

최 종
연구보고서

국산부추로부터 만성질환 예방활성의 규명 및 신기능
고부가가치 상품의 개발

Elucidation of Preventive Effects of Korean *Buchu* on
Chronic Degenerative Diseases and Development
of Value Added Functional Foods

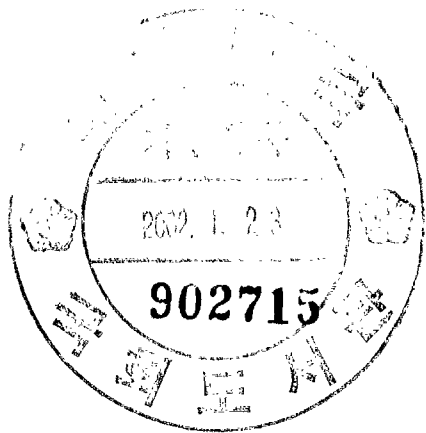
부추의 항균, 항동맥경화성 물질의 탐색 및 기능성 부추제품의
개발

Characterization of Active Constituents with Antibacterial
and Antiatherogenic Effects from *Buchu* and
Development of Functional Products

부추의 항당뇨 효과 탐색 및 기능성 부추제품의 개발
Elucidation of Antidiabetic Effects of *Buchu* and
Development of Functional Products

연구기관
인제대학교 식품과학연구소

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국산부추로부터 반성질환 예방활성의 규명 및 신기능 고부가가치 상품의 개발” 과제 (제 1 세부과제 “부추의 항균, 항동맥경화성 물질의 탐색 및 기능성부추제품의 개발”, 제 2 세부과제 “부추의 항당뇨효과 탐색 및 항당뇨 성분을 이용한 기능성 부추제품의 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 12일

주 관 연 구 기 관 명 : 인 제 대 학 교

총괄연구책임자 : 권태완

세부연구책임자 : 김정인

연 구 원 : 문갑순

연 구 원 : 송영선

연 구 원 : 홍정화

연 구 원 : 김재철

요 약 문

I. 제 목

국산부추로부터 만성질환 예방활성의 규명 및 신기능 고부가가치 상품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

부추(*Allium tuberosum Rottler*)는 마늘, 양파와 같이 함황식품 중의 하나로, 황화합물 뿐만 아니라 클로로필, β -carotene, 비타민 C, Se, 식이섬유, 양질의 유리 아미노산들이 다량 함유되어 여러 생리적 기능을 나타낼 것으로 기대된다. 부추는 강장효과 등 약리효과가 인정되고 있고, 부추에 다량 함유되어 있는 함황성분은 항균작용을 나타낼 것으로 기대된다. 현재 우리나라는 고도의 경제성장 및 인구의 고령화 추세로 인해 심혈관질환, 당뇨병 등의 성인병이 증가하고 있다. LDL의 산화는 동맥경화를 유발하는 주요 요인이 되며, 산화적 스트레스는 당뇨병 발병과 관련이 깊고, 당뇨 합병증을 유발하는 주요 요인이 되고 있다. 부추는 항혈전 응집효과가 있다고 알려져 있으며, 식이섬유를 다량 함유하고 있어, 혈중 콜레스테롤 농도 저하 및 혈당 조절 효과를 기대할 수 있다. 한편 부추에 포함된 항산화 영양소, chlorophyll, 페놀 화합물, sulfide 유도체들은 항산화능을 포함한 생리활성을 나타낼 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 부추의 항균활성 물질을 분리하여 항균활성 제품 및 장내균총 개선용 제품을 개발하고, 부추의 항동맥경화 물질을 분리, 동정하여 항동맥경화 제품을 개발하고자 하였다. 또한 부추의 항당뇨효과를 규명하고, 그 활성성분을 활용하여 기능성 부추제품을 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 제 1 세부 : 부추의 항균, 항동맥경화성 물질의 탐색 및 기능성 부추제품의 개발

가. 부추의 항균활성물질의 분리 및 화학적 특성 규명

- 1) Ultrafiltration
- 2) liquid-liquid extraction
- 3) Thin layer chromatography

나. 항균성 부추제품 개발

- 1) 부추의 항균성분을 활용한 폴리에틸렌 필름 개발
- 2) 부추의 장내균총 개선효과 탐색 및 제품 개발

다. 부추 추출물의 low density lipoprotein(LDL) 산화 억제능 및 항동맥경화 효과 규명

- 1) In vitro에서 부추 추출물의 항동맥경화 효과 조사
- 2) 당뇨쥐의 지질대사와 혈관구조에 미치는 영향 규명
 - 가) LDL 산화억제능 측정
 - 나) 지질 함량 및 배설량 측정
 - 다) 콜레스테롤 합성 율속 효소 활성 측정
 - 라) 대동맥궁 미세구조 관찰

라. LDL 산화억제물질의 분리 및 항동맥경화성 부추제품 개발

- 1) LDL 산화억제물질의 분리 및 동정
- 2) 활성물질의 LDL 산화억제능 측정
- 3) 항동맥경화 기능성 제품 개발

2. 제 2 세부 : 부추의 항당뇨효과 탐색 및 항당뇨 성분을 이용한 기능성 부추 제품의 개발

가. 부추의 항당뇨효과 규명

- 1) 당뇨쥐에 있어서 부추의 혈당조절 효과 규명
- 2) 부추 섭취가 식이의 상부소화관 내 이동속도에 미치는 영향 측정
- 3) 부추의 탄수화물 소화효소 저해활성 및 인슐린 리셉터에 미치는 영향 조사
- 4) 부추 용매획분별 항당뇨 효과 규명

나. 부추의 항산화효과 규명

- 1) 용매별 추출물의 in vitro 항산화 효과 측정
- 2) 항산화물질 함량 측정
- 3) 당뇨쥐에 있어서 부추 식이 및 용매분획물의 산화억제 효과 탐색
 - 가) 항산화 효소계 활성 측정
 - 나) 활성산소종 함량 측정

다) lipofuscin 측정

다. 건강증진 식품소재로서 부추성분별 추출, 가공방법 개발

- 1) 부추 건조 가공품 타블렛 개발
- 2) 부추즙과 잔류고형물 가공제품 개발
- 3) 기능성 부추제품의 항산화능 측정

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 제 1 세부 : 부추의 항균, 항동맥경화성 물질의 탐색 및 기능성 부추제품의 개발

가. 부추의 항균활성물질 분리 및 화학적 특성 규명

부추의 항균물질은 분자량 5,000 이하의 저분자 물질로서 용매분획 결과 chloroform 분획에서 높은 활성을 나타내었다. Chloroform 분획을 TLC와 HPLC로 분리하여 GC/MS로 분석한 결과 methyl 8-methyldecanoate와 propenyl methyl disulfide, S-methyl methylthiosulfonate, dimethyl disulfide가 항균물질이었다.

나. 항균성 부추제품 개발

부추 항균물질을 코팅한 polyethylene film은 어묵 저장시 10℃, 7일째 생균수를 10배 줄일 수 있었다. *Bifidobacterium adolescentis*와 *Clostridium butyricum*에 대한 효과가 가장 컸다. 장내균총 개선용 캡슐제품의 경우 섭취 전·후 정상인과 변비환자 분변의 *Bifidobacterium*속의 수치를 비교한 결과 정상인과 변비환자 모두 섭취 후 증가됨을 알 수 있었다.

다. 부추 추출물의 LDL 산화 억제능 및 항동맥경화 효과 규명

부추의 용매별 획분 중 in vitro에서 LDL 산화 억제능, 혈소판 응집억제 효과 및 HMG-CoA reductase 활성 억제효과는 에틸아세테이트층에서 가장 높게 나타났으며, 혈전용해능은 디클로로메탄층, 에틸아세테이트층 순으로 그 활성이 높았다. Streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 쥐에 있어서 부추 디클로로메탄 및 에틸아세테이트 획분을 8주간 섭취시킨 결과, 부추당뇨군은 혈장에서 혈전용해능이 증가했으며, 부추당뇨군의 혈장 콜레스테롤과 중성지방은 당뇨대조군에 비해 다소 낮게 나타났다. 혈장과 LDL의 TBARS 함량은 정상군에 비해 당뇨대조군이 유의적으로 높았고,

반면 부추당뇨군은 정상군 수준으로 회복되었다. 적혈구의 glutathione peroxidase 와 superoxide dismutase(SOD) 활성은 당뇨대조군이 정상군에 비해 유의적으로 낮았고, 부추당뇨군은 정상군 수준으로 회복되었다. HMG-CoA reductase 활성은 당뇨대조군의 경우 정상군에 비해 유의적으로 높았으나 부추당뇨군은 정상군 수준으로 회복되었다. 분변의 총지질 및 담즙산 배설량은 당뇨대조군보다 부추당뇨군에서 증가하였다. 대동맥 내피 미세구조를 주사 전자 현미경으로 관찰한 결과 정상군에 비해 당뇨대조군에서 지방구 침착이 되고, fibrous plaque가 형성되었으나, 부추당뇨군에서는 지방구 침착과 plaque의 형성이 적게 나타났다.

라. LDL 산화억제물질의 분리, 동정 및 항동맥경화성 부추제품 개발

부추로부터 LDL산화를 억제하는 물질을 ^{13}C -NMR, ^1H -NMR 등을 이용하여 분리, 동정한 결과 4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid (ferulic acid)로 동정되었다. 부추에서 분리한 ferulic acid는 합성 항산화제인 BHT에 비해 3배 이상 효과가 높은 강력한 항산화제로 밝혀졌다. 항동맥경화성 부추제품은 동결건조 부추분말과 용매추출 산사를 부형제로하여 mixing한 후 capsule에 담아 제조하였다.

2. 제 2 세부 : 부추의 항당뇨효과 탐색 및 항당뇨 성분을 이용한 기능성 부추 제품의 개발

가. 부추의 항당뇨효과 규명

Streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 흰쥐에게 동결건조한 부추분말을 식이의 10% 농도로 14주간 섭취시킨 경우 당화 헤모글로빈 수치를 유의적으로 감소시켰으며, 공복시 글루카곤 농도를 저하시켜, 혈당조절효과가 있음을 나타내었다. 고혈압쥐(SHR)에서도 장기간의 부추 섭취는 식후 혈당치 증가를 완만하게 하였다. 식이 중 부추는 정상쥐에 있어서 식이의 소화관 이동속도를 느리게 하는 경향을 보였다. 부추를 계통분류하여 탄수화물 소화효소 저해활성을 조사한 결과 α -glucosidase 저해활성은 핵산층과 에틸아세테이트층에서 높게 나타났다. 당뇨쥐에게 에틸아세테이트 획분을 8주간 섭취시킨 경우, 당화 헤모글로빈의 수치를 유의적으로 감소시켰으며, 포도당 부하시 혈당치 증가를 완만하게 하는 경향이 있었다. 따라서 부추의 식이섭유와 에틸아세테이트 획분이 항당뇨 효과를 나타내며, 에틸아세테이트 획분은 소장에서 탄수화물 소화효소 활성을 저해하여 혈당조절에 기여하는 것으로 사료된다.

나. 부추의 항산화능 측정

부추를 용매별로 분획하여 항산화 효과를 측정한 결과, 에틸아세테이트층과 디클로로메탄층에서 높은 항산화 효과를 보였다. 당뇨쥐에게 10% 부추 식이를 급여하여 14주간 사육한 후 지질 및 단백질의 산화 정도를 측정한 결과, 피부조직에서 유의적으로 산화를 억제하였다. 간과 심장조직의 SOD와 catalase의 활성은 부추식이군에서 증가하였으며, 특히 SOD활성은 피부에서, catalase활성은 간에서 유의적으로 높았다. 활성산소종인 superoxide anion과 hydroxyl radical의 함량은 부추식이군에서 유의적으로 감소하였다. 부추의 용매분획 중 in vitro에서 가장 큰 항산화효과를 나타내는 디클로로메탄 및 에틸아세테이트층을 식이에 첨가하여 당뇨쥐에게 8주간 제공한 경우, 에틸아세테이트층의 첨가는 당뇨쥐의 간과 피부조직의 지질 산화를 정상 쥐의 지질 산화수준과 비슷한 수준으로 감소시켰으며, 피부의 단백질 산화를 유의적으로 감소시켰다. 에틸아세테이트층의 첨가는 당뇨쥐의 심장에서 노화지표인 lipofuscin의 축적 정도를 감소시켰다.

다. 건강증진 식품소재로서 부추성분별 추출, 가공방법 개발

압착에 의해 분리된 수용성 추출액과 고형분의 중량비는 각각 64.7%와 35.3%였다. 증온(40℃), 감압상태에서 부추 수용성 추출액은 16시간 후 초기중량의 21.7%까지 농축되었다. 부추 수용성 추출액의 동결은 -1.5℃에서 일어난 뒤 온도의 상승을 수반하면서 -1.2℃에서 완전히 동결되었다. 추출된 부추즙의 고형분함량은 1.6%이었으며, 잔류고형물의 수분함량은 60.8%로 나타났다. 잔류 고형분에 남아 있는 부추 수용성 물질을 세척, 여과과정을 거쳐 분리하여 앞에서 얻은 수용성 추출액과 합쳐 농축하였다. 부추 전체를 저온에서 마쇄하여 동결, 건조하여 타원형의 타블렛으로 만들었다. 45%의 유당을 첨가하여 타정된 입자의 크기는 13 x 8 mm로 이용하기에 알맞았다. 분리 후 건조된 불용성섬유질은 분쇄하여 가공식품이나 건강식품의 보조제로 사용할 수 있도록 하였다. 제조한 부추 타블렛은 과산화물 생성을 억제하였다.

3. 활용에 대한 건의

가. 부추에는 LDL 산화억제 물질로 분리, 동정된 ferulic acid 뿐만 아니라, 강력한 항산화제인 kaempferol, quercetin 등이 함유되어 있어, 부추가 당뇨성 동맥경화 예방 및 치유를 위한 medical food로 사용될 가능성을 제시하였다. 연구 결과의 일부는 한국식품영양과학회지에 발표하였으며, 향후 학술지에 추가 발표할 예정이다.

나. 본 연구에서 개발된 항균 및 항동맥경화 부추제품은 식품가공업체가 부추를 이용한 제품을 산업화하는데 기초자료로 활용할 수 있으리라 사료된다. 본연구 결과를 농민, 지역주민들에게 적극 홍보할 계획이다.

다. 당뇨쥐에 있어서 부추 분말 또는 에틸아세테이트 획분의 섭취는 장기간의 혈당 변화를 반영하는 당화 헤모글로빈을 감소시켜, 혈당조절 효과를 나타내었다. 또한 부추의 강력한 항산화효과는 당뇨 합병증 예방에 도움이 되리라 사료된다. 본연구 결과는 한국영양학회지 등의 학술지에 발표할 예정이다.

라. 활용은 부추 전체를 가공하여 이용하는 것과 성분별로 추출, 분리하여 그 특성을 가장 잘 살릴 수 있게 가공하여 활용하는 것으로 생각할 수 있다. 추출, 분리하여 성분별로 가공하는 경우에는 최소한의 가공이 이루어지더라도 유용성분의 손실 및 변화를 피할 수 없는 단점을 고려할 필요가 있다. 부추 분말과 추출물의 항당뇨 효과가 유사하였으므로, 부추를 전체적으로 활용할 수 있도록 동결건조하여 타블렛으로 만들었다. 또한 부추 식이섬유의 기능성을 활용할 수 있는 적용범위를 넓히기 위해 식이섬유를 따로 분리한 후 건조하여 분말화 하였다. 각 성분에 대한 기능적 특성을 학술지에 발표하여 홍보함으로써 기능성 소재로서의 이용범위를 넓히고자 한다.

SUMMARY

I. Project Title

Elucidation of Preventive Effects of Korean *Buchu* on Chronic Degenerative Diseases and Development of Value Added Functional Foods

II. Objectives and Significance

Buchu(Korean leek, *Allium tuberosum* Rottler) is one of *Allium* vegetables which has various biological functions. It is a perennial herb which is cultivated widely in Korea and the leaves are used for foods. It has been traditionally used for the treatment of abdominal pain, diarrhea, snakebite and asthma. Although physiological activities of *Allium* vegetables such as garlic and onion were well known, that of *Buchu* was unknown yet. Various sulfur containing compounds of antibacterial activity were expected to be contained in *Buchu*. Several studies on *Buchu* suggested that it might have antiatherogenic and antioxidative effects, since *Buchu* is abundant in β -carotene, vitamin C, Se, chlorophyll, and phenolic compounds. Since oxidative stress could be responsible for development of diabetic complications, *Buchu* could also have antidiabetic effects. Therefore, the purpose of this study is to elucidate the chemical characteristics of antibacterial compounds and antiatherogenic components of *Buchu*. The antidiabetic and antioxidative effects of *Buchu* were also studied and functional foods were developed.

