검색에서 비교적 활성이 높았던 흑미, 수수, 메밀, 기장, 율무, 보리, 현미를 이용하였고 각각의 시료는 이물질 등을 제거, 정선한 다음 cyclotec mill로 분쇄하여 실험에 사용하였다.

나. Amylograph

시료 곡류의 amylogram 특성은 Viskograph(Brabender, Germany)를 이용하여 측정하였다. 시료 곡분의 농도는 11%로 하였다.

다. WSI

시료 곡류의 수분 용해도 지수(WSI)는 50 mL 원심분리관에 시료 2 g을 넣고 증류수 25 mL를 천천히 가하여 완전히 물에 풀어지도록 한 다음 36℃에서 1시간 동안 교반한 다음 15000 rpm에서 1시간 동안 원심분리 후 상징액 1 mL를 취하여 고형분 함량을 구한 무게비(%)로 하였다.

라. WAI

시료 곡류의 수분 흡수 지수(WAI)는 WSI 측정 실험에서 원심분리 후 침전물에 대한 수분함량비(%)로 하였다.

마. Gel consistency

시료 곡류의 gel consistency는 amylograph 실험 후 호화액을 60℃ water bath에서 10분간 담그어 온도를 조정한 후 40℃ oven에 넣어 두었던 점도계(Bostwick consistometer, model Cento, U.S.A.)에 50 g을 넣은 후 30

초 동안 흘러간 거리로써 측정하였다.

바. Viscoelasticity

흑미(black rice), 보리(barley), 기장(millet), 메밀(buckwheat), 수수(sorghum) 등의 5가지 곡류 시료의 동적점탄성은 Advanced Rheometric Expansion System(2ARES-11A, Rheometric Scientific, UK)를 사용하여 측정하였다. 시료곡류는 먼저 실험용 소형 miller(cyclotec 1093 sample mill, Tecator, UK)을 사용하여 일정한 입도 크기로(80 - 100mesh)로 제분한 후 증류수를 가하여 수분 함량을 50%로 일정하게 조정한 다음 원판형의 점탄성 측정용 시료를 제조하기 위하여 특수하게 제조한 알루미늄 용기에 반죽을 틀에 맞게 넣고 끓는 물에서 30분간 가열하여 호화시킨 후 측정하였다. 먼저 strain sweep(0.1 20%)을 하여 선형성을 나타내는 범위내에서 strain을 10%로 정하고 frequency sweep(0.1 100 rad/sec)을 행하였으며 이 때 측정온도는 25℃에서 행하였으며 사용한 plate는 직경 25mm parallel plate를 사용하였다.

사. 볶음처리 시험

각 시료 100g을 원통형 회전식 볶음기를 이용하여 볶음처리하였음. 160℃, 180℃, 200℃에서 볶음처리한 결과 200℃에서는 빨리 탄화가 일어났고 160℃에서는 복음상태가 양호하지 못하였음. 따라서 볶음온도는 180℃로 고정하고 시간을 5, 10, 15 분으로 하여 볶음처리하였다.

아. Puffing 처리 시험

각 시료를 시중의 원통형 puffing기에 넣고 15분간 가열한 다음 puffing 처리하였다. 각 시료의 양, 가열조건 및 압력은 동일하게 설정하였다.

자. 볶음처리 시료 및 puffing 시료의 일반성분 분석

각 볶음시료의 지방, 수분, 단백질, 회분의 일반성분 분석은 AOAC법으

로 분석하였다.

차. 볶음처리 시료 및 puffing 시료의 색도, 환원당 분석

각 시료의 낟알 및 분말의 색도는 CR-200 Chroma meter (Minolta Inc., Japan)를 사용하여 L(명도), a(적색도), b(황색도)값을 측정하였으며 5회 측정값의 평균으로 나타내었다. 각시료의 환원당은 Somoge-Nelson법으로 분석하였다.

2. 결과 및 고찰

가. Amylogram 특성

각 곡류의 amylogram 특성치는 Table 4-1과 같다. 각 시료 곡류의 최대 점도는 보리가 1320 BU, 메밀1110BU, 수수940BU, 기장 755BU, 흑미 165BU로 나타났다. 전분의 노화 정도를 나타내는 setback값은 메밀의 경우 760BU로 가장 높게 나타났으며 수수, 보리, 흑미, 기장의 순으로 나타나 기장과 흑미의 경우가 노화가 잘 일어나지 않는 것을 알 수 있었다. 또한 이것으로부터 본 실험에 사용한 기장과 흑미의 경우 전분중 amylose의 함량이 매우 낮은 것으로 판단할 수 있다. 각 곡류의 호화개시 온도는 기장의 경우 73.5℃로 가장 높았으며 수수가 69℃, 흑미, 64℃, 메밀, 63.5℃이었으며 보리가 62.6℃로 가장 낮았다.

Table 4-1. Amylograph characteristics for various cereals

	black rice	buckwheat	sorghum	prosomillet
Peak viscosity(B.U.)	165	1110	940	755
Hot paste viscosity(B.U)	90	1035	430	225
Cold paste viscosity(B.U)	100	1870	605	510
Breakdown (B.U.)	75	75	510	530
Total setback(B.U.)	10	835	175	285
Setback(B.U)	-65	760	335	-245
Initial pasting temp.(℃)	64	63.5	69	73.5

나. Gel consistency, WSI, WAI

각 곡류의 점조도와 수분 흡수 지수 및 수분 용해도 지수를 측정한 결과는 Table 4-2와 같다. Consistometer로 측정한 시료 곡류의 점조도는 흑미의 경우 측정 범위를 넘어섰으며 수수가 11.1 cm, 기장, 8.9 cm, 보리가 3.95 cm로 나타났으며 메밀의 경우 0.3 cm로 가장 낮은 값을 나타내어 유동성이 가장 낮았다. 수분흡수지수는 보리가 59.51%로 가장 높았으며 수수의 경우 46.92%로 가장 낮게 나타났다. 수분용해도지수는 기장이 0.44%로 가장 높게 나타났으며 , 메밀의 경우 0.2%로 나타나 용출 고형분 함량이 가장 낮은 것을 알 수 있다.

Table 4-2. Gel consistency, WAI and WSI of various cereals

	black rice	buckwheat	sorghum	prosomillet
Gel consistency(cm)	-*	0.3	11.1	8.9
WSI(%)	47.79	51.57	46.92	53.13
WAI(%)	0.26	0.20	0.24	0.44

*: 측정범위를 넘어섬.