III. Scope and Contents of the Study

Part 1. Characterization of Active Constituents with Antibacterial and Antiatherogenic Effects from *Buchu* and Development of Functional Products

1. Separation and characterization of antibacterial compounds from *Buchu*
 - 1) Ultrafiltration
 - 2) Liquid-liquid extraction
 - 3) Thin layer chromatography

2. Development of antibacterial products
 - 1) Development of PE film with antibacterial activity
 - 2) Evaluation of intestinal microflora changes by *Buchu* compounds and product development
3. Determination of antiatherogenic effects of *Buchu* extract
 - 1) Measurement of LDL antioxidative activity and antiatherogenic effect of *Buchu* extract *in vitro*
 - 2) Determination of antiatherogenic effect of *Buchu* extract in streptozotocin-induced diabetic rats.
 - (1) LDL antioxidation level
 - (2) Blood and liver lipid levels and fecal cholesterol and bile acid excretion
 - (3) HMG-Co A reductase activity
 - (4) Microstructure of aortic arch
4. Isolation of active principles responsible for LDL antioxidation and development of antiatherogenic products
 - 1) Isolation and Identification of active constituents with LDL antioxidation effects
 - 2) Development of antiatherogenic products

Part 2. Elucidation of Antidiabetic Effects of *Buchu* and Development of Functional Products

1. Determination of antidiabetic effect of *Buchu*
 - 1) Effect of dietary *Buchu* on blood glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats
 - 2) Effect of dietary *Buchu* on upper intestinal transit rate
 - 3) Effect of *Buchu* extract on activity of carbohydrate digesting enzyme and insulin receptors
 - 4) Antidiabetic effects of *Buchu* extract
2. Determination of antioxidative effect of *Buchu*
 - 1) Measurement of antioxidative effect *in vitro*

- 2) Measurement of the contents of antioxidative components of *Buchu*
 - 3) Measurement of the antioxidative effects of powder and extract of *Buchu* in diabetic rats
 - (1) Measurement of the activities of the antioxidation enzyme system
 - (2) Measurement the content of reactive oxygen species
 - (3) Measurement of the relative fluorescence of lipofuscin
3. Development of Functional products
- 1) Product development for whole *Buchu*
 - 2) Product development for extracts and residue
 - 3) Determination of antioxidative effects of the developed product

IV. Results and Proposal for Application

A. Results

1. Characterization of Active Constituents with Antibacterial and Antiatherogenic Effects from *Buchu* and Development of Functional Products

1) Separation and characterization of antibacterial compounds from *Buchu*

Antibacterial compounds from *Buchu* was determined to be of molecular weight less than 5,000 dalton based upon ultrafiltration results. Liquid-liquid fractionation revealed that these compounds were extracted from chloroform fraction with inhibition zone of 22~40mm on the agar diffusion method. TLC with chloroform fraction separated 8 different compounds and the 6th compounds showed the highest antibacterial activity.

2) Development of antibacterial products

Polyethylene film coated with antibacterial compounds from *Buchu* showed substantial amounts of antibacterial activities with all the microorganisms tested. Cooked fish paste wrapped with this film showed viable cell count of 4.5×10^4 CFU/g at 10°C for 7 day storage; in contrast, those wrapped with PE film showed 8.9×10^5 CFU/g.

Buchu extract showed to enhance the growth of *Bifidobacterium adolescentis* and *Clostridium butyricum*; however, the effect was insignificant with *Bifido. infantis*, *Bifido. breve*, and *Bifido. longum*. Slight growth inhibition was observed with *Clostridium perfringens*. *Buchu* product for the improvement of intestinal microflora was prepared by mixing powder of freeze dried Korean leek and spray dried powder with *Buchu* extract at the same weight ratio. The resultant powder was capsuled to give final weight of 500mg. This products showed positive effect on the intestinal microflora of both normal and constipated group. Number of *Bifidobacterium* was increased after consumption of this product.

3) Determination of antiatherogenic effects of *Buchu* extract

The methanol extract of *Buchu* was fractionated sequentially with dichloromethane, ethyl acetate, butanol and water. Among various solvent fractions ethyl acetate fraction and dichloromethane fraction inhibited Cu^{++} -induced LDL oxidation *in vitro*. Furthermore, ethyl acetate fraction possessed HMG-CoA reductase suppressive and platelet aggregation inhibitive, and fibrinolytic activity. To measure antiatherogenic effect *in vivo*, ethyl acetate fraction of *Buchu*(6.4g/kg) were fed to streptozotocin-induced diabetic rats for 8 weeks. Feeding of ethyl acetate fraction lowered atherogenic index. HMG-CoA reductase activity and LDL oxidation significantly. Fecal cholesterol and bile acid excretion of diabetic rats consumed *Buchu* extract were higher than that of diabetic control group.

4) Isolation of active principles responsible for LDL antioxidation and development of antiatherogenic products

Ethyl acetate fraction was purified by repeated Silica gel column chromatography and Sephadex LH-20 column chromatography. The structure of compound were elucidated by spectroscopic methods such as FT-IR, UV, EI-MS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HMBC, HMQC, DEPT, COSY. 4-Hydroxy-3-methoxy cinnamic acid(Ferulic acid) was identified as an active principle with antioxidative activity from ethyl acetate fraction. The LDL antioxidative activity of ferulic acid was 3 times effective than that of BHT.

In large scale extraction of antiatherogenic compounds from *Buchu*, ethanol was most suitable solvent. It was safe and cost-effective method as compared to dichloromethane separation after methanol extraction, which is a lab scale extraction. For anti-clotting product ethanol extract of *Buchu* was mixed with leek residue from ethanol extraction to make 500mg capsule.

2. Elucidation of Antidiabetic Effects of *Buchu* and Development of Functional Products

1) Determination of antidiabetic effect of *Buchu*

Streptozotocin-induced diabetic rats were fed basal and 10% *Buchu* containing diet for 14 weeks. Dietary *Buchu* tended to improve glucose tolerance. Feeding *Buchu* significantly decreased fasting glycated hemoglobin level, an index of long term control of blood glucose, and fasting plasma glucagon level. Dietary *Buchu* tended to decrease upper intestinal transit rate in rats. Ethyl acetate fraction of *Buchu* extract inhibited α -glucosidase activity by 79.4%. Feeding ethyl acetate fraction of *Buchu* extract to diabetic rats significantly decreased glycated hemoglobin. Therefore, it could be concluded that *Buchu* could be an effective agent for controlling hyperglycemia in diabetes and a beneficial agent for the treatment of symptoms and prevention of diabetic complications.

2) Determination of antioxidative effect of *Buchu*

To evaluate the antioxidative effect of *Buchu* *in vitro* system, freeze-dried *Buchu* was extracted with solvents, the ethyl acetate fraction showed the strongest antioxidative activity and followed by dichloromethane fraction. To investigate the antioxidative effects of *Buchu*, 10% *Buchu* diet was fed to diabetic rats for 14 weeks and lipid peroxidation and protein oxidation were measured. Dietary *Buchu* tended to decrease hepatic TBARS contents and significantly decreased lipid peroxidation and protein oxidation in skin. Superoxide dismutase(SOD) and catalase activities in liver and skin of *Buchu* group increased significantly than control group, especially SOD in skin and catalase in liver. Contents of reactive oxygen species, superoxide anion($O_2^{\cdot -}$) and hydroxyl radical($\cdot OH$) in *Buchu* group were significantly lower than those of control

group. Feeding of ethyl acetate fraction of *Buchu* to diabetic rats for 8 weeks also decreased peroxidation of lipid and protein in liver and heart and decreased contents of lipofuscin, an age-related fluorescent pigment, in eye and heart.

3) Development of Functional products

Spray dried whole *Buchu* powder at 15°C was very bulky because of high content of insoluble fibers. Forty five weight fraction of lactose was mixed with the dried powder to make oval type tablet. Soluble extracts of *Buchu* were obtained by extrusion. The soluble extract is very pungent as a consequence of cell rupture and subsequent enzymatic hydrolysis of sulfur containing compounds. Therefore, instantaneous further processing is required to minimize undesirable changes. The extracts were vacuum evaporated at 40°C, and dried. Insoluble fibers isolated from the extrusion process were washed with cold water to remove soluble extracts completely and dried. The dried fiber was processed to make fiber powder. *Buchu* tablet showed antioxidative activity.

B. Use of the research result

1. *Buchu* could prevent diabetic atherosclerosis by modulating hepatic HMG-CoA reductase activity, and by increasing fecal excretion of cholesterol and bile acid. Thus, *Buchu* could be used as medical foods for the prevention of diabetic atherosclerosis.

2. *Buchu* powder and extract showed antioxidative and antidiabetic effects *in vitro* and *in vivo* obviously. Among the fractions by different solvents, ethyl acetate fraction was the most active in their functionality and the phenolics in ethyl acetate fraction seemed to be the main functional components in *Buchu*.

3. Since any processing conditions applied to separate and process specific component in *Buchu* result in the damage to the characteristics of that compound, both extraction and further processing for any particular component and utilization of the whole *Buchu* with minimal processing may be required.

Developed tablet of *Buchu* powder showed antioxidative effect. Prepared powder of *Buchu* fiber could be used as food supplements.

4. We will seek for the appropriate manufacturer to produce the developed products for human consumption.

CONTENTS

Preface	1
Summary(in Korean)	2
Summary	8
Contents	15
Contents(in Korean)	16
Chapter 1. Introduction	17
Section 1. Objectives and Scope of the Project	17
Section 2. Significance of the Study	17
Chapter 2. Characterization of Active Constituents with Antibacterial and Antiatherogenic Effects from <i>Buchu</i> and Development of Functional Products	20
Section 1. Introduction	20
Section 2. Materials and Methods	21
Section 3. Results and Discussion	36
Section 4. Conclusion	82
Chapter 3. Elucidation of Antidiabetic Effects of <i>Buchu</i> and Development of Functional Products	86
Section 1. Introduction	86
Section 2. Materials and Methods	86
Section 3. Results and Discussion	97
Section 4. Conclusion	136

목 차

제출문	1
요약문	2
Summary	8
Contents	15
목차	16
제 1 장 서론	17
제1절 연구개발의 목적과 범위	17
제2절 연구개발의 중요성	17
제 2 장 부추의 항균, 항동맥경화성 물질의 탐색 및 기능성부추제품의 개발 ...	20
제1절 서설	20
제2절 재료 및 방법	21
제3절 결과 및 고찰	36
제4절 결론	82
제 3 장 부추의 항당뇨효과 탐색 및 항당뇨 성분을 이용한 기능성 부추제품의 개발	
.....	86
제1절 서설	86
제2절 재료 및 방법	86
제3절 결과 및 고찰	97
제4절 결론	136

본 문

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

부추의 항균, 항동맥경화 및 항당뇨효과를 규명하고, 활성성분을 이용한 기능성제품을 개발하여, 부추 소비 증가와 농민의 소득증대 및 국민건강 증진에 기여하고자 한다.

1. 부추의 항균, 항동맥경화성 물질의 탐색 및 기능성부추제품의 개발

- 가. 부추의 항균활성물질의 분리 및 화학적 특성 규명
- 나. 항균성분을 활용한 폴리에틸렌필름 개발
- 다. 부추의 장내균총 개선효과 탐색 및 제품 개발
- 라. 부추의 LDL 산화 억제능 및 항동맥경화 효과 규명
- 마. 부추로부터 LDL 산화억제물질의 분리 및 동정
- 바. 항동맥경화성 부추제품 개발

2. 부추의 항당뇨효과 탐색 및 항당뇨 성분을 이용한 기능성 부추제품의 개발

- 가. 동물모델계에 있어서 부추의 항당뇨 효과 규명
- 나. 부추추출물의 in vitro 항산화능 조사
- 다. 당뇨쥐에 있어서 부추식이 및 용매분획물의 산화 억제 효과 규명
- 라. 기능성 부추제품 개발

제 2 절 연구개발의 중요성

부추(*Allium tuberosum* Rottler)는 카로틴, 비타민 B₂, 비타민 C, 칼슘, 철 등의 영양소를 많이 함유하고 있는 녹색 채소로서, 마늘, 양파와 같이 함황식품 중의 하나이다. 예로부터 우리나라 사람들은 마늘, 양파, 부추를 포함한 함황식품을 많이

섭취하여 왔고, 이들 함황식품들의 생리활성이 차츰 규명되고 있으나 부추에 관해서는 거의 연구가 이루어져 있지 않았다. 또한 부추는 생리활성을 나타낼 가능성이 매우 높은 자원임에도 불구하고 이를 이용한 제품개발이 거의 이루어지지 않았다. 부추에 다량 함유되어 있는 함황성분은 항균작용을 나타낼 것으로 기대되며, 부추의 항균성은 부추가 조미소재로서 사용될 수 있음을 시사하고, 다양한 식중독을 방지할 수 있는 식품재료로서 활용가능성을 보여준다. 또한 부추는 강장효과 등 약리효과가 인정되고 있어 장내균총 개선효과가 기대되나 이에 관한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본연구에서는 부추의 항균활성물질을 분리하고 그 화학적 특성을 규명하여 항균활성 부추제품을 개발하고, 부추의 장내균총 개선효과를 탐색하여 장내균총개선용 제품을 개발하고자 하였다.

부추는 황화합물 뿐만 아니라 항산화물질, 식이섬유들이 다량 함유되어 여러 생리적 기능을 나타낼 것으로 기대된다. 또한 부추는 건위, 강장 식품으로 한방에서 알려져 있다. 현재 우리나라는 고도의 경제성장, 인구의 고령화 및 산업화 추세로 인해 심혈관질환, 당뇨병 등의 성인병이 증가하고 있는 추세이며 이에 비례하여 국민들의 건강에 대한 관심이 날로 증가하고 있다. 심혈관질환은 우리국민 사망요인 중 1위를 차지하고 있어 국민 건강을 위협하는 심각한 성인병으로, 우리 식생활이 서구화되면서 고지방, 고단백, 저섬유 식이 패턴이 그 발병률을 더욱 증가시키고 있는 추세이다. 부추는 항혈전 응집효과가 있다고 알려져 있으며, 부추는 건조 중량당 35% 정도의 식이섬유를 함유하고 있어, 혈중 콜레스테롤 농도 저하효과도 기대할 수 있다. 동맥의 경화현상은 혈액에 존재하는 LDL의 apo단백이 산화되어 LDL의 수용체에 의해 제거되지 않으면 발생하게 된다. 그러므로 항산화제의 적절한 공급으로 혈장 LDL의 산화를 방지하는 것은 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 부추 추출물의 항동맥경화효과를 탐색하고, LDL의 산화 억제물질을 분리, 동정하여, 부추를 활용한 항동맥경화 제품을 개발하고자 하였다.

당뇨병은 국민 사망요인 중 6위를 차지하고 있으며, 그 유병률이 급속히 증가하는 경향을 보이고 있다. 이는 급속한 경제발전예 수반되는 환경적 요인이 크게 작용했을 것이라고 생각되며 앞으로는 당뇨병이 국가적으로 심각한 건강장애 질환이 될 것으로 예상된다. 정상치에 가까운 혈당의 유지는 당뇨 치료법에 있어서 가장 중요한 목표 중의 하나이다. 부추는 식이섬유질을 다량 함유하고 있어 당뇨치료에 크게 도움이 될 것으로 기대된다. 한편 산화적 스트레스는 당뇨병 발병과 관련이 깊고, 당뇨병합병증의 주요 요인이 되고 있다. 당뇨병에서는 고혈당으로 자유라디칼의 생산이 증가되고, 반응성이 높은 이들 물질에 의해 혈관내피세포가 손상되고 만성합병증이

발생된다. 부추는 항산화능을 포함한 생리활성이 클 것으로 기대되어, 본연구에서 부추의 항당뇨효과를 규명하고, 그 활성성분을 활용하여 기능성 부추제품을 개발하고자 하였다.

제 2 장 부추의 항균, 항동맥경화성 물질의 탐색 및 기능성부추제품의 개발

제 1 절 서설

부추(*Allium tuberosum*, Rottler)는 우리나라 산야에서 자생하며 식물분류학상 *Allium*속에 속하며, 독특한 맛과 향기가 있어서 애용해 왔을 뿐 아니라, 예로부터 한방에서는 강장제, 건위제, 해독제, 화상 치료제로 쓰였고, 그 외 해독, 천식에 효과가 있으며, 부추는 식이섬유와 엽록소가 풍부하고 항혈전응집효과가 있고, 향미성분인 allylsulfide는 마늘과 같이 비타민 B와 결합체를 이루어 흡수를 돕고 소화력 증진, 살균작용 등이 있으며 생선이나 육류의 냄새를 제거하는 효력이 알려져 있다.

부추는 우리나라 사람들이 예로부터 많이 섭취하고 있는 채소류이며, 마늘, 양파와 같이 함황식품 중의 하나이다. 함황식품인 마늘과 양파의 생리활성은 차츰 규명되고 있으나 부추에 관한 연구는 매우 미비하다. 부추에 다량 함유되어 있는 함황성분은 다른 식품과 유사하게 항균작용을 나타낼 것으로 기대된다. 따라서 부추의 항균활성 물질을 분리하고 그 화학적 특성을 규명하여 항균활성 부추제품을 새롭게 개발하고자 하였으며, 또한 부추의 장내균총 개선효과를 탐색하여 이를 제품에 응용하여 장내균총개선용 제품을 개발하고자 한다.

최근 생활 방식과 식생활이 서구화되면서 동물성 식품의 소비가 증가하는 추세며, 이에 따른 고지방, 고단백, 저섬유식이 패턴이 총지방, 포화지방 및 콜레스테롤 섭취를 증가시켜 순환기계질환의 발병률을 증가시키고 있다. 순환기계질환은 동맥경화와 관련이 있으며 혈중 콜레스테롤의 증가 특히, LDL-콜레스테롤의 증가는 동맥경화와 심근경색 발생의 주요 위험인자이다. 따라서 본 연구에서는 다양한 기능성 물질을 함유하고 있는 부추를 용매별로 계통분획하여 각 용매 추출물별 LDL 산화억제 효과 및 혈전용해능, 혈소판응집억제능, HMG-CoA reductase 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 부추를 용매별로 계통분획하여 LDL 산화억제 효과를 측정된 결과 가장 효과가 높았던 ethyl acetate층과 dichloromethane층을 동결건조한 후 streptozotocin을 투여하여 당뇨를 유발시킨 쥐에 실험식으로 첨가하고, 부추 추출물의 장기간 섭취가 당뇨쥐의 LDL 산화 및 적혈구 항산화 효소계, 콜레스테롤 대사에 미치는 영향을 조사하였으며, LDL 산화억제능을 갖는 물질을 분리, 동정하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 부추의 항균활성물질의 분리 및 화학적 특성 규명

가. Ultrafiltration

분자량 5,000dalton을 나눌 수 있는 한외여과막(Centrisart 13229, Sartorius)을 이용하여 항균물질 분리 실험을 하였으며, 생부추를 원심분리(10,000xg, 30min)하여, glass filter(GF/C)로 여과한 후, 한외여과막이 부착되어 있는 centrisart를 swing형 원심분리기에서 2300xg, 60분 원심분리하여 여과된 액과 여과되지 않은 부분에 상청액에 해당하는 증류수를 가하여 항균활성을 측정하였다.

나. Liquid-liquid extraction

수세한 부추 1kg을 expeller를 이용하여 즙을 내고, methanol로 4시간 추출하고, 6시간 정치시킨 후, 상청액은 그대로 사용하였고 침전액은 원심분리 후 상청액을 받아 앞의 상청액과 함께 filter paper(Whatman No. 2)로 여과하였다. 여과액을 rotary vacuum evaporator로 methanol이 다 증발될 때까지 농축시킨 후, 증류수를 가하여 2시간 섞어주었고, 여기에 hexane 500ml를 가하여 분액여두에 넣어 진탕기로 5분간 진탕한 후 hexane층과 물층으로 분리하여 이 과정을 3회 반복하였다. Hexane 분획을 모아 다시 rotary vacuum evaporator로 농축시켰다. 그 이후 수용액 층을 chloroform 500ml를 가하여, hexane과 같은 방법으로 3회 연속 분리 후 농축. 이후 과정은 용매는 용매의 극성이 낮아지는 순으로 Fig. 1와 같이 분획하였다. 농축이 완료된 후, 건조물의 무게를 측정하고 건조물 무게의 10배에 해당하는 추출용매로 용해시켜 agar diffusion method로 항균활성 실험을 하였다. 이 때 paper disk에 시료 주입 후, hood에서 모든 유기용매를 날려버려 유기용매에 의한 항균작용의 가능성을 배제시키고, 건조 후 생리식염수를 넣어 항균실험을 하였다.

다. Thin layer chromatography

Liquid-liquid extraction에서 항균활성이 있는 부분을 TLC plate (Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄)에 spotting 후, chloroform과 methanol, 10 : 1(v/v) 용매로 전개하였다. 그 후, TLC에 나타난 영역을 각각 취하여 chloroform과 methanol, 1 : 1(v/v) 용매에 녹여 silica gel을 여과지로 제거 후, 남은 시료를 농축하고 용매제거를 위해 paper disk에 주입 후, 건조하여 항균활성을 측정하였다.

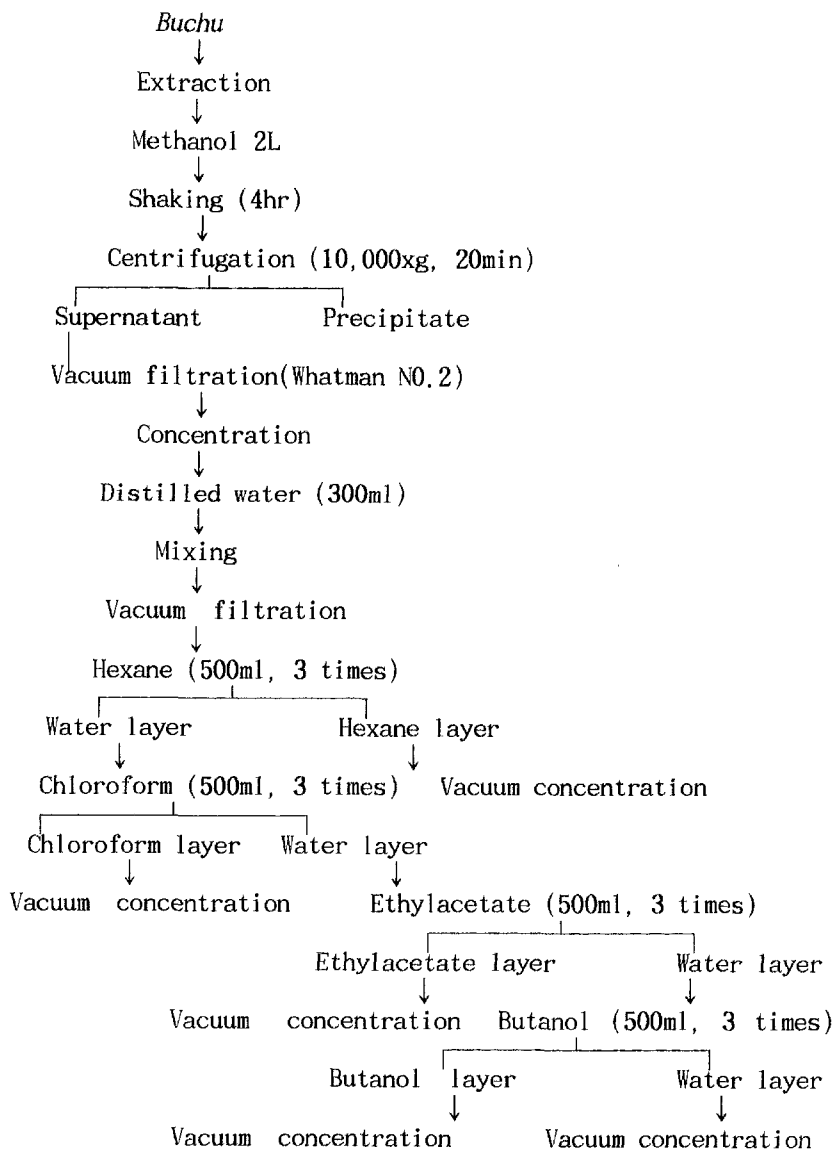


Fig 1. Liquid-liquid extraction of Korean *Buchu*.

2. 항균성 부추제품 개발

가. 부추의 항균성분을 활용한 폴리에틸렌필름의 개발

1) 사용균주

미생물 생육곡선과 항균력 시험에 사용된 균주(Table 1)는 KCTC에서 분양 받은 것으로 각각의 적정온도에서 액체배양을 한 뒤 계대배양 하여 냉장 보관하여 사용하였다.

2) 항균력 시험

항균력 시험은 agar diffusion test의 방법으로 행하였다. 일정농도로 계산된 균액을 평판배지에 swab하고 필름을 직경 8mm로 잘라 평판배지에 올려 37℃에서 24시간 배양하면서 필름 주위에 생성되는 inhibition zone의 크기로 항균활성 정도를 판별하였다.

3) 필름제조

원예산물 포장에 가장 많이 이용되는 저밀도 폴리에틸렌(low density polyethylene, LDPE) 필름을 이용하여 4월 생산 부추 추출물로 이루어진 항균물질을 코팅물에 의하여 코팅하였다. 두께 35 μ m의 LDPE 필름 위에 동결건조한 부추를 마쇄한 후 50% ethanol로 추출한 원액과 냄새와 색소제거를 위하여 활성탄으로 처리한 시료를 25 Brix로 조정하여 진공농축 한 후 간격을 5 μ m로 조절한 두 개의 코팅물 사이를 통과시키면서 코팅하였다. 코팅된 필름은 무균 공기로 2일간 건조하였다. 활성탄 처리는 부추출액 1L당 20g을 가하여 1시간 동안 교반후 Whatman No4로 여과하였다. 항균필름을 이용하여 어묵을 포장하였을 때 유통기간 연장효과를 알아보기 위하여 시중 판매되고 있는 어묵을 구입하여 초기균수를 측정하고, 이를 항균필름으로 밀착포장하였다. 포장된 어묵을 10℃에 저장하면서 24시간 단위로 생균수 측정과 관능검사를 행하였다.

4) 포장 어묵의 저장온도설정

어묵의 제품 유형을 보면 실온유통제품과 냉장유통제품으로 나눌 수 있다. 실온유통제품의 경우 유통온도는 1~35℃이며, 냉장유통제품의 경우는 0~10℃이다. 이번 실험에서는 냉장온도인 10℃와 비교온도로 20℃를 설정하였다.

5) 포장 어묵의 생균수 시험

포장된 어묵을 무균적으로 10g 취하여 멸균 생리식염수 90ml에 넣고 homogenizer로 균질화하였다. 이 균질액을 생리식염수로 단계적으로 취하여 주입평판법으로 37℃에서 24시간 배양한 후 colony를 계수하였다.

6) 관능검사

관능검사는 10℃에서 보관한 각각의 sample을 보관 4일째 실시하였다. 평가 항목은 외관, 좋지 않은 냄새, 전체적인 맛 등을 중심으로 평가하였다. 관능검사는 식품영양학을 전공한 panel 10명을 대상으로 실시하였으며, 이상적인 특성을 최고점으로 선정하여 평가하였다.

Table 1. List of pathogenic bacteria and intestinal bacteria.

	Strains	Medium	Incubation temperature
Gram Positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC1621	Nutrient agar	37℃
	<i>Bacillus cereus</i> KCTC1012	Nutrient agar	35℃
Gram Negative bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1022	Nutrient agar	30℃
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Nutrient agar	37℃
Intestinal bacteria	<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC2541	Nutrient agar	37℃
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC1645	Nutrient agar	25℃
Intestinal bacteria	<i>Bifidobacterium infantis</i> KCTC3127	EG broth	37℃
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> KCTC3216	EG broth	37℃
	<i>Clostridium butyricum</i> KCTC1786	EG broth	37℃
	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC13124	EG broth	37℃

나. 부추의 장내균총 개선효과 탐색 및 제품개발

1) 장내균총 개선효과

시험 배지 제조시 배지를 혐기적인 상태로 만들기 위해 끓인 EG 액체배지 20ml를 serum vial에 넣고, butyl고무마개와 알루미늄 뚜껑을 이용하여 crimper로 봉합하였다. 긴 바늘을 배지에 담기게 꽂고 다른 짧은바늘은 vial의 head space에 위치하도록 꽂은 다음 30분간 CO₂ 가스로 치환하였다. 121℃, 15분간 고압증기멸균하여 배지로 사용하였다(Fig 2). 장내균총 개선효과는 각각의 배지에 부추 착즙액을 2%씩 첨가하여 미생물 생육곡선을 이용하여 측정하였다. 시험균주는 Table 1과 같다.

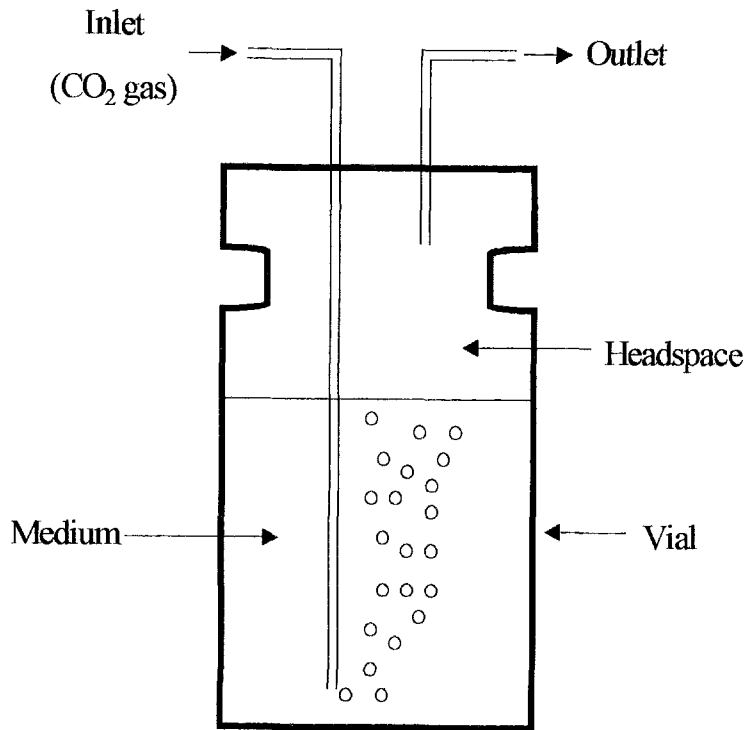


Fig 2. Substitution of CO₂ gas.

2) 장내균총 개선용 소재 제조

장내균총 개선용 소재는 4월 생산 부추를 동결건조한 분말과 착즙한 후 spray dry한 분말을 사용하였다.

3) 장내균총 개선용 제품개발

장내균총 개선용 소재를 사용하여 캡슐화를 하였다. 이렇게 생산된 제품을 정상인과 변비환자를 대상으로 *Bifidobacterium*속 및 *Clostridium*속의 변화를 측정하였다.

4) 분변으로부터 *Bifidobacterium* 및 *Clostridium* 분리

변비환자 및 정상인으로부터 대변을 받는 즉시 0℃의 혐기성 희석용액에 넣어 실험실로 옮긴 뒤 십진법으로 순차적 희석을 하였다. 조사된 대상은 주로 부산 거주인들이며, 항생제를 복용하는 사람과 설사환자는 제외시켰다. 변비 증상이 없는 정상적인 사람과 변비 증상을 보이는 환자군을 비교하여 실험을 하였고, 부추 캡슐을 7일간 하루 1500mg씩(3 캡슐) 복용시켰다. *Bifidobacterium*속의 선택배지로는 TP배지를 이용하였고(Table 2), *Clostridium*속의 선택배지는 PNC배지를 이용하였다(Table 3). 십진희석을 한 뒤 분산평판법으로 계수를 하였고, 37℃에서 24시간 BBL GasPak pouch를 이용하여 혐기적 조건에서 배양하였다.

Table 2. Composition of TP medium.

Component	Amount
Trypticase peptone	10.0g
Proteose peptone No.3	5.0g
Ammonium sulfate	3.0g
Potassium phosphate, monobasic	2.0g
Potassium phosphate, dibasic	1.0g
L-Cysteine · HCl	0.5g
Magnesium sulfate(7H ₂ O)	0.2g
Filter-sterilized 20% isomaltooligosaccharide	50ml
Filter-sterilized 30% sodium propionate pH7.0	50ml(pH7.0)/liter

Table 3. Composition of PNC medium.

Component	Amount
EG agar medium	40.7g
Tween 80	0.5g
Sodium propionate	15g
Novobiocin(1% soln)	0.5ml
Colimycin(1% soln)	1ml(pH7.6)/liter

3. 부추 추출물의 LDL산화 억제능 및 항동맥경화 효과 규명

가. In vitro에서 부추 추출물의 LDL산화 억제능, 항동맥경화 효과 조사

1) 실험재료

부추는 김해 대동에서 생산되는 부추를 대동 농협으로부터 구입하여 흐르는 물에 3회 행군 다음 물기를 제거하고 동결건조하여 마쇄한 후 실험용 시료로 사용하였다.

2) 부추 추출물의 제조

부추 용매별 추출물은 동결 건조시킨 부추 분말 15kg을 hexane으로(W:V/1:3) 3회 반복 추출하여 탈지한 다음 탈지된 부추 시료 잔사물을 jar에 담아 시료의 10배정도의 methanol에 2회에 걸쳐 냉침 시켰다. 이 후 마지막으로 80℃ 3시간 동안 환류냉각하여 얻은 것을 감압 농축하여 methnaol 추출물을 얻었다. 이렇게 해서 얻어진 methanol 추출물을 hexane, dichloromethane, ethyl acetate, Butanol, H₂O순으로 극성이 낮은 용매부터 극성이 높은 용매 순으로 순차적으로 각각 용매분획 하였다. 먼저 이 methanol 분획물에 dichloromethane, methanol, 물을 10:1:9의 비율로 첨가하여 용해한 다음 이를 분획여두에서 격렬히 흔들어 dichloromethane층에 용해되는 성분만을 분리해서 감압여과 하였다. 남은 수층에 ethyl acetate를 같은 비율로 첨가한 후 위와 같은 방법으로 ethyl acetate층을 분리해 냈다. 남은 수층에 Butanol을 첨가하여 반복 추출해서 Butanol층을 얻었고, 마지막으로 수층을 얻었다.

3) 혈전 용해능 측정

혈전용해능은 시험관법으로 측정하였다. sodium borate 완충용액에 fibrinogen (from bovine plasma, Sigma, USA)을 0.006 g/ml 되게 하여 37℃에서 완전히 가용화

시켜 시험관에 분주한 후, 200 unit의 thrombin (from bovine plasma, 10,000 units, Sigma, USA)을 점적하여 균일하게 섞어 주었다. 시험관을 실온에서 30분간 방치한 후, fibrin gel 배지 위로 시료를 점적하여 37°C에서 5시간 배양한다. 활성 측정은 fibrin이 분해된 액상을 여과지로 흡수시켜 그 무게를 정량화하고 표준곡선은 plasmin (from bovine plasma, Sigma, USA)을 이용하여 작성하였다.

4) LDL 산화 억제능 측정

LDL 산화 정도를 conjugated dienes과 TBARS (Thiobarbituric acid Reactive Substances)생성 정도로써 평가하였다.

가) Conjugated dienes 생성 억제정도 측정

인체 혈장에서 분리된 LDL을 10 mM phosphate buffer saline(pH 7.4)에서 12시간씩 2회 연속 투석하여 사용하였다. 즉, 기질인 LDL은 100 ug protein/ml이 되게 10 mM PBS(Phosphate Buffer Saline, pH 7.4)로 희석한 후, CuSO₄를 최종농도 5uM되게 첨가하여 37°C에서 6시간 동안 산화시켰다. 이때 부추 용매 획분을 30 μl씩 첨가하여 1시간 간격으로 234 nm에서 흡광도를 재어 시료 용매 획분을 첨가하지 않은 대조군과 conjugated dienes생성 정도를 비교측정 하였다.