다. Viscoelasticity

각 곡류의 탄성성분인 G'(storage modulus)와 점성성분인 G"(loss modulus), G'/G"으로 나타내는 tan δ, Eta*를 측정한 결과는 Fig. 4-1, 2, 3, 4와 같다. 메밀과 보리의 경우 frequency가 증가함에 따라 tan δ 값이 크게 감소하는 경향을 나타내고 있으며 이것은 점성성분에 비하여 탄성 성분이 증가하는 것을 의미하며 흑미, 기장, 수수의 의 경우에는 반대로 frequency가 증가함에 따라서 tan δ 값이 증가하는 경향을 나타내어 점성성분이 증가함을 보여주고 있다. 이는 메밀과 보리가 낮은 gel consistency index 값을 나타내어 유동성이 낮았던 결과와 일치한다. 특히 흑미의 경우 G'과 G"값이 비슷하게 나타는 rubber like 성질을 나타내었으며 이는 흑미의 품종이 amylose의 함량이 매우 적은 glutinous rice인 것으로 판단할 수 있다.

라. 볶음조건별 색도의 변화

볶음시간별 색도의 변화를 조사한 경우, 낟알 과 분말 모두 볶음시간이 길어짐에 따라 L 값은 감소하였으나 a값 및 b값은 증가하였으며 볶음시간에 따른 차이는 분말보다 낟알에서 더 큰 차이를 나타내었고 그 차이는 볶음시간이 길수록 더 현저하였다(Table 4-3).

마. 볶음조건별 일반성분 및 환원당의 변화

볶음시간별 환원당의 변화를 조사한 결과 거의 모든시료에서 10분 볶음처리까지는 증가하였으나 15분 볶음처리시는 오히려 감소하였다. 볶음정도에 따른 일반성분의 변화를 조사한 결과 수분은 볶음시간이 증가할수록 현저히 감소하였고 지방, 회분함량에는 뚜렷한 차이가 없었으며 단백질 함량은 볶음시간이 길어짐에 따라 현저히 증가하였다.(Table4-4).

.