나) TBARS 생성 억제정도 측정

TBARS 생성 정도는 conjugated dienes 측정시와 동일한 방법으로 기질과 시료를 반응시켜, 37°C에서 산화시켰다. 시간대별로 25% TCA(Trichloroacetic acid) 1 ml과 1% TBA 1 ml을 첨가하여 95°C에서 45분간 가열하였다. 4,000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 TMP (1,1,3,3,-tetramethoxypropane ; malonaldehyde bis) 용액을 사용하였다.

5) 혈소판 응집 억제능 측정

PRP(Platelet rich plasma) 1 ml에 들어있는 혈소판수는 660 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였고 혈소판 수를 1×10^8 platelet/ml가 되도록 조종하여 실험에 사용하였다. 혈소판 응집정도는 Chronolog Lumi-aggregometer를 이용하여 즉시 측정하였다. 500 μl의 PRP를 37°C로 5분간 preincubation한 후 100 μM의 collagen reagent (Sigma, diagnostic No.885-1)를 첨가하고 여기에 부추 용매 추출물(20 μg/ml)을 넣어 8분간 반응시킨 후 plateau를 이를 때까지 측정하였다. Reference로는 platelet poor plasma(PPP)를 이용하였다.

6) HMG-CoA reductase 활성 저해인자의 탐색

간조직에서 microsomes의 제조, microsomalHMG-CoA reductase의 가용화, spectrophotometer를 이용하여 HMG-CoA reductase의 활성을 측정하였다.

나. 당뇨쥐의 지질 대사와 혈관구조에 미치는 영향

1) 실험 계획 및 실험 동물의 사육

실험동물은 평균체중 320g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 1주일간 적응시킨 후 체중에 따라 난괴법으로 정상군, 당뇨대조군, 그리고 부추당뇨군으로 나누어 당뇨대조군과 부추당뇨군에 당뇨를 유발시켰다. 당뇨군의 동물에 streptozotocin (Sigma S-0130, 50 mg/kg BW)을 대퇴부 근육에 1회 주사하였다. Streptozotocin은 0.1 M citrate buffer(pH 4.5)에 용해시켜 사용하였고 정상군은 동량의 citric acid 용액을 투여하였다. Streptozotocin 투여 2일 후 공복상태에서 꼬리 정맥으로부터 채혈하여 공복시 혈당 수준이 200 mg/dl 이상일 때 당뇨병이 유발된 것으로 간주하였다. 해당 식이와 물은 자유급식법으로 8주간 제공하였다. 사육실의 온도는 20~25℃로 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등을 하였다. 흰쥐의 식이 섭취량은 격일로 측정하였고, 체중은 일주일마다 측정하였다.

2) 식이의 조성

각 군의 식이 조성은 Table 4와 같다. 부추 추출물식은 부추 용매별 휘분 중 ethyl acetate층을 건조시킨 후 옥수수 기름에 녹여 식이에 혼합하였다. 부추 추출물은 동결건조 부추의 10%에 해당하는 무게로 환산하여 식이 중 공급하였다 (6.4g/kg). 흰쥐의 체내 지방합성 반응을 촉진시키기 위해 사료 100g에 옥수수 기름 10g, 콜레스테롤을 각각 0.5g씩 식이에 첨가하였다.

Table 4. Composition of experimental diets(%).

Ingredients	Basal diet	<i>Buchu</i> extract diet
Casein	20	20
Sucrose	9.5	9.5
Corn starch	50	50
Corn oil	10	10
Cellulose	5	4.4
AIN-76 mineral mixture	3.5	3.5
AIN-76 vitamin mixture	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2
D, L-methionine	0.3	0.3
Cholesterol	0.5	0.5
<i>Buchu</i> extract		0.6

3) 혈액, 장기 및 분변 수집

8주간의 사육기간 후, 동물을 14시간 이상 절식시키고, EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)를 넣은 주사기로 심장에서 채혈하였다. 혈액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 혈장을 제거한 침전물은 0.9% 생리식염수로 세척한 후 원심분리하여 상등액을 제거한 나머지 침전물을 적혈구 시료로 사용하였다. 각 장기는 채혈 즉시 적출하여 -70℃에서 보관하였다. 분변은 실험식이 급여 7주째에 72시간 동안 수집하여 80℃ 건조기에서 가열 건조하였다.

4) 혈장과 지단백 획득의 지질 및 효소활성 측정

혈장으로부터 ultracentrifugation에 의한 sequential flotation method로 VLDL, LDL, HDL의 획득을 얻었다. 혈장과 지단백 획득의 콜레스테롤 함량 및 중성지방 함량은 효소법으로 측정하였다. 혈장의 AST activity 및 ALT activity는 효소법에 의해 측정하였다.

5) 혈장과 적혈구의 LDL 항산화능 측정

혈장과 LDL fraction에서의 TBARS 함량의 측정을 하였다. 혈장에 TBARS solution을 가하여 95°C에서 20분간 가열한 후, 원심분리하고, 그 상층액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 standard로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP)을 사용하였으며, 측정된 값을 표준곡선에 대입시켜 malondialdehyde (MDA)의 양으로 환산하였다. 적혈구에서의 산화정도는 conjugated diene 생성량으로서 산화정도를 측정하였다. Buffer로 희석한 적혈구에 CuSO_4 용액을 첨가한 후, 37°C에서 6시간동안 incubation하면서 234 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

6) 항산화효소계 활성 측정

적혈구를 phosphate-KCN buffer로 희석하여 용혈시킨 후, 원심분리하여 상등액을 시료로 하여 항산화효소계 활성을 측정하였다. Glutathione peroxidase(GSH-px) 측정방법은 Lawrence와 Burk의 방법으로 측정하였다. 적혈구 속의 SOD활성 측정은 Cu, Zn-SOD를 total SOD값으로 하여 측정하였다. 적혈구를 buffer로 10배 희석한 시료를 이용하여 Oyanagui의 방법으로 측정하였고, Catalase의 측정은 Aebi에 의한 방법으로 측정하였다. 글루타티온 함량의 분석은 Teitz에 의한 방법으로 측정하였다.

7) 간의 지질 조성 및 콜레스테롤 합성 율속 효소 활성 측정

간으로부터 Folch 등의 방법을 수정하여 지질을 추출하고, 그 함량은 비중법으로 계산하였다. 간지질 추출액의 총 콜레스테롤 함량 및 중성지방함량을 효소법으로 측정하였다. 간에서 콜레스테롤 합성 율속 효소 활성을 측정하였다.

8) 분변중 지질 및 담즙산 정량, 총지

분말화한 분변으로부터 modified Soxhlet법을 이용하여 지질을 추출한 후, 총지방 함량은 비중법으로 계산하였고, 중성지방과 콜레스테롤 함량을 측정하였다. 분변으로 배설되는 담즙산의 함량은 Crowell 등의 방법에 따라 측정하였다.

9) SEM 및 TEM에 의한 조직의 미세구조 관찰

대동맥 조직을 1 mm²로 절단한 뒤, 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2)로 희석한 5% glutaraldehyde로 4°C에서 12시간 1차 고정시킨 후, buffer와 증류수로 수세하고 다시 1% OsO_4 로 2시간 동안 후고정시키고 이것을 다시 증류수로 세척한 뒤, 30%, 60%, 90%, 100% acetone으로 단계적으로 탈수한 시료를 critical point dryer (Hitachi,

HCP-2)를 이용하여 건조하였다. 건조된 조직은 ion sputter (Hitachi, E-1030)를 이용하여 10 nm로 gold coating하여 10 kV에서 scanning electron microscope (Hitachi, S-4200)로 미세구조를 관찰하였다. 간 조직은 4% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde 고정용액 (pH 7.4, phosphate buffer)에서 12시간 이상 고정하고 1% osmium tetroxide 용액에서 다시 한번 고정한다. 후 고정후 TEM시료는 60 nm의 두께로 자르고 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 75 KV에서 TEM (Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

4. LDL 산화억제물질의 분리, 동정 및 항동맥경화성 부추제품개발

가. ethyl acetate 획분으로부터 LDL 산화억제물질의 분리 및 동정
계통 분획 중 LDL 산화억제효과가 탁월한 ethyl acetate 획분으로부터 용매를 제거하고 정제용 시료로 만들어 Silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, Thin Layer Chromatography로 분리, 정제하였다(Fig. 3).

1) Silica gel column chromatography에 의한 활성 성분의 분리

항산화성이 높았던 ethyl acetate 획분중 동맥경화 예방물질을 분리하기 위해 1차적으로 Silica gel column chromatography를 하였다. 본 실험에서는 흡착제로 silica gel(Kiesel gel Art. 7734, Merck)를 사용하였다. Silica gel을 dichloromethane : methanol이 15:1의 비율로 된 용매에 충분히 현탁시킨 후 고정된 column에 충전하여 같은 용매로 씻어 내렸다.

Ethyl acetate 획분 34 g을 methanol 용액에 녹인 후 1.5배의 silica gel에 고루 흡착시킨 후 실온에서 건조시켜 분쇄하고 분말화 하였다.

Silica gel에 흡착된 이동상 시료를 미리 제조한 고정상 column위에 조심스럽게 가하였다. 활성성분을 분리하기 위하여 dichloromethane와 methanol을 15:1의 비율로 혼합해 용출을 시작하여 tube당 50 ml씩 분획하였다. 용출되는 획분의 색도가 없어지기 시작하면 용매에 methanol의 양을 점차 늘려 주면서(15:1, 10:1, 5:1, 2:1) 계속 활성성분을 용출하고 마지막으로 methanol만으로 용출하였다. 1차 silica gel column chromatography하여 이들을 TLC상에 전개시켜 Rf치가 유사한 획분끼리 묶어 이를 용출한 용매에 녹인 다음 감압 여과하여 36개의 fraction을 얻었다.

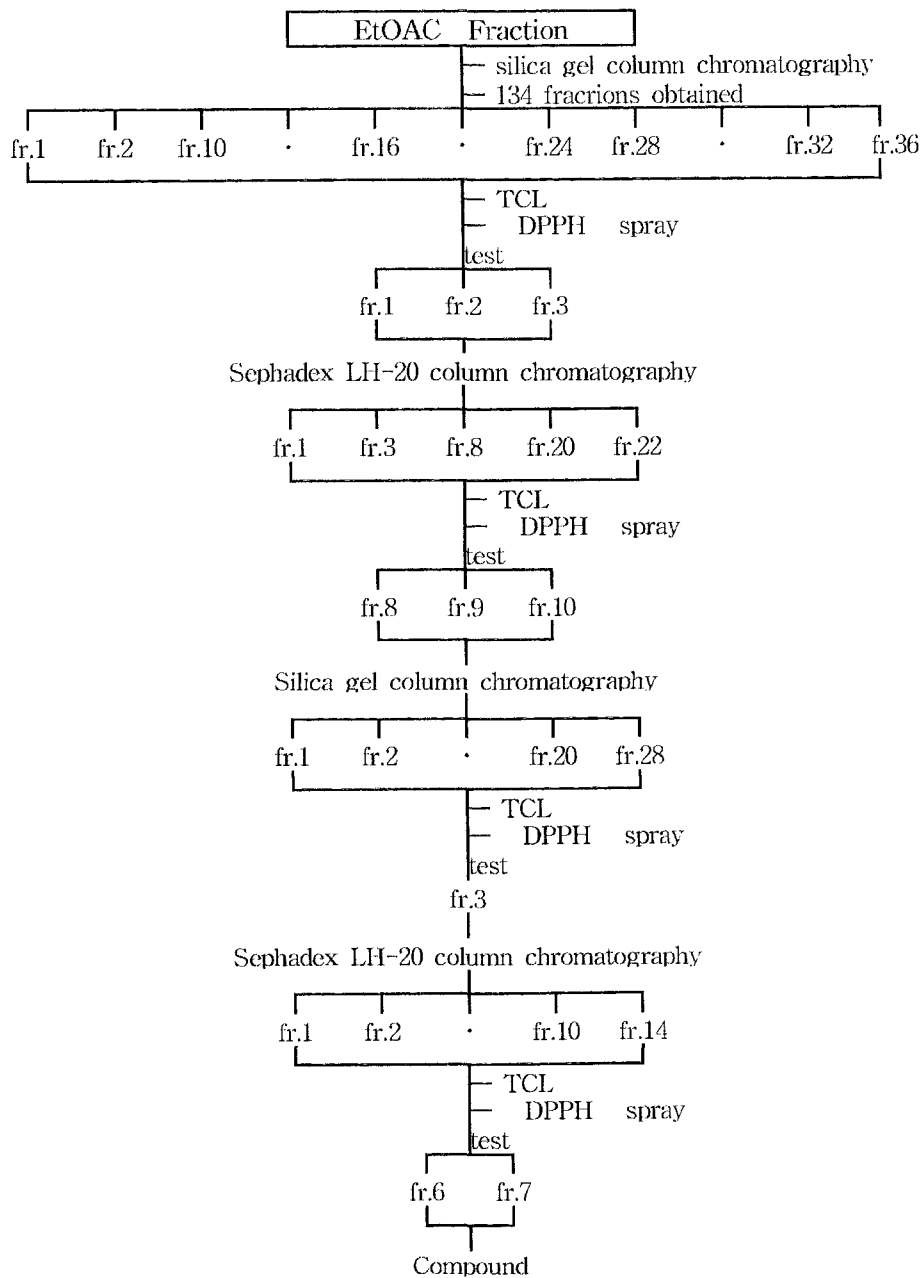


Fig 3. Schematic diagram of isolating compound from *Buchu*.

2) Thin Layer Chromatography를 이용한 활성물질의 확인

정제 과정에서 얻어진 획분의 활성 성분을 확인하기 위하여 TLC를 수행하였다. Precoating 된 TLC용 silica gel plate(Kiesel gel 60 F₂₅₄)에 column chromatography에서 분리된 획분의 농축액을 점적하고 전개용매로 전개시켰다. 이때 사용된 전개 용매는 dichloromethane-methanol (15 : 1), dichloromethane-methanol(10 : 1), dichloromethane-methanol(5 : 1) 등을 사용하였으며 활성성분의 위치확인에는 UV 254 nm에서 실시하였고, R_f치를 구하기 위하여 50% H₂SO₄를 뿌려 탄화시켰다.

3) Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 정제

Silica gel column chromatography중 TLC상에서 강한 활성을 보이고 R_f치가 같은 1,2,3번 획분을 모아서 용매에 녹인 후 Sephadex LH-20을 이용한 column chromatography로 계속 정제하였다. 상업적으로 가능한 Sephadex LH-20(Sigma, U.S.A.)에 활성획분을 올려서 methanol용액으로 용출시켜 tube당 50 ml씩 분획하였고, 얻어진 22개의 획분을 TLC plate상에서 점적하여 활성을 확인하였다. 활성 성분 중 R_f치가 높고, DPPH spray 결과 효과가 컸던 8,9,10번을 모아 다시 silica gel column chromatography를 실시하여 단일 spot로 나타날 때까지 정제하였다.

나. EI-MS 등에 의한 동정

분리 정제된 compound의 분자량 및 분자구조를 측정하기 위하여, 전자 충격에 의한 질량 분석을 실시하였다. 본 실험에서 사용된 Electron impact-mass spectrometry(EI-MS)는 JEOL사의 SX-102A를 사용하였고, sample을 methanol에 용해하여 측정하였다.

실험에 사용된 ¹H-NMR은 JEOL사의 FT-NMR로 DMSO-*d*₆를 용매로 사용하였으며, 내부 표준물질로는 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였다. 또 ¹³C-NMR은 JEOL사의 FT-NMR로 DMSO-*d*₆를 용매로 사용하였으며, 내부 표준물질로는 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였다. DEPT spectrum(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)는 JEOL사 것으로 DMSO-*d*₆를 용매로 사용하였다. ¹H-¹H COSY(¹H-¹H Correlation Spectroscopy) JEOL사 것으로 DMSO-*d*₆를 용매로 사용하였다. HMQC spectrum(¹H-Detected Heteronuclear Multiple Quantum Connectivity)은 어느 proton이 어느 ¹³C 핵에 결합되어 있는지를 파악할 목적으로 사용되었으며, JEOL사 제품을 사용하였다. HMBC spectrum(¹H-Detected Heteronuclear Multiple Bond connectivity)은 화학결합이 2개 이상 떨어져 있는 proton과 ¹³C 핵 사이에서

spin-spin상호작용의 연관관계를 검출하기 위한 long-range C-H COSY의 일종으로써, JEOL사 것으로 DMSO- d_6 를 용매로 사용하여 측정하였다. 분리 정제된 compound의 치환기 흡수대를 측정하기 위하여 IR을 실시하였다. 사용된 기기는 Bruker사의 FT/IR, model IFS 66/S를 이용하여 기능기의 흡수대를 측정하였다. 또 시료를 methanol에 용해시켜 UV-vis spectrometer (Shimadzu model 2100, Japan)를 사용하여 측정하였다.

다. 활성물질의 LDL 산화 억제능 측정

분리된 활성물질의 LDL oxidative modification에 미치는 영향을 알아보기 위해, LDL 산화 정도를 TBARS (Thiobarbituric acid Reactive Substances) 생성 정도로써 평가하였다.

1) TBARS 생성 억제정도 측정

혈장에서 분리한 LDL에 분리된 compound를 농도별로 첨가하여 TBARS 생성 정도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 농도별로 제조한 TMP (1,1,3,3-tetramethoxypropane ; malonaldehyde bis)용액을 사용하였다.