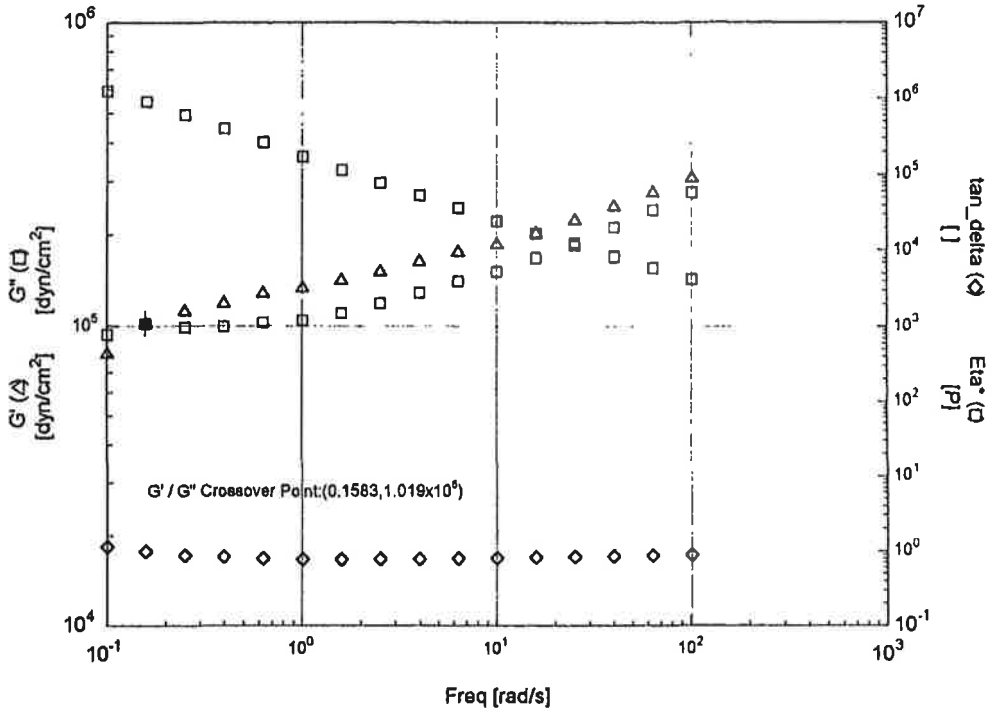


Fig. 4-1 Viscoelasticity of black rice flour

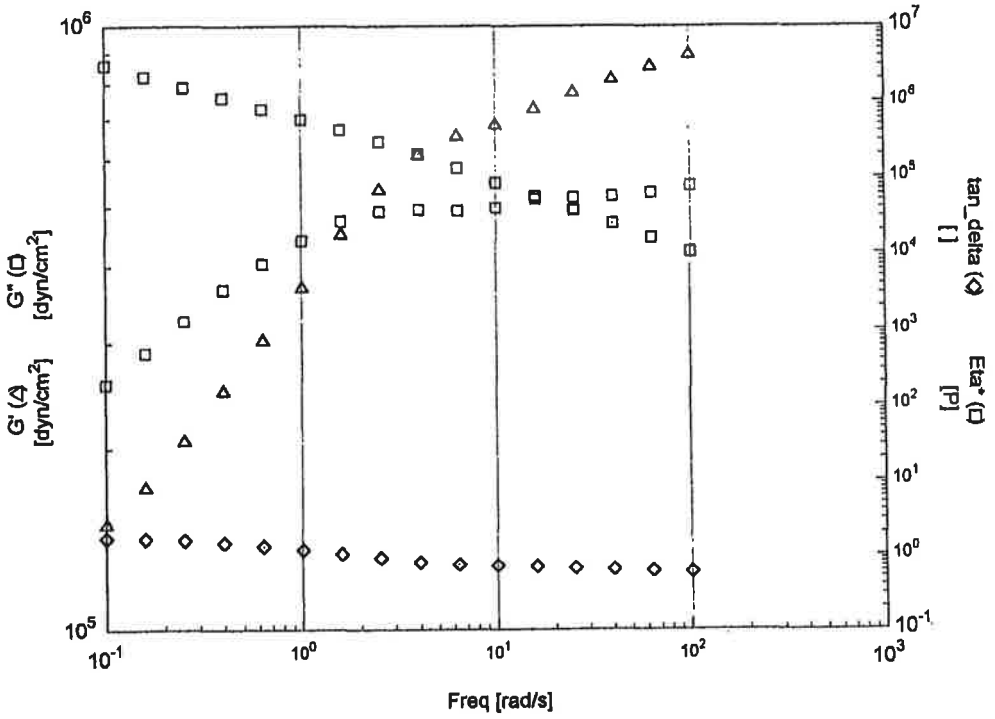


Fig. 4-2 Viscoelasticity of buckwheat flour

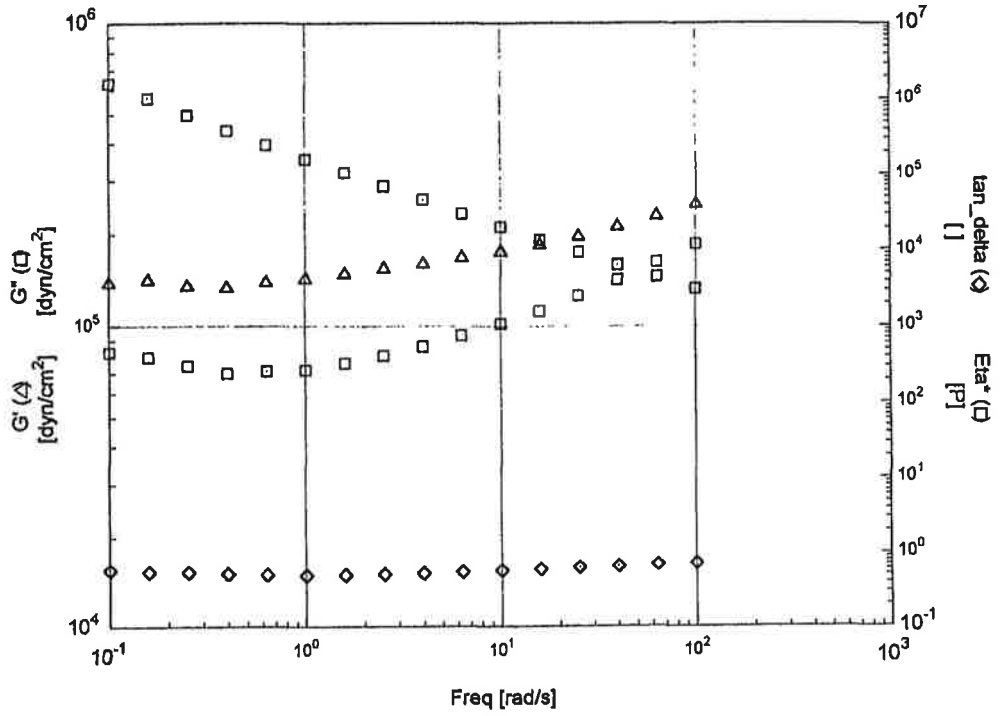


Fig. 4-3 Viscoelasticity of sorghum flour

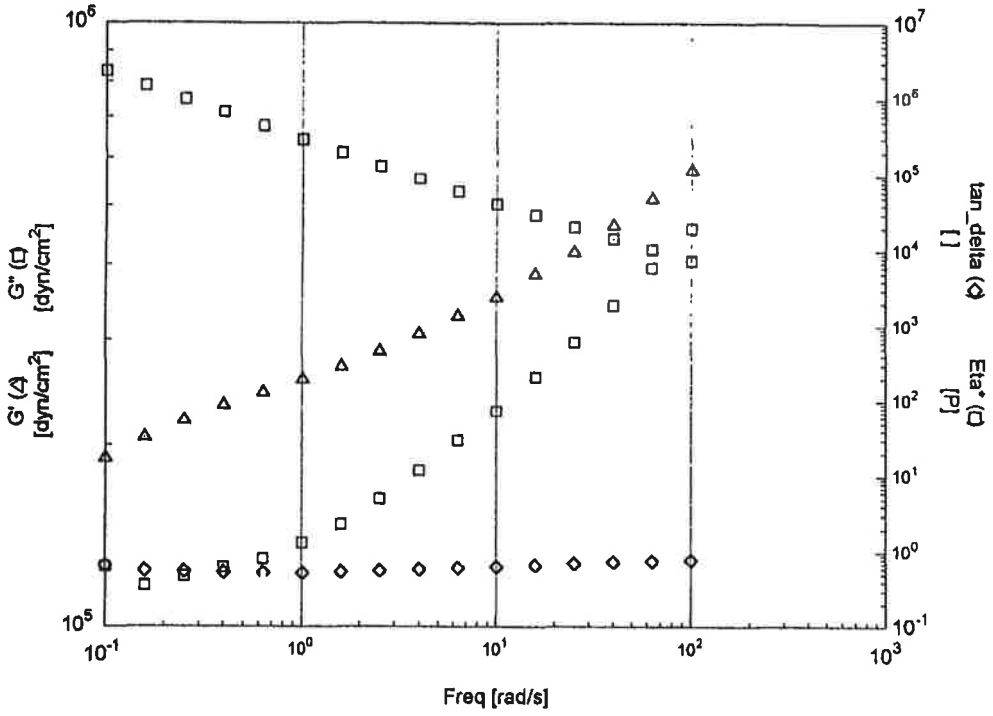


Fig. 4-4 Viscoelasticity of prospmillet flour

Table 4-3 Changes in color values of various cereals during roasting at 180℃

		Grain			Powder		
		L	a	b	L	a	b
Prosomillet	5min	59.96	5.46	27.27	89.55	-0.92	14.24
	10	58.65	7.58	31.54	83.47	1.27	16.14
	15	50.29	9.42	35.73	79.53	2.18	17.71
Buckwheat	5min	20.73	0.20	3.09	87.55	0.33	11.06
	10	37.06	9.31	14.30	71.17	4.80	20.64
	15	60.26	5.00	28.13	63.75	5.85	21.84
Sorghum	5min	69.77	3.63	22.76	81.48	3.20	12.15
	10	44.94	9.42	21.68	73.36	4.25	16.67
	15	33.24	8.13	17.12	67.89	3.99	17.09
Brown rice	5min	60.16	6.73	28.73	82.57	0.87	15.04
	10	57.31	6.44	23.88	68.00	4.53	20.93
	15	31.21	6.15	12.18	65.22	4.53	21.44
Black rice	5min	56.70	7.26	30.13	62.92	2.51	6.10
	10	38.59	9.11	18.38	60.15	3.40	12.98
	15	21.20	0.09	2.84	57.19	3.71	15.10

Table 4-4. Changes in proximate composition and reducing sugar of various cereals during roasting

		Moisture	Protein	Fat	Ash	Reducing sugar
Prosomillet	5min	3.41	11.73	1.33	0.60	70.27
	10	1.54	12.54	1.16	0.72	80.15
	15	0.86	12.78	0.93	0.62	39.91
Buckwheat	5min	3.18	13.10	3.30	2.34	81.32
	10	0.84	14.16	3.29	2.39	81.92
	15	0.95	14.77	3.38	2.22	40.81
Sorghum	5min	5.93	10.63	3.21	1.31	53.73
	10	2.69	11.07	2.79	1.53	74.12
	15	1.14	11.36	3.00	1.29	55.14
Brown rice	5min	5.67	7.81	5.88	1.24	129.47
	10	1.77	8.13	2.08	1.23	90.28
	15	1.32	8.14	2.11	1.21	54.08
Black rice	5min	5.75	10.65	2.69	1.52	75.20
	10	2.05	11.33	2.62	1.97	100.68
	15	1.20	11.39	2.90	1.73	38.69

제 2절 고활성 곡류의 제빵특성

고활성 곡류의 제빵특성은 우선 높은 활성을 보였던 수수를 이용하여 머핀에의 가공적성을 검토하였다.

1. 실험재료 및 방법

가. 실험재료

수수는 1997년 경북 제천산 수수를 대양영농조합으로부터 구입하였다. 수수는 정선 세척하여 40℃에서 풍건한 다음 분쇄기(Food mixer, modle Hanil FM707T)로 분쇄하여 40메쉬로 체질하여 사용하였다. 제빵용 밀가루는 1등품 무표백 박력분을 사용하였고 그밖에 베이킹 파우더, 버터, 전지분유, 설탕은 시중에서 구입한 것을 사용하였다.

나. 수수분말 및 밀가루의 일반성분 분석

수수분말 및 밀가루의 일반성분은 AOAC방법에 따라 분석하였다. 총식이섬유의 함량은 Prosky방법에 따라 total dietary fiber측정용 kit(Sigma Chemical Co. St. Louis, MO)를 사용하여 분석하였다.

다. 아밀로그래프 특성

수수가루 첨가시료의 아밀로그래프 특성은 Brabender Visco/Amylograph (Duisburg, Germany)를 사용하여 측정하였다. 즉, 밀가루에 수수가루를 0, 10, 20, 30% 되게 첨가한 혼합분을 조제한 뒤 고형분 11%(w/w)의 수용액을 제조하여 35℃에서 95℃까지 1.5℃/min의 속도로 가열하고 95℃에서 30분간 유지시킨 다음 다시 동일한 속도로 50℃까지 냉각

하여 측정하였으며 각 시료는 2회 반복하여 측정하였다.

라. 머핀의 제조

머핀은 일반 머핀 제조방법을 적용하여 박력분 566g, 설탕 340g, 소금 2.4g, 버터 226g, 베이킹 파우더 20g, 분유 42g, 계란 180g과 물 340g을 사용하여 제조하였다. 즉, 밀가루, 베이킹 파우더, 소금, 전지분유는 체질하여 두고, 버터에 설탕, 계란을 넣어 크림상으로 hand mixer (National, Japan)로 1분간 반죽한 뒤 체질한 재료들을 넣어 20초간 더 반죽하여 유산지를 깐 머핀컵에 65g 씩 취하여 baking oven 에 넣고 윗불 190℃, 아랫불 190℃에서 20분간 baking하였다. 수수머핀은 박력분의 10, 20, 30%를 수수가루로 대체하였다.

마. 머핀의 부피, 무게의 단면의 높이, 넓이 측정

머핀의 부피와 무게는 baking한 다음 1시간동안 실온에 방치한 후에 측정하였으며, 부피는 종자치환법으로 측정하였다. 머핀 단면의 크기를 측정하기 위하여 머핀을 위에서 아래로 정확히 반으로 자르고 다시 반으로 자른 단면의 최고 높이와 넓이를 측정하였다.

바. 머핀의 색도 및 조직감 측정

머핀의 색도는 머핀의 내부를 취하여 CR-200 Chroma meter (Minolta Inc., Japan)를 사용하여 L(명도), a(적색도), b(황색도)값을 측정하였으며 5회 측정값의 평균값으로 나타내었다. 조직감은 baking 1시간 후 머핀의 내부를 동일한 크기 (5x5x3 cm)로 잘라 TA-XT2 Texture analyzer (Texture Technologies Corp., Scardale, NY)를 사용하여 측정하였으며, 힘-거리곡선의 Texture profile analysis(TPA)parameter로부터 hardness, adhesiveness, springness, cohesiveness, gumminess, chewiness등을 산출하였다.

사. 머핀의 관능검사

관능검사는 한국식품개발연구원에 근무하는 46명의 연구원을 선별하여 실시하였다. 즉, 밀가루에 수수가루를 0, 10, 20, 30% 첨가하여 만든 머핀을 외관, 맛, 조직감, 전반적인 기호도에 대하여 1(대단히 나쁘다)에서 9(대단히 좋다)까지의 점수를 사용하여 평가하였다. 시료는 관능검사 시작 10분전에 관능검사용 그릇에 담아 관능검사원에게 평가하도록 제시되었고 결과는 SAS 프로그램을 이용하여 ANOVA분석을 한 다음 유의성 검정은 Student Newman Keuls Test를 사용하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 시료의 일반성분

본 머핀제조에 사용한 박력분 및 수수가루의 일반성분(wet basis)을 보면 수수가루는 수분이 9.1% 지방이 2.4%, 단백질이 8.9%, 회분이 1.3%, 총식이섬유가 3.2%였고, 박력분은 수분 10.4%, 지방 0.7%, 단백질 8.4%, 총식이섬유가 0.9%로서 단백질 함량은 수수와 박력분이 거의 비슷하였으며 지방과 식이섬유함량은 밀가루보다 수수에서 높게 나타났다.

나. 아밀로그래프 특성

Table 4-5에는 박력분에 수수가루를 첨가하여 아밀로그래프상의 호화특성을 조사한 결과를 나타내었다, 최고점도는 수수가루0%(밀가루 100%)가 550 B.U.인데 비하여 수수가루 30%를 첨가한 경우는 690 B.U., 수수가루 100인 경우는 830 B.U.를 나타내어 수수가루 첨가량이 증가할수록 최고점도가 증가하였다. 반면 95℃에서 15분간 유지한 후의 점도는 수수가루를 첨가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었으며 수수가루 0%인 경우는 510 I.U.인데 비하여 수수가루 100%인 경우는 370I.U.를 나타내었다. 최종점도는 수수가루 첨가량이 많을수록 감소하는 경향을 나타내었다. 도한 호화개시 온도는 수수가루 0%(밀가루 100%)인경우는 59.7℃이던 것이 수수가루 첨가 30%에서는 67.3℃로 증가하여 수수가루 첨가량이 증가함에 따라 호화개시 온도가 증가하였다. 이러한 결과는 몇종의 수수로부터 전분을 분리하여 밀가루 전분과 비교하여 아밀로그래프 특성을 조사한 결과 수수전분은 밀가루 전분보다 호화개시 온도가 높다고 보고한 Carcea등의 보고와 일치하였다.