2) DPPH spray test

Silica gel column chromatography와 Sephadex column chromatography 등으로 분리 정제된 물질을 TLC상으로 전개시키고 그 중에서 항산화 활성이 강한획분의 위치를 확인하기 위해서 DPPH spray test를 실시하였다. DPPH를 ethanol에 녹여 7% DPPH 용액이 되게 한 다음 TLC plate에 뿌렸다. 완전히 보라색으로 변한 plate에서 항산화 활성이 있는 부분은 노란색을 띄게 되는데, 활성이 강할수록 진한 노란색을 띄게 된다. 활성이 있는 부분을 Rf치별로 모은 다음 Silica gel column chromatography와 Sephadex column chromatography 등으로 정제를 계속하였다.

라. 부추의 항혈전물질 활용한 제품개발

1) 항혈전 소재

동결건조 부추를 원료로 하여 3배량의 hexan으로 반복 추출하여 탈지한 다음, 잔사를 진공건조하였다. 건조된 잔사에 10배량의 에탄올을 가하여 추출하고, 여과하여 에탄올 extract로 하였다. 에탄올 extract를 농축하기 위하여 증류장치를 사용하고, 증발한 에탄올을 회수하여 재사용 하였다.

2) 항혈전 제품개발

동결건조 부추를 미세분말화 한 것과 용매추출 잔존 fiber를 항혈전물질 에탄올 농축액에 기타 소재를 용해한 후 carrier와 혼합하여 진공건조 하였다. 증량제로서 소맥전분을 사용하여 capsule을 500mg 기준으로 제조하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 부추의 항균항동맥경화성 물질의 탐색 및 기능성 부추제품의 개발

가. 분자크기의 분리

분자량 5,000 dalton 이상의 물질은 centriscart 용기 외부에 남게 되는데, 초기 농도와 같게 하기 위하여 생리식염수로 초기 부피 1ml로 맞추었다. 대조구인 생부추즙의 항균활성환의 크기가 15mm일 때 분자량 5,000 이상에서는 환이 생기지 않았고, 5,000이하에선 14mm가 나타났다. 분자량 5,000 이하에서만 항균활성이 나타나는 것으로 보아 항균물질의 분자량은 5,000 이하로 저분자 물질임을 알 수 있었다(Fig 4).

나. Liquid-liquid extraction

대체로 *Allium*속의 항균활성물질은 -SH기를 포함하는 것으로 알려져 있으며, 그 보다도 더 많은 물질이 복합적으로 이루어져 있다고 추정된다. 이 복합물을 분리하는 것은 각 활성기의 전위도 차를 이용하는 것이 대부분이다.

유기용매를 이용한 이 복합물을 분리해서 그 활성정도를 찾는 것은 매우 의미있는 것으로 판단되어 극성정도가 다른 용매로 분획을 하여 항균활성을 측정(Table 5). Chloroform 분획물에서 높은 활성을 나타내었으며 ethylacetate 분획도 항균활성이 어느정도 나타났었다. 그러나 ethylacetate 분획은 건조물량이 chloroform층에 비하여 1/12로서, 분배계수에 따라 이행된 동일물질로 판단된다.

Table 5. Antimicrobial activity on liquid-liquid extraction of Korean *Buchu*.

		Hexane	Chloroform	Ethylacetate	Butanol
Gram positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>	18	30	16	-*
	<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	-	-
	<i>Bacillus cereus</i>	22	33	23	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	18	33	19	-
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-
Gram negative bacteria	<i>E. coli O157</i>	16	25	14	-
	<i>Salmonella typhimurium</i>	14	22	15	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13	24	15	-
Yeast	<i>Pichia membranaefaciens</i>	-	40	-	-

* No inhibitory zone was formed

다. Thin layer chromatography

용매추출한 부추즙에서 얻은 chloroform 분획으로 TLC를 하였다(Fig 5). UV 254nm를 조사한 결과 8개의 영역이 나타났고, 이 부분들을 긁어내어 용매로 녹인 뒤 여과한 후 여과액을 농축하여 항균활성을 측정. 6번 영역에서 27.5mm로 가장 큰 항균활성을 나타내었으며 TLC를 이용한 항균물질 분리가 가능함을 알 수 있었다(Table 6). Ninhydrin 단백질 발색시약으로 발색시켜 본 결과 발색반응이 나타나지 않아 단백질 계통이 아닌 부추자체가 함유한 독특한 물질이 항균활성을 나타낸다고 사료된다.

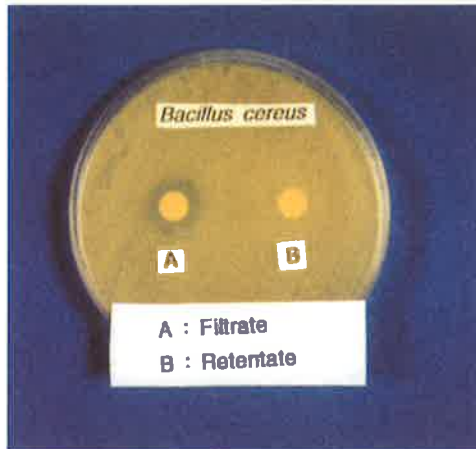


Fig 4. Effect of ultrafiltration on the antimicrobial activity (M.W. cut off 5,000 dalton).

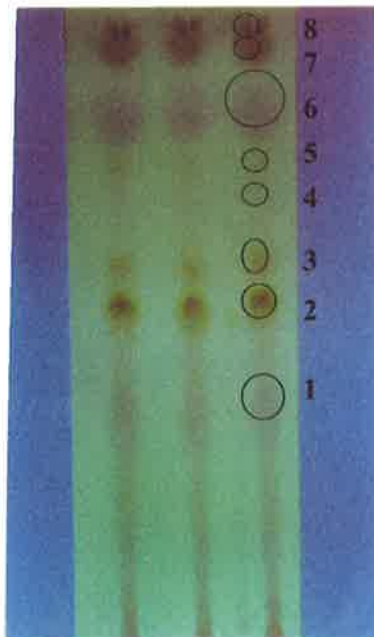


Fig 5. TLC chromatogram of chloroform fraction from of Korean *Buchu* extract.

Table 6. Antimicrobial activity of different fractions from TLC.

Number of fraction	Clear zone (mm)
1	-*
2	9.5
3	9.0
4	9.0
5	8.5
6	27.5
7	10.0
	9.5

* : No inhibitory zone was formed

라. High performance liquid chromatography

TLC 실험에서 항균활성을 크게 나타난 6번 영역이 UV 254nm에서 측정이 가능하였으므로, UV detector의 파장을 254nm로 결정하였다. 그 결과 5개의 peak이 나타났으며 이들의 항균활성을 측정하였다(Fig 6). 생부추즙을 대조구로 하여 비교하면, peak 1번, 4번에서는 항균활성이 나타나지 않았고 peak 2번에서는 9.5mm, 3번에서는 13.5mm를 나타내었다. 따라서 항균물질이 2가지 이상의 복합체로 이루어져 있음을 알 수 있었다(Table 7).

Table 7. Antimicrobial activity of various fractions HPLC from TLC fraction No.6.

Fraction number.	Clear zone (mm)
Control	20.0
1	-*
2	9.5
3	13.5
4	-

* : No inhibitory zone was formed

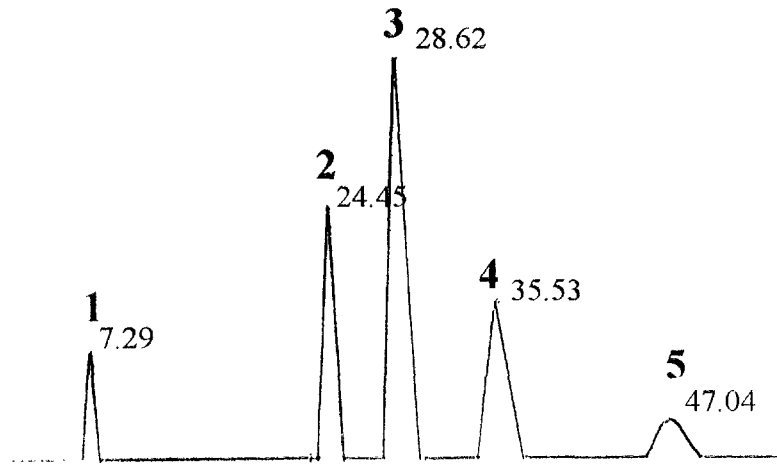


Fig 6. HPLC chromatogram of TLC fraction No 6.

2. 항균성 부추제품 개발

가. 부추의 항균성분을 활용한 폴리에틸렌필름 소재의 개발

1) 부추 폴리에틸렌필름

부추 폴리에틸렌필름의 재료인 ethanol 추출액과 부추의 색소와 냄새를 제거시키기 위하여 활성탄으로 처리한 추출물의 원액과 필름, Hunter's color meter의 색도·색차는 Fig 7, 8 및 Table 8, 9와 같다.

활성탄처리를 할 경우 명도(L^*)와 황색도(b^*)가 크게 증가하였으며, 적색도는 별로 차이가 없었다. 활성탄 처리 시간에 따른 색도의 변화는 거의 없었다.

부추항균필름의 색도는 활성탄처리를 한 경우 명도가 크게 증가하였으며 녹색도가 다소 감소하였다. 황색도는 크게 감소하는 경향을 나타내었다.

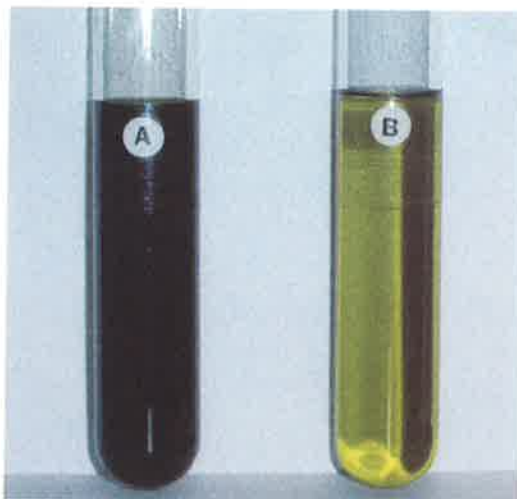


Fig 7. Ethanol extract from freeze dried Korean *Buchu*.

A : Ethanol extract

B : Ethanol extract treated with active carbon for 1 hour



A



B

Fig 8. Polyethylene film coated with Korean *Buchu* extract.

A : Ethanol extract

B : Ethanol extract treated with active carbon for 1 hour

Table 8. Hunter's color value of Korean *Buchu* extract.

	L*	a*	b*
Ethanol extract ; A	0.29	+3.99	+0.50
Ethanol extract treated with active carbon for 1 hour ; B	2.15	+3.65	+3.67
Ethanol extract treated with active carbon for 2 hour	2.18	+3.48	+3.80

Table 9. Hunter's color value of polyethylene film coated with Korean *Buchu* extract.

	L*	a*	b*
Ethanol extract (A)	64.60	-9.28	+27.11
Ethanol extract treated with active carbon for 1 hour (B)	86.91	-7.63	+11.49

2) 부추 폴리에틸렌필름의 항균성

부추 향균물질을 코팅한 polyethylene film의 항균성을 측정한 결과 시험균주 모두에 항균성을 나타내었다(Table 10). 특히 저온균주인 *Pseudomonas fluorescens*에 대해 가장 강력한 항균성을 나타내었다. 그러나 활성탄 처리를 하여 탈색한 소재로 코팅한 경우 항균활성이 다소 낮아짐을 알 수 있었다.

Table 10. Antimicrobial activities of film coated with Korean *Buchu* extract against various microorganisms.

Microorganism	Clear zone(mm ¹⁾)	
	Ethanol extract	Ethanol extract treated with active carbon
Gram Positive bacteria		
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC1621	15	13
<i>Bacillus cereus</i> KCTC1012	14	11
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1022	11	10
Gram negative bacteria		
<i>Escherchia coli</i> 0157:H7	13	11
<i>Salmonella typhimurium</i> KTCT2541	15	14
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC1645	18	15

¹⁾Film diameter : 8mm

3) 부추 폴리에틸렌필름으로 포장된 어묵의 생균수

폴리에틸렌필름으로 포장한 어묵은 10℃보관 초기 3.0×10^2 이던 균수가 점점 증가하여 보관 7일째는 8.9×10^5 CFU/g으로 이후 급속한 부패가 이루어졌다. 그러나 부추 추출물로 코팅한 폴리에틸렌필름으로 포장한 어묵은 보관 7일째 4.5×10^4 CFU/g이었으며, 활성탄으로 처리한 부추 폴리에틸렌필름의 경우 3.2×10^5 CFU/g이었다(Fig 9). 20℃에서 보관한 어묵은 보관 3일 이후부터 급속한 부패를 시작하였다(Fig 10). 어묵은 통상 냉장 유통하므로 부추 추출물로 처리한 폴리에틸렌필름으로 어묵을 포장할 경우 상당한 효과를 볼 수 있는 것으로 판단된다. 하지만 부추를 추출하고 코팅하는데 상당한 경제적 시간적 손실이 따르므로 부추 폴리에틸렌필름은 어묵의 유통기한 연장에 효과가 있지만 포장 어묵 원가의 상승을 유발하며 경제성에는 문제가 있는 것으로 판단된다.

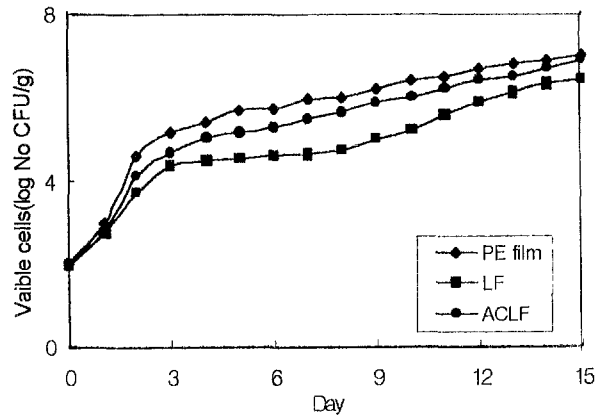


Fig 9. Changes in viable cell count of boiled fish paste wrapped with different types of film and stored at 10°C.

PE : Polyethylene, LF : Film coated with Korean leek extract, ACLF : Film coated with discolored Korean leek extract.

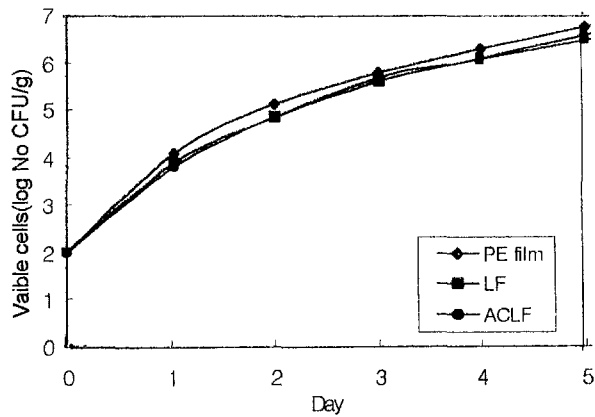


Fig 10. Changes in viable cell count of boiled fish paste wrapped with different types of film and stored at 20°C.

PE : Polyethylene, LF : Film coated with Korean *Buchu* extract, ACLF : Film coated with discolored Korean *Buchu* extract.

4) 부추 폴리에틸렌필름으로 포장된 어묵의 관능검사

포장 어묵의 저장 4일째 실시한 관능검사 결과는 Table 11과 같다. 외관은 부추 추출액을 활성탄으로 처리한 폴리에틸렌필름과 미처리 폴리에틸렌필름이 대조군에 비해 점수가 낮았고, 활성탄으로 처리한 것과 처리하지 않은 부추 폴리에틸렌필름으로 보관한 어묵 모두에서 부추 고유의 맛과 향이 나타났다. 어묵 고유의 향과 맛이 나타나야 할 어묵에 부추 특유의 향과 맛이 나타나서 관능검사 시 낮은 점수를 나타냈고 또한 어묵에 부추의 색이 착색되어 어묵 특유의 색을 잃어버렸다. 따라서 부추의 향균물질로 코팅한 포장소재는 포장 어묵의 단가를 상승시킬 뿐만 아니라 어묵 고유의 맛과 향, 맛에 모두 영향을 미쳤다.

Table 11. Sensory evaluation of boiled fish paste wrapped with different film.

	Control	ACLF ¹⁾	LF ²⁾
Appearance	8.7 ^a	6.0 ^b	8.1 ^a
Flavor	8.49 ^a	5.2 ^b	7.9 ^a
Overall preference	7.54 ^a	5.8 ^b	7.1 ^a

¹⁾ACLF : Film coated with Korean *Buchu* extract

²⁾LF : Film coated with discolored Korean *Buchu* extract

나. 부추의 장내균총 개선효과 탐색 및 제품개발

1) 장내균총에 대한 효과

부추 착즙액을 volume 비 2% 첨가하였을 때 *Bifidobacterium adolescentis*와 *Clostridium butyricum*에 대한 생육 증진효과가 가장 컸으며, *Bifido infantis*, *Bifido breve*, *Bifido longum*은 그 효과가 미약하였다. 식중독 균주인 *Clostridium perfringens*에 대하여는 약간의 생육억제를 나타내었다(Fig 11, 12).

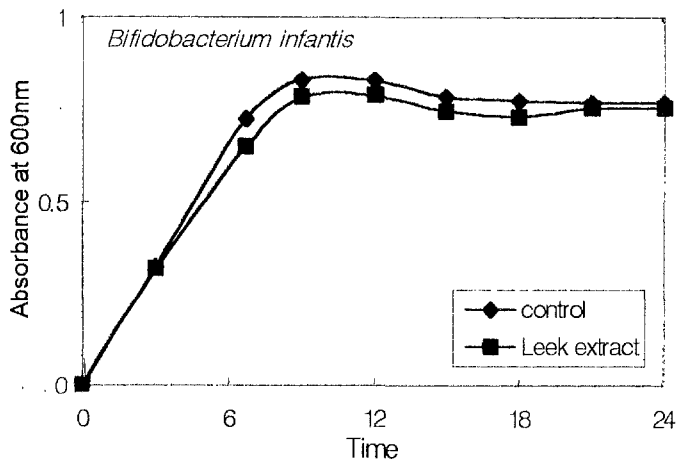
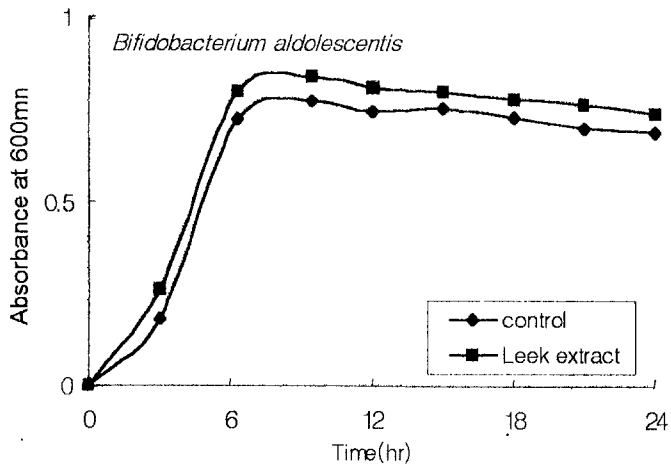


Fig 11. Effect of Korean *Buchu*(leek) extract on the growth of *Bifidobacterium* spp.

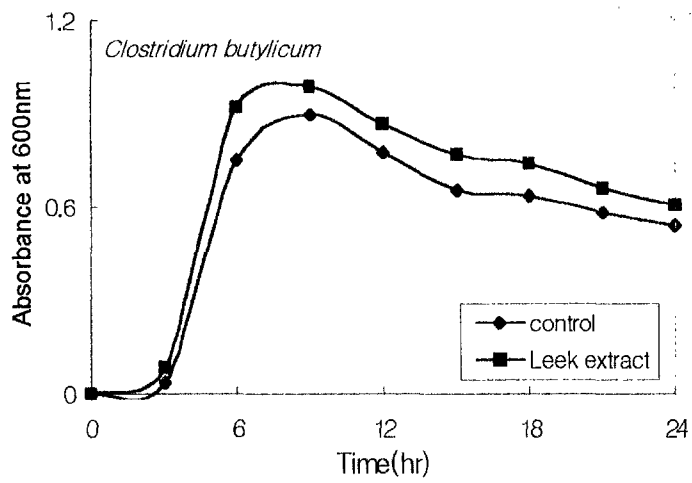
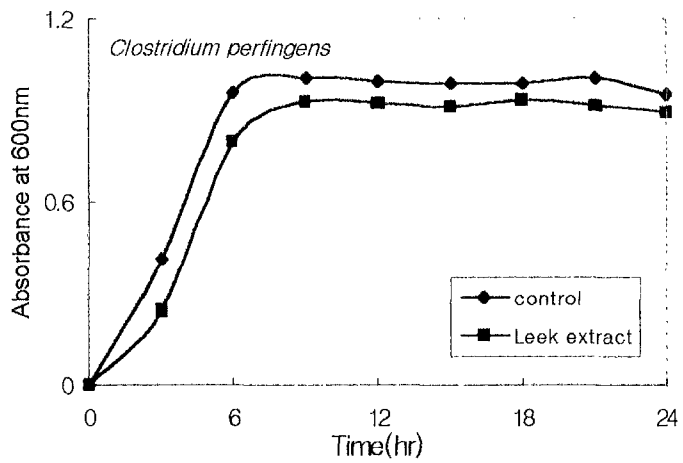


Fig 12. Effect of Korean *Buchu*(leek) extract on the growth of *Clostridium* spp..

2) 장내균총 개선용 소재 제조

장내균총 개선용 제품의 원재료가 되는 동결건조 분말과 spray dry 분말의 색도는 Table 12와 같다. Spray dry한 분말의 명도가 훨씬 높았다. 이 소재를 이용하여 장내균총 개선용 캡슐을 제조하였다. Spray dry를 위한 부형제의 첨가량은 Table 13과 같다. 일반적으로 많이 이용되는 부형제인 dextrin, lactose, gum 등을 사용하였으며, dextrin을 첨가한 용액을 mixer로 균질화하여 최종적으로 Brix가 47이 되도록 조절한 후 나머지 부형제를 첨가하여 잘 혼합하였다. 분무건조는 건조실 내부온도 200℃, atomizer의 회전속도는 30,000rpm으로 건조하였다.

검의 종류에 따라 spray dry 적성이 크게 달랐다. Type A와 B는 spray dry가 용이하게 이루어졌으나, type C는 spray dry가 되지 않았다. 또한 type B의 경우 수율이 매우 낮았다. 따라서 소재의 기본 조성은 type A로 하였다.

Table 12. Hunter's color value of Korean *Buchu*(leek) powder.

	L*	a*	b*
Korean leek powder by freeze drying	48.97	-11.11	+17.37
Korean leek powder by spray drying	70.55	-15.91	+27.35

Table 13. The composition of Korean *Buchu*(leek) extract with dextrin, gum and lactose for the preparation of powder.

	Korean leek liquor	Dextrin	Gum	Lactose
Type A	1kg	80g	0	50g
Type B	1kg	80g	10g(guar gum)	50g
Type C	1kg	80g	10g(xanthan gum)	50g

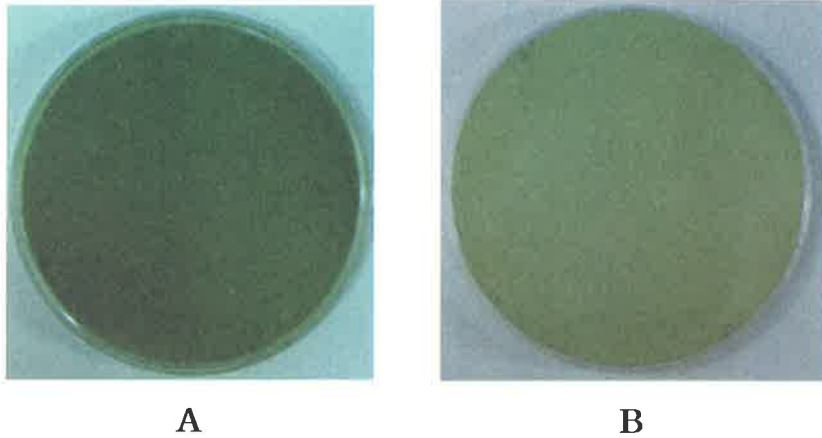


Fig 13. Korean *Buchu* powder.

A : Freeze dried
B : Spray dried

3) 장내균총 개선용 제품개발

장내균총 개선용 제품은 앞의 소재를 이용하여 동결건조한 부추 분말의 섬유질부분(50%)에 분무건조한 부추 분말 기능성(50%)을 가하여 캡슐을 만들었다(Fig 14). 캡슐 한 개의 무게는 500mg이 되게 제조하였다. 부추 캡슐 섭취 전·후 정상인과 변비환자 분변 속의 *Bifidobacterium*속과 *Clostridium*속의 개수를 비교한 결과(Fig 15, 16), *Bifidobacterium*속의 경우 정상인 변비환자 모두에게서 섭취 후의 증가를 가져왔지만, *Clostridium*속에 대해서는 큰 효과를 나타내지 못하였다. 하지만 장내 유익균인 *Bifidobacterium*속의 개수가 증가하는 것으로 보아 부추의 장내균총 개선효과가 높다고 할 수 있다.



Fig 14. Capsule for the improvement of intestinal microflora.

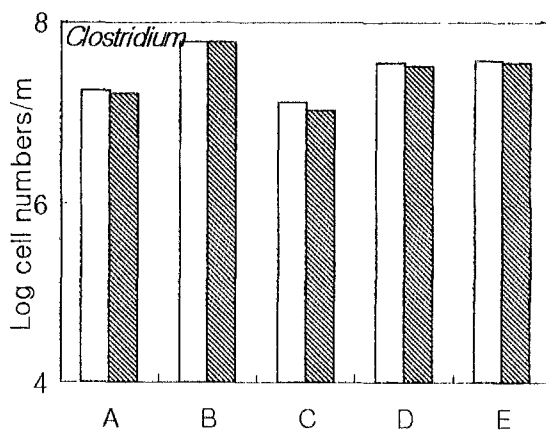
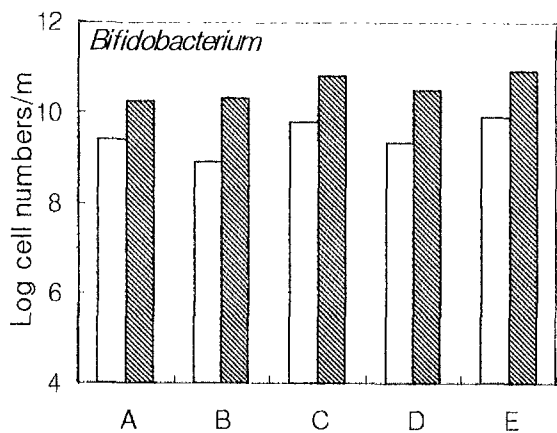


Fig 15. Counts of microorganisms in feces of normal persons

□ : Before, ▨ : After

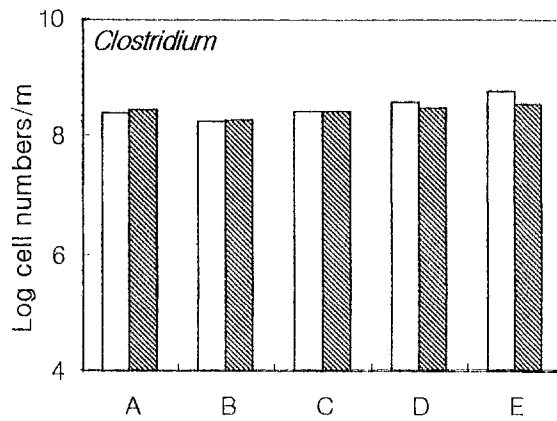
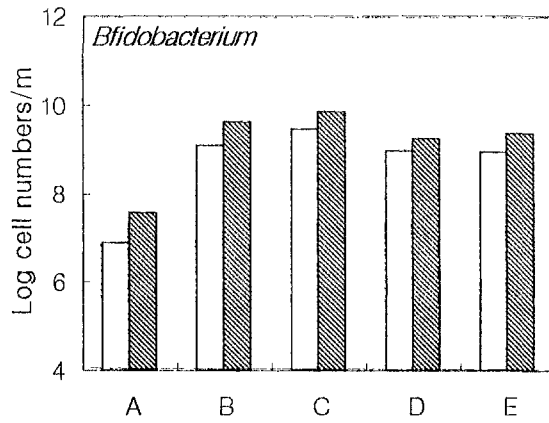


Fig 16. Counts of microorganisms in feces of constipated persons

□ : Before, ▨ : After

3. 부추 추출물의 LDL 산화 억제능 및 항동맥경화 효과 규명

가. *In vitro*에서 부추 추출물의 항동맥경화 효과 조사

1) 부추 추출물의 수득량

동결건조 부추 15Kg으로부터 methanol extract 751.5g, hexane획분 27g, dichloromethane 획분 532.2g, ethyl acetate 획분 64g, Butanol 획분 36g, H₂O 획분 104.3g을 얻었으며 이들의 수득률은 각각 3.5%, 69.7%, 8.4%, 4.7%, 13.7%였다.

2) 부추 추출물의 LDL 산화억제능

부추 용매별 추출물의 LDL 산화억제능을 알아보기 위해 TBARS와 conjugated dienes의 단위 시간당 생성 감소량을 측정된 결과, 단위 시간당 TBARS 생성 억제효과는 Fig. 17과 같고, conjugated dienes의 생성 억제 효과는 Fig. 18과 같았다. 즉 대조군에 비해 dichloromethane층과 ethyl acetate층이 LDL 산화를 효과적으로 억제하였다. 이처럼 ethyl acetate 층의 LDL 산화억제능이 높은 것은 부추속에 존재하는 페놀성 물질에 기인하는 것으로 사료된다.

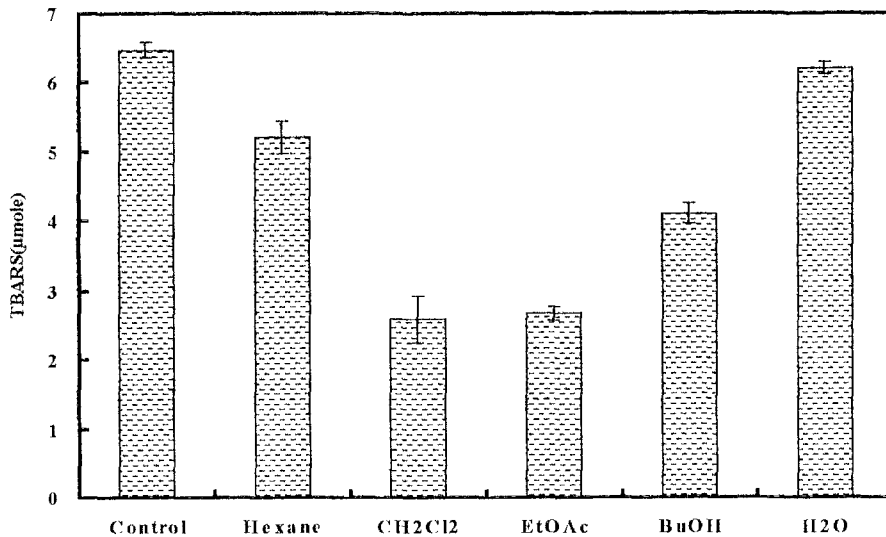


Fig. 17. Effects of *Buchu*(leek) solvent fractions(30ug/ml) on TBARS formation.

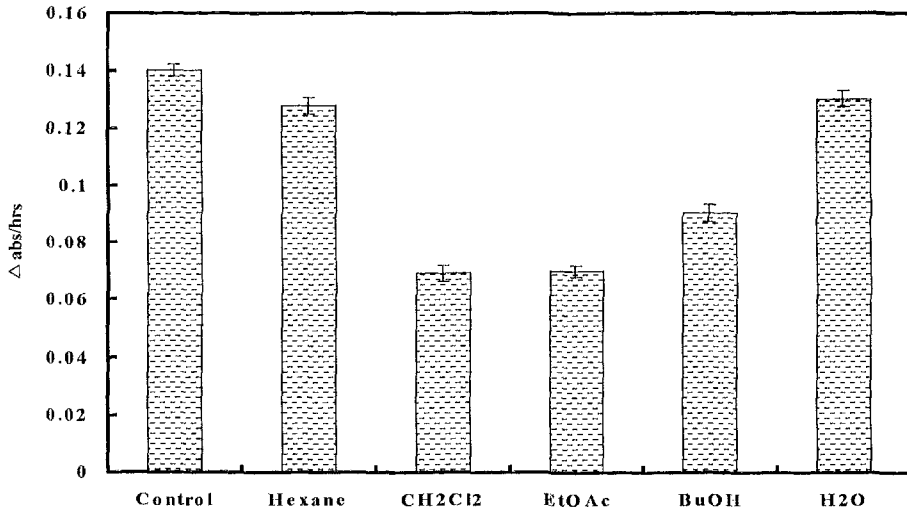


Fig. 18. Effect of *Buchu*(leek) solvent fractions on the conjugated dienes formation.

3) 부추 추출물이 혈전용해능에 미치는 영향

부추 용매별 추출물이 혈전용해능에 미치는 영향을 fibrin tube 법으로 측정한 결과는 Fig. 19와 같다. 즉, hexane층과 H₂O층을 제외하고 모든 층에서 fibrin 분해활성이 나타났으며, 특히 dichloromethane층과 ethyl acetate층이 모두 0.244unit로 혈전용해능이 가장 높게 나타났다.

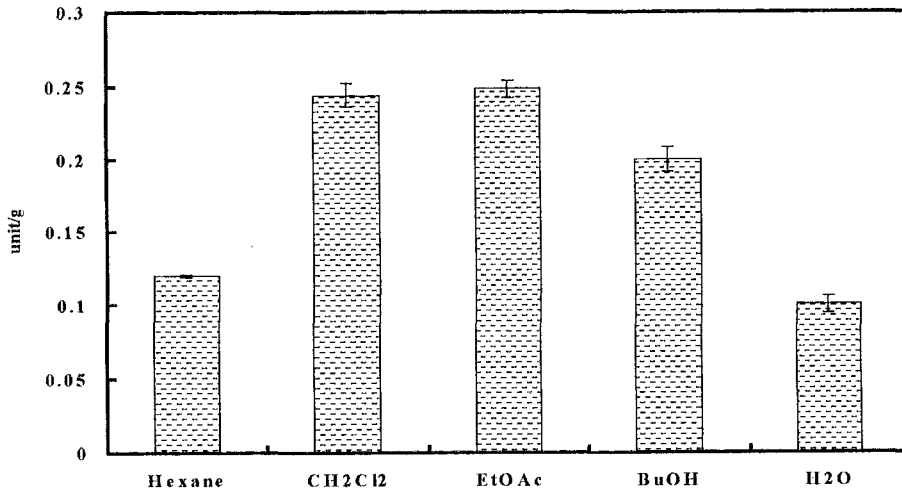


Fig. 19. Effect of *Buchu*(leek) solvent fractions on the fibrinolytic activity.

4) 부추 추출물의 혈소판 응집 억제능

부추 용매별 추출물이 혈소판 응집에 미치는 영향을 측정한 결과는 Table 14와 같다. 대조군에 비해 모든 층에서 혈소판 응집 억제 효과가 나타났으며, 특히 hexane 층과 ethyl acetate 층이 가장 효과가 컸다.