Table 4-5. Amylograph characteristics for wheat flour substituted with sorghum flour 10, 20 and 30% levels

(11%, dry basis)

Sorghum flour contents(%)	Peak viscosity (B.U.)	15-min height (B.U.)	Final viscosity (B.U.)	Pasting temperature(℃)
0%	550	510	1105	59.7
10%	575	500	1045	63.0
20%	570	445	920	64.2
30%	690	520	990	67.3
100%	830	370	550	69.2

다. 머핀의 색도 및 외형

머핀의 제조원료인 박력분과 수수가루의 색도를 보면 수수가루가 박력분에 비하여 L값은 현저히 낮은데 비하여 a값, b값은 매우 높게 나타났다.(박력분;L값 95.6, a값 -0.76, b값 7.04, 수수가루;L값 79.3, a값 5.3, b값 11.7). 수수가루를 농도별로 첨가하여 제조한 머핀의 색도 변화를 Table 4-6 에 나타내었다. 밝기를 나타내는 L값은 수수가루의 첨가량이 증가할수록 유의하게 감소하여 어두운 색을 나타내었다. 반면 적색도를 나타내는 a값은 수수가루 첨가량이 많을수록 유의하게 증가하여 붉은 색을 띠었으며, 황색도를 나타내는 b값은 수수가루 첨가량 20%까지는 감소하다가 30% 첨가시는 오히려 증가하기 시작하였으나 0%인 대조군 보다는 높은 값을 나타내었다. 수수가루첨가에 의한 이러한 색도의 변화는 수수가루가 지닌 붉은 색소, anthocyanin, anthocyanidin 에 의한 것으로 추정된다. 또한 수수가루 첨가

에 다른 머핀의 부피변화를 보면(Table 4-7)수수가루 10%첨가시 까지는 영향이 없었으나 20%첨가시는 140cc에서 130.5cc로 감소하였고 30%첨가시에는 125.5cc로 유의하게 감소하였다. Johnson 은 머핀 제조시 밀가루 대신 찹쌀가루를 대체한 결과 찹쌀가루 함량이 증가할수록 머핀의 높이가 줄고 옆으로 퍼지는 모양을 한다고 보고하였다. 그러나 찰수수가루를 첨가한 본 실험에서는 옆넓이는 수수가루 첨가에 의한 영향이 없었고 머핀의 높이가 10% 첨가시부터 약간 감소하기 시작하여 20, 30%첨가시는 유의하게 감소하여 찰수수가루 첨가는 찹쌀가루 첨가와는 다른 양상을 보이는 것으로 판단되었다. 이러한 수수가루 첨가에 따른 부피의 감소는 밀가루가 수수가루에 의해 대체됨에 따른 글루텐의 희석효과에 의한 영향이라고 사료된다. 관찰에 의한 머핀의 내부조직은 수수가루 첨가량이 많을수록 거칠어지는 경향이 있었다.

Table 4-6. Color values for the muffins with sorghum flour substitution at 10, 20 and 30% levels

Soghum flour content(%)	L value	a value	b value
0%	77.01a	-4.33d	22.07a
10%	70.93b	-0.11c	19.67c
20%	64.93c	2.18b	19.88c
30%	60.17d	3.83a	20.74b

The same superscript letters in each column are not significantly different($p < 0.05$)

Table 4-7. Baking properties for muffins with sorghum flour sustitution 10, 20 and 30% levels

Sorghum flour content(%)	Volume(cc)	Weight(g)	Width(cm)	Height(cm)
0%	140.0±5.66a	58.9±0.35	6.2±0.17	5.7±0.19a
10%	138.0±0.00a	59.0±0.17	6.3±0.15	5.6±0.17ab
20%	130.5±0.71ab	59.3±0.80	6.2±0.11	5.4±0.21b
30%	125.5±4.95b	59.2±0.30	6.2±0.12	5.1±0.13c

라. 머핀의 조직감

수수가루의 첨가농도를 달리하여 제조한 머핀의 물리적 특성으로는 Hardness, adhesiveness, springness, cohesiveness, gumminess, chewiness **등을** texture analyzer**로 측정하여 나타내었다**(Table 4-8). Hardness**를 보면 수수가루 첨가** 20% **까지는 영향을 미치지 않았으나** 30% **첨가 시는 유의하게 증가하여 수수가루를 과량으로 첨가할 경우 조직감이 딱딱해 지는 것을 알 수 있었다**. Springness**는 수수가루 첨가** 0%**인 대조군에 비하여 수수가루 첨가군 모두 유의하게 낮은 값을 나타내었으나 수수가루 첨가군사이에는 차이가 없었다**. Cohesiveness**도 수수가루 첨가** 20%**까지는 영향을 미치지 않아** hardness**와 비슷한 양상을 보였으나** 30% **첨가시는** hardness **와는 반대로 유의하게 감소하였다**.

Table 4-8. Texture profile analyse for muffins with sorghum flour substitution at 10, 20 and 30% levels

Sorghum flour content(%)	Hardness	Adhesive-ness	Spring-ness	Cohesive-ness	Gummi-ness	Chewi-ness
0 %	352.36b	-3.30	0.895a	0.472a	166.36	148.84
10%	350.11b	-5.19	0.853b	0.463a	162.13	138.39
20%	346.13b	-5.78	0.853b	0.459a	159.13	135.61
30%	406.79a	-8.91	0.820b	0.426b	173.57	142.37

마. 머핀의 기호도

수수가루를 0, 10, 20, 30% **첨가하여 제조한 머핀의 관능검사 결과는** Table 4-9**에 나타내었다. 머핀의 외관의 경우 대조구가** 7.37**로 가장 높았으나 수수가루를 첨가함에 따라 그 값은 유의하게 감소되었고** 30% **첨가시는** 4.89**로 낮은 기호도를 보여 수수가루 첨가에 의한 영향을 크게 받는 것을 알 수 있었다. 그러나 수수가루 첨가군 사이에는 유의차가 없었으며** 10, 20%**첨가시는 거의 비슷한 값을 보였다. 또한 관능검사요원의 의견으로부터 수수가루 첨가에 의한 수수머핀 외관의 기호도 감소는 색도의 변화에 가장 크게 영향을 받는 것으로 추측되었다. 향의 기호도에 있어서도 외관과 비슷한 경향을 보였는데 수수가루 첨가군은 대조군에 비하여 유의하게 낮은 기호도를 나타내었다. 조직감의 기호도를 보면** 10% **첨가시는 수수가루를 첨가하지 않은 대조군과 거의 동일한 값을 나타내어 수수가루 첨가에 의한 영**