Table 14. Effect of *Buchu*(leek) solvent fractions on the platelet aggregation.

Sample	Relative activity(%)
Control	100
Hexane fr	18.75
CH ₂ Cl ₂ fr	30.00
EtOAc fr	12.50
BuOH fr	43.80
H ₂ O fr	37.50

5) 부추 추출물이 HMG-CoA reductase 활성화에 미치는 영향

콜레스테롤 합성 율속 효소에 부추 용매별 추출물이 미치는 영향은 Table 15와 같

다. 대조군에 비해 hexane층 89.47%, dichloromethane층 23.68%, ethyl acetate층 15.79%, Butanol층 62.63%, H₂O층이 79.47%정도 감소하였고, 특히 ethyl acetate층의 HMG-CoA reductase 활성 저해 효과가 가장 높았다.

Table 15. Effect of *Buchu* solvent fractions on the HMG-CoA reductase activity.

Sample	Relative activity(%)
Control	100
Hexane fr	89.47
CH ₂ Cl ₂ fr	23.68
EtOAc fr	15.79
BuOH fr	62.63
H ₂ O fr	79.47

나. 당뇨병의 지질대사와 혈관구조에 미치는 영향

1) 식이 섭취량, 체중 증가량 및 식이 효율

각 실험식이로 8주간 사육한 streptozotocin 유발 당뇨병의 식이 섭취량, 체중 증가량 및 식이 효율을 측정한 결과는 Table 16과 같다. 1일 식이 섭취량은 정상군에 비해 당뇨병에서 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 8주간의 사육기간 동안의 체중 변화는 Fig. 20과 같다.

Table 16. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu* extract.

	Control	DM control	DM <i>Buchu</i> ext.
Body weight gain (g/day)	1.67±0.03 ^a	-1.18± 0.06 ^c	-0.49± 0.01 ^b
Food intake (g/day)	29.78±7.54 ^b	35.05±14.43 ^a	35.75±10.92 ^a
Food efficiency ratio (%)	5.61±2.04 ^a	-3.37± 1.24 ^c	-1.37± 2.14 ^b

Values are mean±SD.

Food efficiency ratio(%) = (weight gain(g)/food intake(g)) × 100

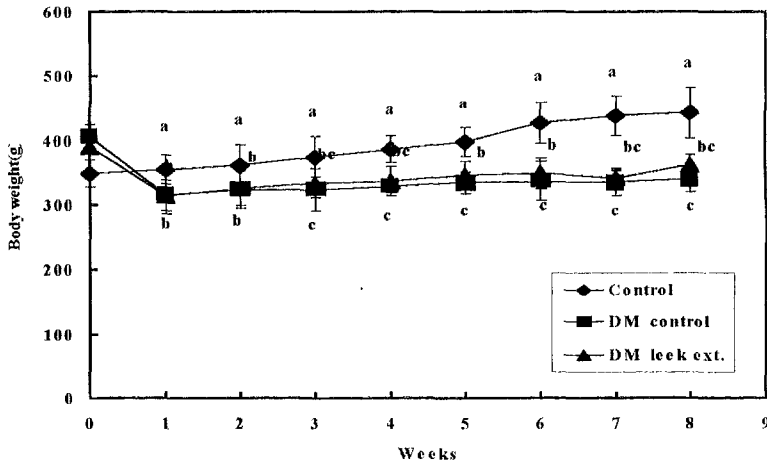


Fig. 20. Body weight changes in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

2) 혈전용해능

혈장에서 혈전용해능을 측정한 결과(Fig. 21) 부추당뇨군의 혈전용해능이 정상군이나 당뇨대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$).

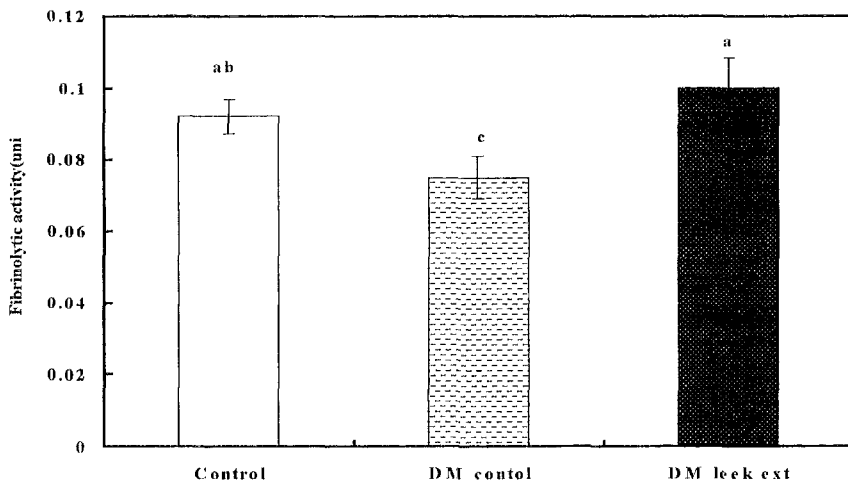


Fig. 21. Fibrinolytic activity of plasma in streptozotocin-induced diabetic rat fed *Buchu*(leek) extract.

3) 혈장의 지질 조성 및 효소 활성

8주간의 사육 후 GOT, GPT 농도는 Fig. 22에 나타내었다. 혈장 GOT와 GPT 활성은 정상군에 비해 당뇨대조군에서 각각 223%, 240%가 증가하였으나 부추 당뇨군에서는 부추의 섭취로 인해 정상군 수준으로 감소하였다($p < 0.05$). 혈장의 콜레스테롤과 중성지방 농도는 Fig. 23에 나타내었다. 정상군에 비해 당뇨군에서 혈장의 콜레스테롤과 중성지방의 농도가 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$).

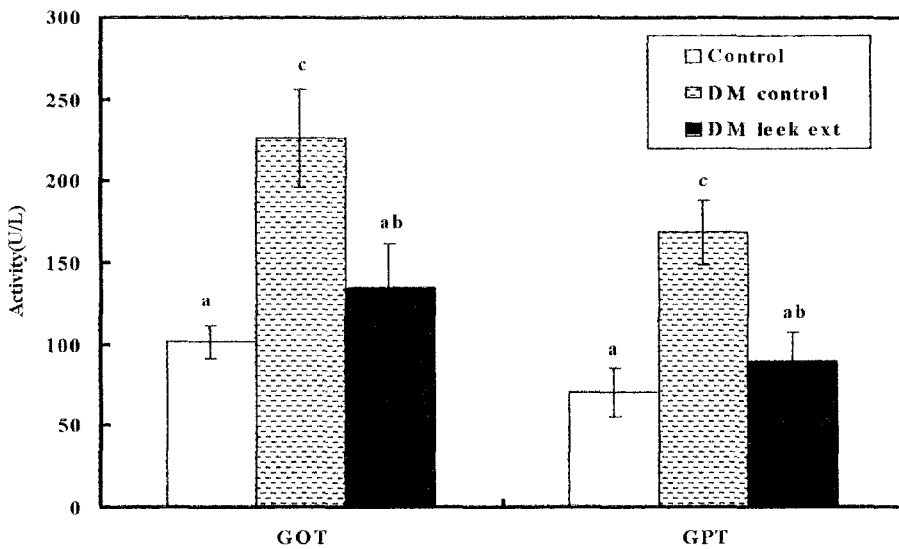


Fig. 22. GOT and GPT levels in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

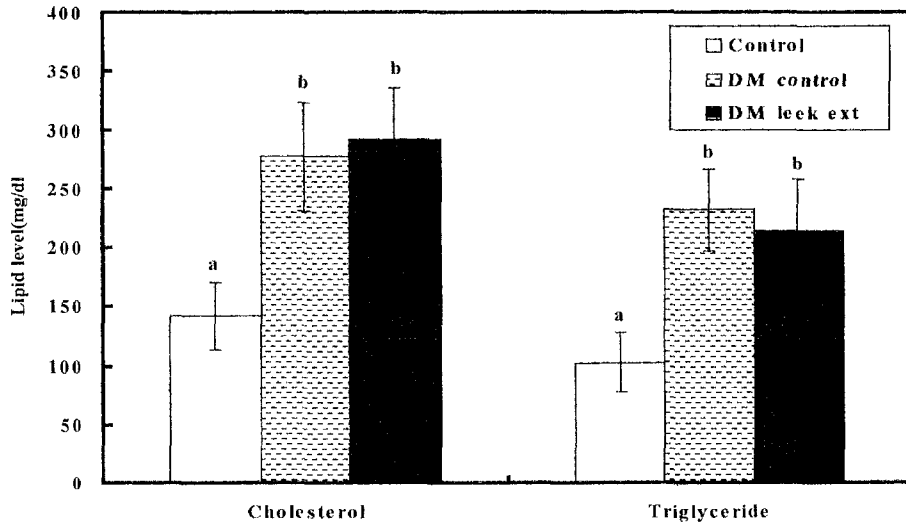


Fig. 23. Plasma cholesterol and triglyceride concentration of streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

4) 지단백 획득의 콜레스테롤 함량, 중성지방 함량과 동맥경화 지수

혈장의 지단백 획득에서의 콜레스테롤 농도와 중성지방 농도, 동맥경화 지수는 각각 Fig. 24, Fig. 25과 Fig. 26에 나타내었다. VLDL과 LDL 콜레스테롤의 농도는 정상군에 비해 당뇨대조군에서 유의적으로 높았으며($p < 0.05$), 부추당뇨군의 경우 당뇨대조군에 비해 다소 감소하는 경향을 나타내었다. VLDL과 LDL의 중성지방의 농도는 정상군에 비해 당뇨군에서 유의적으로 높았으나 부추 당뇨군은 당뇨대조군에 비해 각각 6%, 13% 감소하였다. 당뇨 대조군의 동맥경화지수는 정상군에 비해 유의적으로 증가되었으나($p < 0.05$), 부추당뇨군은 당뇨대조군에 비해 다소 낮아졌다.

5) 혈장과 적혈구의 지질 과산화 수준

가) TBARS 함량

혈장에서의 TBARS 함량은 정상군에 비해 당뇨대조군이 유의적으로 높았고 반면에 부추당뇨군은 정상군 수준으로 회복되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 27, 28) LDL에서의 TBARS 함량은 정상군에 비해 당뇨대조군에서 유의적으로 증가되었고($p < 0.05$), 부추당뇨군에서는 정상군 수준으로 회복되었다.

나) Conjugated diene level 측정

LDL에서 conjugated diene level 측정 결과는 Fig. 29와 같다. 정상 군에 비해 당뇨병군에서 단위 시간당 생성량이 유의적으로 증가하였고($p < 0.05$), 부추당뇨군에서는 정상군 수준으로 감소되었다. 그리고 적혈구를 용혈시켜 conjugated diene 생성 정도를 구리 촉매하에 측정한 결과 군간에 유의적인 차이가 없었다(Fig. 30).

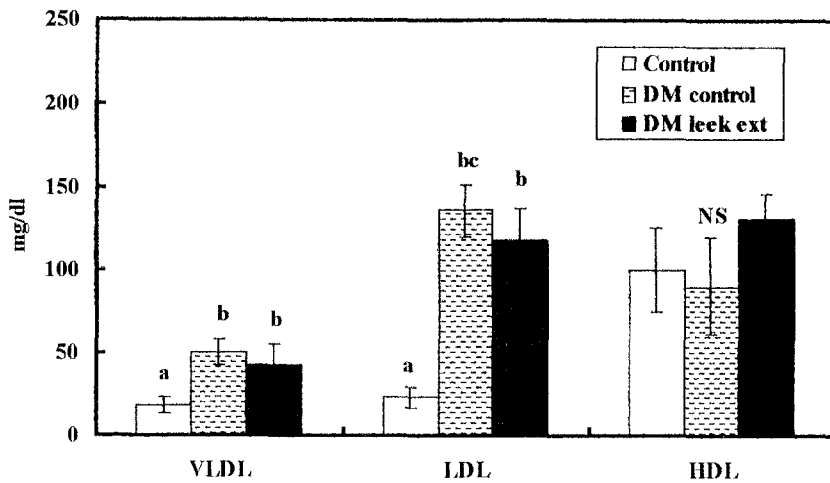


Fig. 24. Plasma lipoprotein cholesterol concentration in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

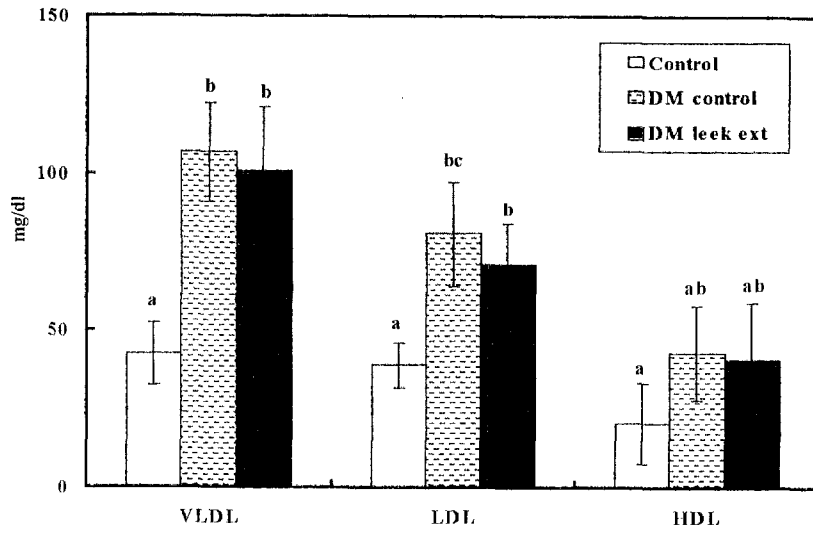


Fig. 25. Plasma lipoprotein triglyceride concentration in streptozotocin- induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

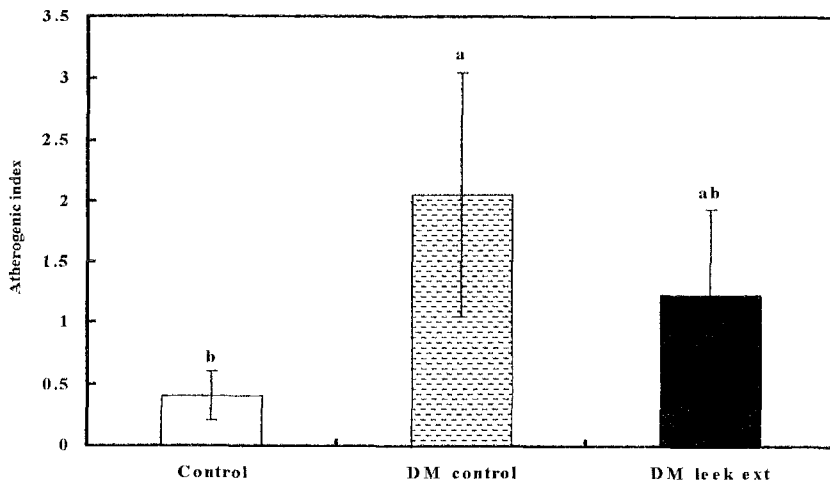


Fig. 26. Atherogenic index in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

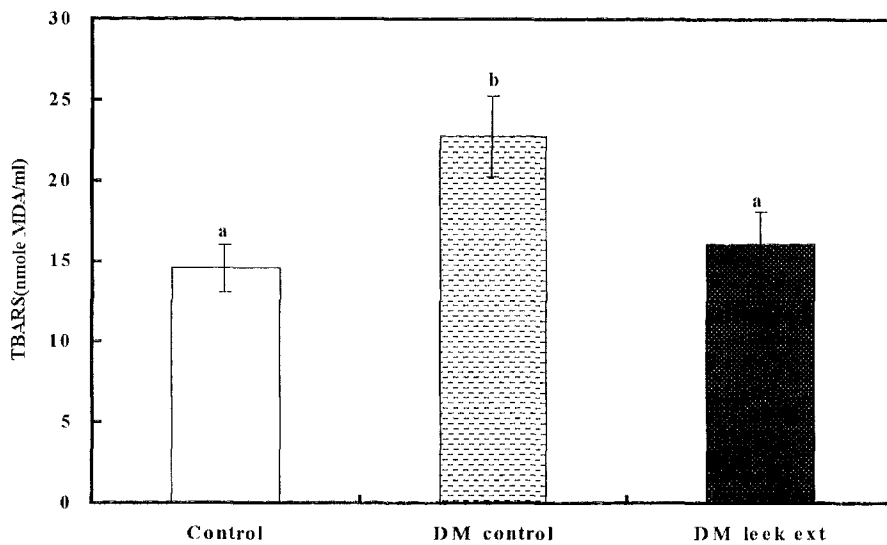


Fig. 27. TBARS of plasma in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

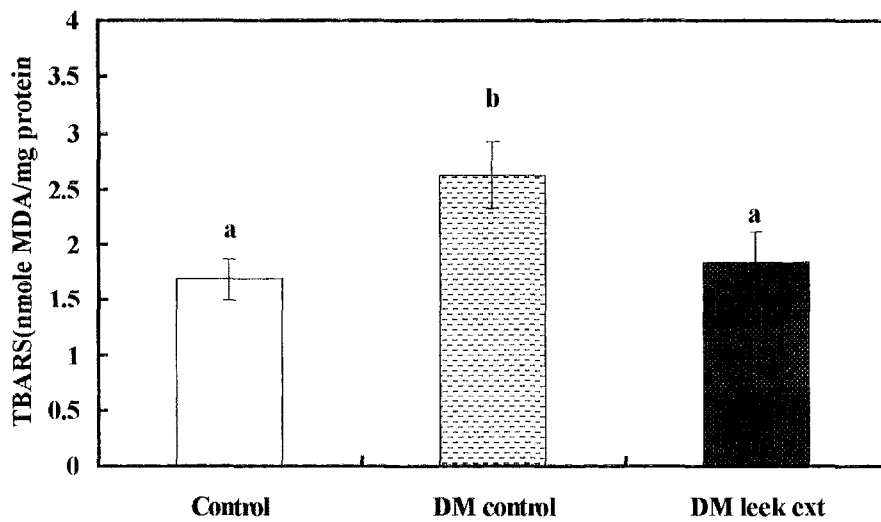


Fig. 28. TBARS of oxidized LDL in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