향을 거의 받지 않았고 20% 첨가시는 대조군에 비하여 낮은 값을 나타내었으며 30% 첨가시는 조직감에 대한 기호도가 유의하게 감소하였다.TPA에 의한 조직감 측정치에서 adhesiveness, gumminess, chewiness는 수수가루 첨가에 의한 영향이 없었으나 hardness는 유의하게 증가하였고, cohesiveness는 유의하게 감소한 것으로 보아 수수가루 첨가에 따른 조직감의 기호도 감소는 hardness와,cohesiveness에 크게 영향을 받는 것으로 사료되었다. 그러나 맛과 전반적인 기호도에 있어서는 수수가루 첨가량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의차가 없었으며 수수가루 첨가에 의해 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 이상 관능검사에 의한 기호도 검사결과, 머핀 제조시 수수가루를 첨가함에 따라 외관의 기호도는 크게 감소하였는데 이는 수수가루의 붉은 색소의 영향으로 여겨진다. 다른 항목에서의 기호도를 종합해 볼 때 20% 첨가시 까지는 머핀의 품질에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었댜. 따라서 수수의 기능성을 살리고 수수의 이용도 증대 및 머핀의 제품다양화 측면에서 볼 때 수수가루 첨가시의 제조방법을 개선한다면 보다 기능적, 품직특성이 좋은 수수머핀이 가능하리라 사료된다.

Table 4-9. Sensory characteristics for muffins with sorghum flour substitution at 10, 20 and 30% levels

Sorghum flour content(%)	Appearance	Flavor	Taste	Texture	Overall acceptance
0%	7.3a	6.6a	6.0	6.1a	6.0
10%	5.4b	5.8b	5.6	6.0a	5.8
20%	5.3b	5.7b	5.6	5.4ab	5.6
30%	4.8b	5.5b	5.4	4.9b	5.5

이상, 콜레스테롤 상승억제효능이 높은 수수의 이용성 증대를 위한 연구의 일환으로 수수가루를 0, 10, 20, 30% 첨가한 머핀을 제조하여 품질 특성을 조사하였다. 박력분의 밀가루- 수수가루의 혼합분의 아밀로그램 특성을 보면 수수가루 첨가량이 많을수록 최고점도 및 호화개시온도는 증가하였고 최종점도는 감소하였다. 또한 수수가루 첨가량이 증가할수록 머핀 내부의 L값은 감소하였고 a값은 증가하였다. 머핀의 부피는 수수가루 첨가량 20% 이상에서 감소하였다. Adhesiveness, gumminess, chewiness는 수수가루 첨가에 의한 영향이 없었고, hardness와 cohesiveness도 수수 20%첨가시까지는 유의차가 없었다. 머핀의 관능검사 결과, 특히, 머핀의 외관, 향은 수수가루 첨가에 의한 영향을 크게 받아 대조구에 비하여 유의하게 낮은 값을 보였다 그러나 조직감은 10%첨가시는 수수가루의 영향이 전혀 없었고 맛과 전반적 기호도는 수수가루 첨가에 의한 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때 수수가루의 기능성을 살리고 수수가루 머핀의 품질 특성 측면에서 볼 때 수수가루 20%정도는 첨가가 가능한 것으로 사료되었다.

제 3절 흑미음료 제품개발

제 2절에서는 수수를 이용한 머핀의 제조를 검토하였고 본 절에서는 흑미를 이용한 음료 제품을 개발하였다.

1. 재료 및 방법

가. 실험재료

흑미는 1999년산 용금 1호를 지산 농협으로부터 구입하여 가볍게 세정, 건조시킨 후 60 메쉬로 분쇄하였고, 흑미 미강은 흑미를 12분도로 도정하여 얻었다. 만니톨, 고과당, 트레할로스, 프림향, 프림, 구연산, 누룽지향, 헤이즐럿향등은 각각 시중에서 구입하였다.

나. 적정 추출조건 검토

1) 흑미분말 및 흑미미강 이용 열수추출조건 검토

흑미분말 및 흑미미강의 적정열수추출조건을 설정하기 위하여 흑미 분말에 증류수를 5배, 10배, 20배 가하여 환류냉각추출장치를 이용하여 100℃

에서 2시간동안 추출하였다.

2) 흑미분말 및 흑미미강 이용 에탄올 추출조건 검토

흑미분말 및 흑미미강의 에탄올 추출물을 얻기 위하여 각 분말의 10배 되는 50%에탄올을 가하고 환류냉각추출장치를 이용하여 끓는 온도에서 2 시간동안 가열 추출하였다.

3) 흑미 및 흑미미강의 볶음처리 시험

흑미음료제조시 여과공정과 향미를 고려하여 시료를 추출하기전에 볶음처리를 실시하였다. 볶음조건을 예비실험으로 검토한 결과 200g의 시료를 200℃에서 20분간 볶음처리하여 추출시료로 사용하였다.

다. 추출물의 색도 및 탁도 측정

추출물의 색도는 색차계를 이용하여 측정하였고 탁도는 추출액을 적정 농도로 희석하여 590nm에서 OD치를 측정하였다.

라. 적정음용농도, 부재료의 선정 및 배합비 결정시험

주재료인 흑미의 적정음용 농도를 관능검사를 통하여 결정하고 여기에 당과 향(만니톨, 고과당, 트레할로스, 프림향, 프림, 구연산, 머루향 등)을 부재료로 첨가하여 관능검사를 통하여 흑미음료와 어울리는 부재료의 종류 및 농도를 결정하여 최종 배합비를 선정하였다.

제품의 품질 특성으로서는 침전상태, 탁도, 색도를 분석하였고 관능검사를 통한 기호도를 조사하였으며 각 제조된 제품을 37℃ 및 햇빛이 드는 창가에 두면서 경시적으로 외관, 침전상태, 색의 변화등 품질 변화를 조사하여 저장성을 검토하였다.

2. 결과 및 고찰

ㅇ 적정 추출조건 및 예비제조시험

흑미음료 제조용으로 흑미분말과 흑미미강을 이용하여 추출, 예비제조시험을 해 본 결과, 흑미분말은 추출후 여과가 용이하지 않고 경제적인 측면등을 고려하여 도정원곡은 다른 용도로 이용하고 흑미 미강은 음료로 이용하는 방안을 검토하였다. 또한 추출용매에 있어서도 에탄올 추출보다는 제조공정, 수율등을 고려해볼 때 물 추출이 더 적합한 것으로 나타나 이하 흑미미강을 이용하여 물 추출하는 방법을 선택하였다.

ㅇ 제조시험 1

흑미미강 100g에 500ml의 물을 가하여 가열한 다음 전분분해효소 (Brewers amylliq T.S)를 2-3방울 가하여 약 5분간 가열한 후 부직포로 착즙하여 물을 500ml 더 가하여 착즙액을 1000ml 로 보정하였다. 흑미 추출액 1000ml에 트레할로스 100g, 변성전분 2g, 프림 10g을 가하여 2-3간 가열한 다음 hot filling한 후 열수살균 10분하여 냉각하였다.

그 결과, 흑미의 맛이 매우 강하고, 구수한 향이 강하게 느껴지며 짙은 보랏빛으로 매우 탁도가 높은 현탁액이었다. 기호도 관능검사 결과 9점 평가법에서 향에 대한 기호도를 제외한 외관, 맛, 전반적 기호도의 전 항목에서 5점이하의 낮은 점수를 보였다. 37℃에서 저장실험을 한 결과 저장 2주째 표면에 뿌연 막이 형성되고, 층분리가 일어났다. 또한 동일한 추출조건에서 프림함량, 식염첨가여부등 조미방법을 달리한 결과 거의 비슷한 결과를 보였으며 특히 프림 함량을 높혔을 때에는 층분리가 더 심하게 나타나 우선 층분리 개선을 위한 추출방법과 조미방법의 검토가 요구되었다.

ㅇ 제조시험 2

여과, 향, 층분리의 개선을 위하여 흑미미강을 볶음 처리한 후 추출하는 방법을 검토하였다(Table 4-10, 11). 즉 흑미미강을 200℃에서 20분간 볶음처리하여 볶음미강 150g에 1500ml의 물을 가하여 가열추출한 다음 여과하여 흑미미강 추출액으로 사용하였다. 볶음미강을 이용함으로써 여과가 용이하였으며 Table 4-10과 같은 비율로 배합하여 기호도에 대한 관능검사를 실시한 결과 외관에 있어서는 B, C배합이 A배합에 비하여 유의하게 높은 기호도를 보였으나 맛과 향에 있어서는 B, C배합이 A배합에 비하여 유의하게 낮은 기호도를 나타내었다. 특히 배합 B의 경우는 바닐라향이 너무 강하여 흑미의 구수한 맛과 어울리지 않았으며 산미도 이 음료에는 적합하지 않는 것으로 나타났다. 음용감은 배합 C가 가장 좋았고 배합 A가 가장 낮게 나타났고 전체적인 기호도는 B, C배합이 A배합에 비하여 좋은 것으로 나타났다. 특히 트레할로스와 프림을 대량 첨가한 배합 A의 경우는 배합 B, C에 비하여 탁도가 10배 이상 높게 나타나 색을 비롯한 외관과 음용감을 저하시키는 결과를 가져왔다. 따라서 제조시험 3에서는 프림양을 줄이고 향의 개

선과 침전방지에 중점을 두어 첨가부재료 및 배합비를 다시 구성하였다.

Table 4-11. **배합비의 조성**

재료	배합비 A	배합비 B	배합비 C
흑미미강 추출액	500	500	500
트레할로스	37.5	-	-
프림	25	-	-
만니톨	12.5	15	15
솔스타	1.25	-	-
고과당	12.5	15	15
맛소금	1	1.06	1.06
설탕	-	20	20
구연산	-	0.55	0.55
파인애플향 분말	-	0.165	-
탁도(590nm OD)	17.19	1.64	1.52
당도(Brix)	9.1	10.8	10.6

Table 4-12. 배합비에 따른 기호도의 변화

	배합A	배합B	배합C
외관	5.42b	7.50a	7.35a
향	6.57a	4.23b	5.73a
맛	6.18a	4.52b	3.89b
음용감	4.97b	7.12a	7.25a
전반적 기호도	5.51ns	6.34	6.57

ㅇ제조시험 3

제조시험 2와 동일하게 볶음 흑미미강으로부터 추출물을 조제하여 주재료로 사용하였고 여기에 카라기난, 헤이즐럿향, 누룽지향, 트레할로스등 의 부재료를 Table 4-13 과 같이 배합한 다음 교반가열후 hot filling, 열수살균하였다. 본 배합비에서는 색을 비롯한 외관 개선을 위하여 프림의 함량을 조절하였고 향의 개선을 위하여 흑미와 상승효과를 나타낼 수 있을 것으로 예상되는 헤이즐럿 향과 누룽지향을 검토하였으며 저장중 일어나는 침전방지를 기대하여 카라기난 첨가여부를 검토하였다. 그 결과 프림의 배합비율을 감소시켜도 무첨가에 비하여 흑미 고유의 색이 흐려지고, 외관이 저하되었으며 카라기난 첨가의 뚜렷한 효과도 볼 수 없었다. 향의 첨가가로 향과 맛이 개선되는 경향을 보였다. 표에서 보는 바와 같이 각종 배합비를 달리하여 기호도에 대한 관능검사를 실시한 결과, 색에 대한 기호도는 구연산을 첨가한 배합비 E 가 가장 높았고 다음은 배합비 G였으며 프림이 들어간 배합비 D와 F는 낮은 값을 나타내었다. 향에 대한 기호도는 헤이즐럿향을 첨가한 배합비 E가 가장 높은 기호도를 나타내었으나 유의차가 없었고 헤이즐럿 향의 첨가도 큰 영향을 미치지 않았다. 맛에 대한 기호도는 배합비 G가 가장 높았고 다음은 배합비 F였다. 음용감에 있어서도 배합비 G가 유의하게 높았고 전반적 기호도에 있어서도 배합비 G와 F가 타 배합비에 비하여 높은 기호도를 나타내었다. 이상의 배합비를 종합해 본 결과 기호도를 향상시키기 위하여 좀더 배합비를 수정, 보완 할 필요가 있는 것으로 판단되었다.

Table 4-13. **배합비의 조성**(g)

	배합 D	**배합 E**	**배합 F**	**배합 G**
추출액	500	500	500	500
포도당	25	20	20	20
솔비톨	.	.	5	5
소금	0.25	0.25	0.5	0.5
말토 덱스트린	5	20	10	10
트레할로즈	10	10	15	15
카라기난	0.25	0.25	.	.
프림	5	.	5	.
구연산	.	0.20	.	.
헤이즐럿향	.	0.015	.	.
누룽지향	.	.	.	0.015

Table 4-14. **배합비에 따른 기호도의 변화**

	배합 D	배합 E	배합 F	배합 G
색 기호도	5.0ab	7.25a	3.75b	6.75a
향 기호도	5.75ns	7.25	4.75	6.50
맛 기호도	4.50b	4.50b	6.75a	7.25a
음용감	6.0ab	4.25b	6.50ab	6.75a
전반적 기호도	6.0b	4.0b	6.75a	6.75a

ㅇ 제조 시험 4

제조시험 2와 동일하게 추출한 흑미 추출액을 이용하여 당, 향등을 변화시킨 Table 4-15와 같이 배합하여 관능검사를 실시하였다. 그 결과 전반적으로 종합적 기호도가 상승하였고 각 항목별로도 배합비 H, I, J 모두 비교적 높은 점수를 나타내어 맛, 향, 외관, 음용감 모두 좋은 것으로 나타났다. 배합비간에는 큰 차이를 보이지 않았고 거의 비슷한 경향을 나타내었으나 배합비 H에서 향미 기호도 증대를 기대했던 프림향의 첨가는 큰 효과가 없었고 역시 배합비 J에서의 누룽지향의 첨가가 기호도를 증가시키는 것으로 나타났으며 전반적 기호도에서 배합비 J가 유의하게 높은기호도를 나타내었다. 또한 상기 배합비 제품을 37℃에서 저장실험을 실시한 결과 저장 10주간 층 분리도 없었고 색도 유지되었으며 우수한 품질상태로서 좋은 저장성을 나타내었다. 이상의 시험결과 흑미음료의 최적 배합비는 배합비 J로 결정하였으며 주된 제조공정은 흑미미강의 추출공정, 여과공정, 배합공정, 충진, 살균, 냉각으로 구성되어 있으며 앞으로 산업화를 위해서는 계속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

표 4-15. **배합비의 조성** (g)

재료	배합비 H	배합비 I	배합비 J
흑미미강 추출액	500	500	**500**
말토덱스트린	10	10	**10**
트레할로스	10	10	**13.5**
프림향	0.53		
만니톨	25	25	**17.5**
솔스타	1.25		
고과당	25	25	**17.5**
맛소금	1	1	**0.5**
구연산	0.14		**0.26**
누룽지향	0.01		**0.015**

Table 4-16. **배합비에 따른 기호도의 변화**

	배합 H	배합 I	배합 J
외관	7.37rs	7.07	7.64
향	7.91rs	7.41	8.35
맛	7.03rs	6.89	7.15
음용감	7.56rs	6.96	7.97
전반적 기호도	7.55b	7.35b	8.23**a**

참 고 문 헌

1. Hahn, D.H., Rooney, L.W. and Earp, C.F.: Tannins and poplyphenols of sorghum. *Cereal Foods, World*, **29**, 776-779(1984)
2. Earp, C.F., Akingbala, J.O., Ring, S.H. and Rooney, L,W.:Evalluation of several methods to determine tannins in sorghums with varying kernel characteristics. *Cereal Chem*, **58**, 234-239(1981)
3. Deschner, E.E., Ruperto, J.,Wong, G. and Newmark, H.L: Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethaneinduced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, **7**, 1193-1196(1991)
4. Huang, M.T., Wood, A.W., Newmark, H.L., Sayer, J.M.,Yagi. H., Jerina, D.M. and Conney, A. H.: Inhibition of mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by pheolic plant flavonoids. *Carcinogenesis*, **4,** 1631-1637(1983)
5. Verma, A.K., Johnson, J.A., Gould, M.N. and Tanner, M.A.:Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and N-Nitrosomethylurea induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res*., **48**, 5754-5788(1988)

6. Gimmer, H.R., Parbhoo, V, and McGrath, R.M.: Antimutagenicity of polyphenol-rich fractions from sorghum bicolor grain. *J. Sci. Food Agric.*, **59**,25-256(1992)
7. Ha, T.Y., Cho,I.J. and Nam, Y.J: Screening of inhibitory activity against oxidative stress from several agricultural products. the 57th annual meeting of the Korean Society of Food Science and Technology, Seoul, Korea(1996)
8. Ha, T.Y., Cho,I.J. and Lee, S.H.: Screening of HMG-CoA reductase inhibitory activity of ethanol and methanol extracts from cereals and regumes (in Korean). Korean *J.Food Sci. Techol.* **30**. 224-229(1998)
9. Young, R., Haidara, M., Rooney, L.W. and Waniska, R.D.: Parboild sorghum: development of a novel decorticated product. *J. Cereal Sci.*, **11**. 277-283(1990)
10. Mille, O.H. and Burns, E.E.: Starch characteristics of selected grain sorghums as related to human foods. *J. Food Sci.* **35**, 666-672(1970)
11. Nwanguma, B.C. and Eze, M.O.: Changes in the concentrations of the polyphenolic constituents of sorghum during malting and mashing, *J. Sci. Food Agric.*, **70**, 162-166(1996)
12. Mokhoro, C.T. and Jackson, D.S.: Starch related changes in stored soft sorghum porridge, *J. Fod sci*, **60**, 389-394(1996)
13. Chibber, B.A.K., Mertz, E.T. and Axtell, J.D.: Effect of dehulling on tannin content, protein distribution and quality of high and low tannin sorghum. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 679-683(1978)
14. Youssef, A.M.M., Moharran, Y.G., Moustaffa, E.K., Bolling, H. and Harmuth, A.E.: New extruded products form sorghum, *Food Chem.*, **37**, 189-199(1990)
15. Hamad, S.H., Boecker, G., Vogel.R.F. and Hammes, W.P.:

Microbiological and chemical analysis of femented sorghum dough for kisra production, *Appl. Microbiol.Biotech.*, **37**, 728-731(1993)

16. A.O.A.C.: Official methods of analysis 15th de., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., p.161(1990)
17. Prosky, L., Asp, N.G., Furda, I., Devereis, J.W., Scjweozer, T.F. and Harland, B. A.: Determination of total dietary fiber in foods and food products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 677-684(1987)
18. Sultan, W.J.: Practical baking, In *Factors concerning biscuits and muffins*, 3rd ed., the AVI Publishing Co. Inc., p. 191-207(1983)
19. SAS: SAS User's Guide: Statistics: Version 6.03. SAS Institute Inc.: Cary. NC.(1988)
20. Carcea, M., Cubadda, R. and Acquistucci, R.: Physicochemical and rheologocal characterization of sorghum starch, *J. Food Sci.*, **57**, 1024-1028(1992)
21. Jonson, F.C.S.: Characteristics of muffins containing various levels of waxy rice flour. *Cereal Chem.* **67**, 114-119(1990)