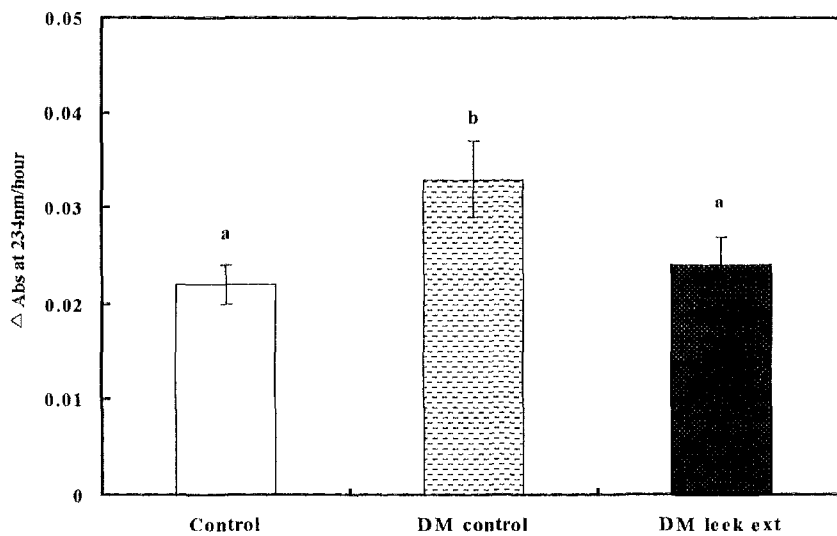


Fig. 29. Conjugated diene level of LDL in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

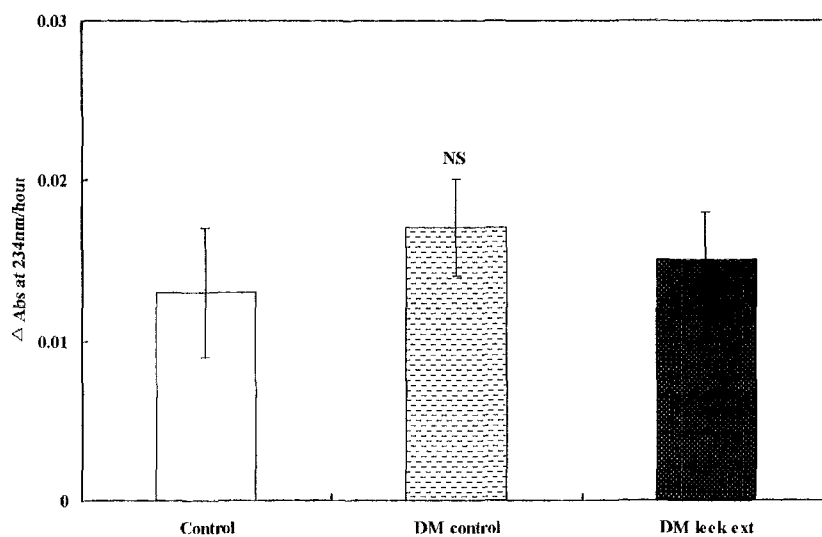


Fig. 30. Conjugated diene level of red blood cell in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

6) 혈장과 적혈구의 항산화 효소계 활성 및 글루타티온 함량

가) 적혈구에서의 항산화 효소계 활성 측정

적혈구에서의 glutathione peroxidase 활성, SOD 활성, catalase 활성을 측정한 결과는 Fig. 31, 32, 33에 나타내었다. 적혈구의 glutathione peroxidase 활성은 정상군에 비해 당뇨대조군에서 유의적으로 감소하여($p < 0.05$) 정상군에 비해 37% 감소를 보였으나, 부추당뇨군은 정상군 수준으로 회복되었다. SOD는 정상군에 비해 당뇨대조군에서 31% 감소되었고 부추당뇨군은 증가되어 정상군 수준으로 회복되었음을 확인할 수 있었다. Catalase 활성은 정상군과 당뇨대조군에 비해 부추당뇨군에서 증가하였지만 군간에 유의성은 발견되지 않았다.

나) 글루타티온 함량 측정

혈장에서의 글루타티온 함량은 Fig. 34과 같이 정상군에 비해 당뇨대조군에서 유의적으로 감소한 반면 부추당뇨군은 정상군 수준으로 회복하였다($p < 0.05$). 또 적혈구에서 글루타티온 함량은 Fig. 35과 같이 당뇨대조군에 비해 부추당뇨군에서 증가하였으나 군간에 유의성은 없었다.

7) 간의 지질, 콜레스테롤 함량

간의 총지방, 콜레스테롤, 중성지방 함량은 Fig. 36에 나타냈는데 그 결과 총 지방 함량은 정상군에 비해 당뇨군에서 수치가 높게 나타났다. Cholesterol과 중성지방은 정상군에 비해 당뇨군에서 유의적으로 증가하였고($p < 0.05$), 당뇨대조군에 비해 부추당뇨군에서 감소되었다.

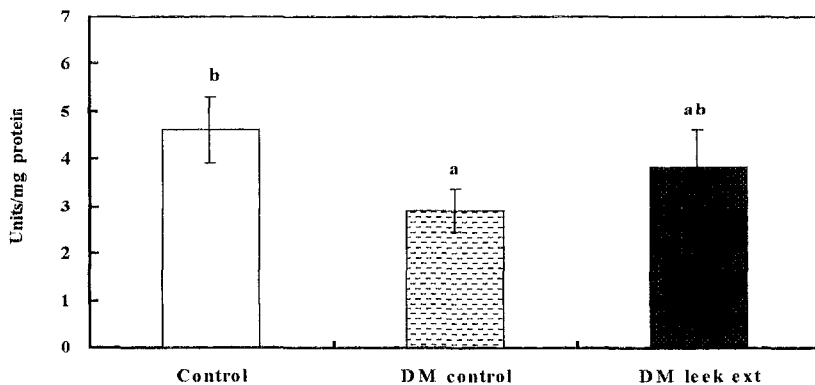


Fig. 31. Glutathione peroxidase activities of red blood cell in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

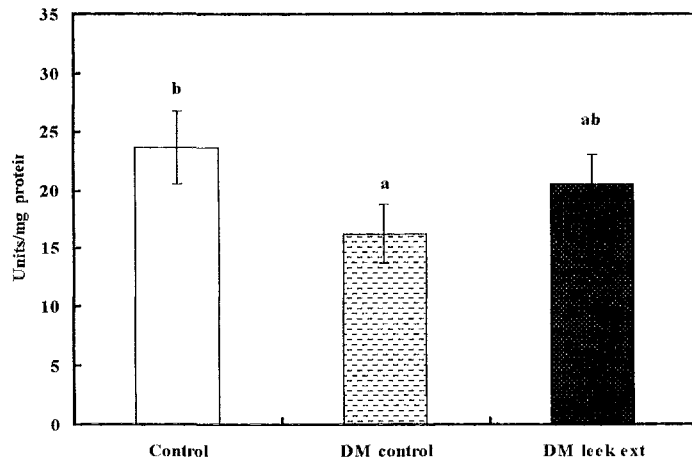


Fig. 32. SOD activities of red blood cell in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

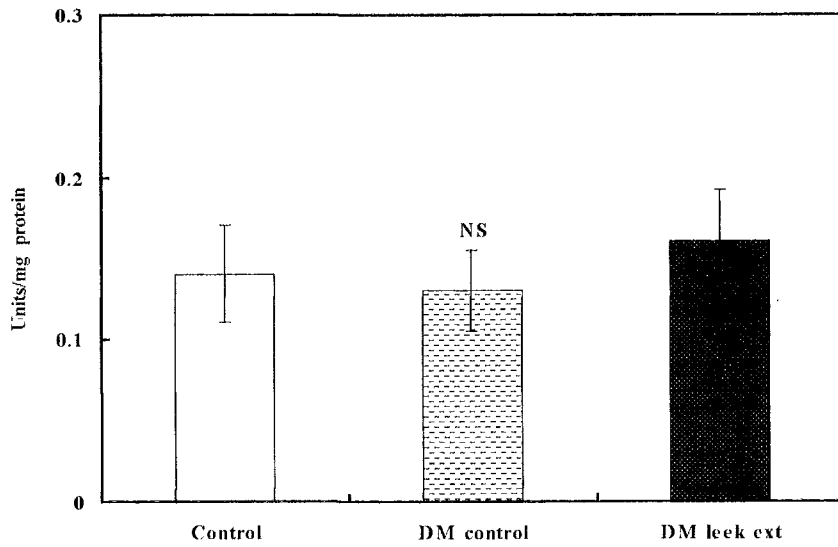


Fig. 33. Catalase activities of red blood cell in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

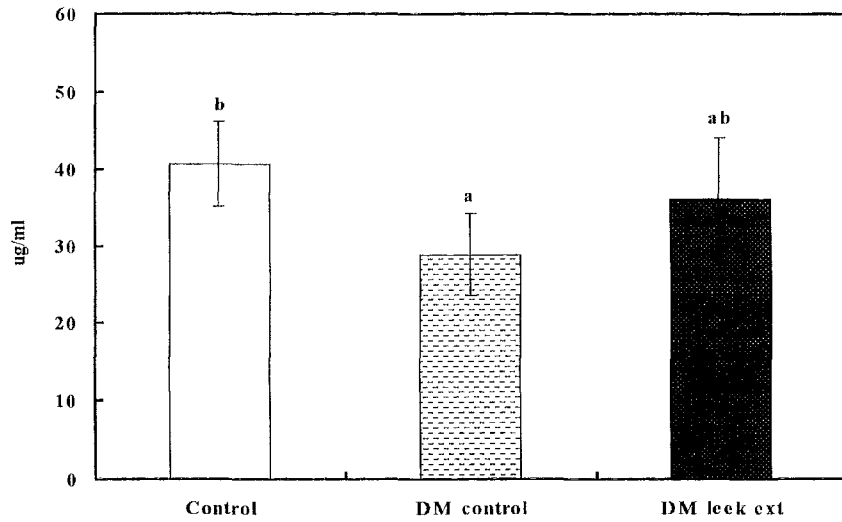


Fig. 34. Plasma glutathione levels in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

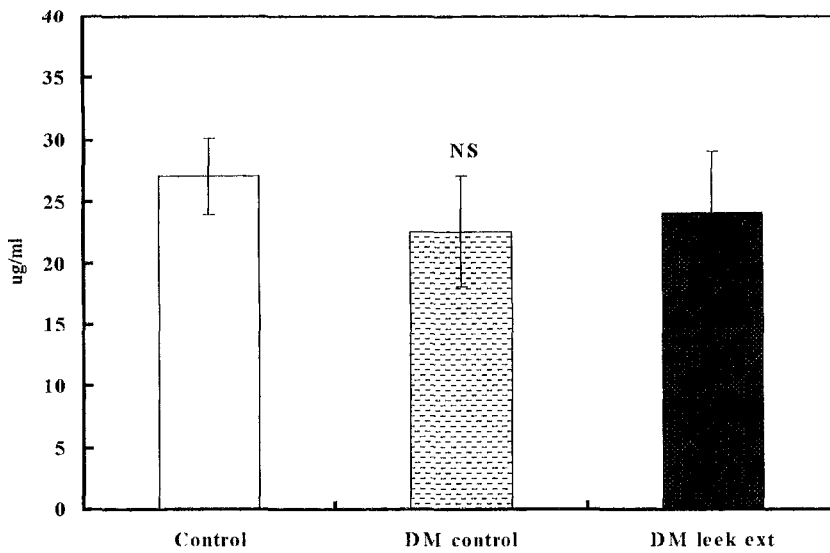


Fig. 35. Glutathione levels of red blood cell in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

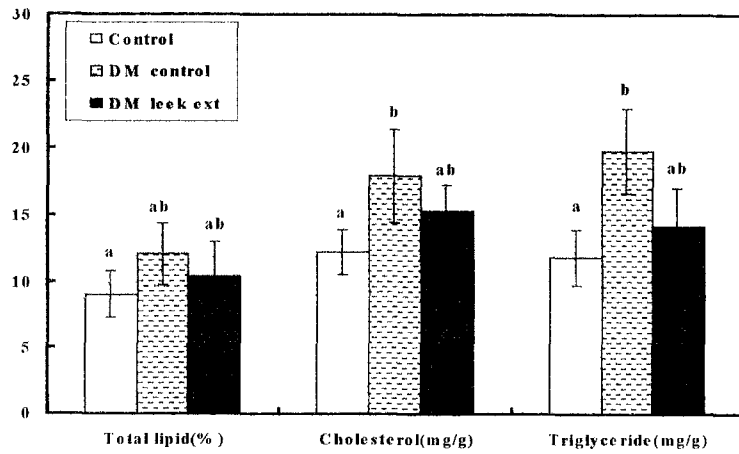


Fig. 36. Hepatic total lipid, cholesterol and triglyceride concentration in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

8) 간에서의 HMG-CoA reductase 활성

실험 식이로 8주간 사육한 당뇨 대조군의 경우, Fig. 37과 같이 HMG-CoA reductase의 활성이 1.94 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ microsomal protein로 정상군의 1.37에 비해 유의적으로 활성이 높았으며($p < 0.05$), 부추당뇨군은 거의 정상군 수준으로 회복되었음을 관찰할 수 있었다.

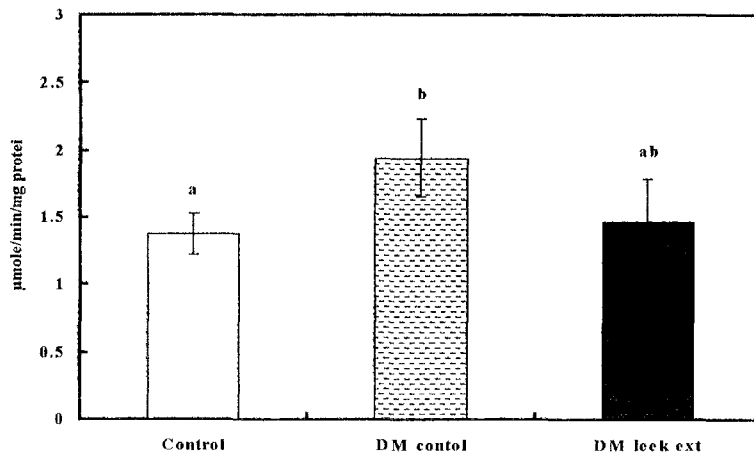


Fig. 37. HMG-CoA reductase activity in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

9) 분변으로의 지질 및 담즙산 배설량

분변 배설량에 부추 용매 추출물의 장기간 섭취가 미치는 영향은 Table 17과 같이 부추군과 정상군 사이에 유의성이 없었다. 분변으로의 콜레스테롤, 중성지방 배설량은 Fig. 38에 나타내었다. 분변으로의 total lipid 배설량은 당뇨대조군 보다 부추 당뇨군에서 유의적으로 증가하였고($p < 0.05$), 콜레스테롤 배설량은 정상군과 당뇨대조군에 비해 부추당뇨군에서 증가하였다($p < 0.05$). 또 중성지방 배설량은 정상군, 부추대조군에 비해 부추당뇨군에서 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 분변으로 배설되는 담즙산 함량은 Fig. 39에서 처럼 부추당뇨군의 배설량이 당뇨대조군에 비해 높았다($p < 0.05$).

Table 17. Fecal weight of streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu* extract diet.

	Control	DM control	DM <i>Buchu</i> extract
g/day	2.08±0.32	1.88±0.31	1.99±0.34

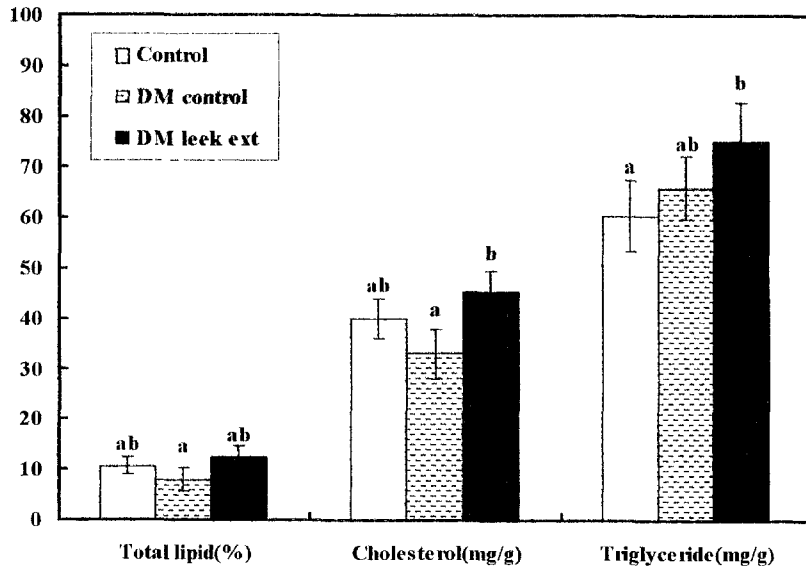


Fig. 38. Fecal total lipid, cholesterol, triglyceride excretion in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

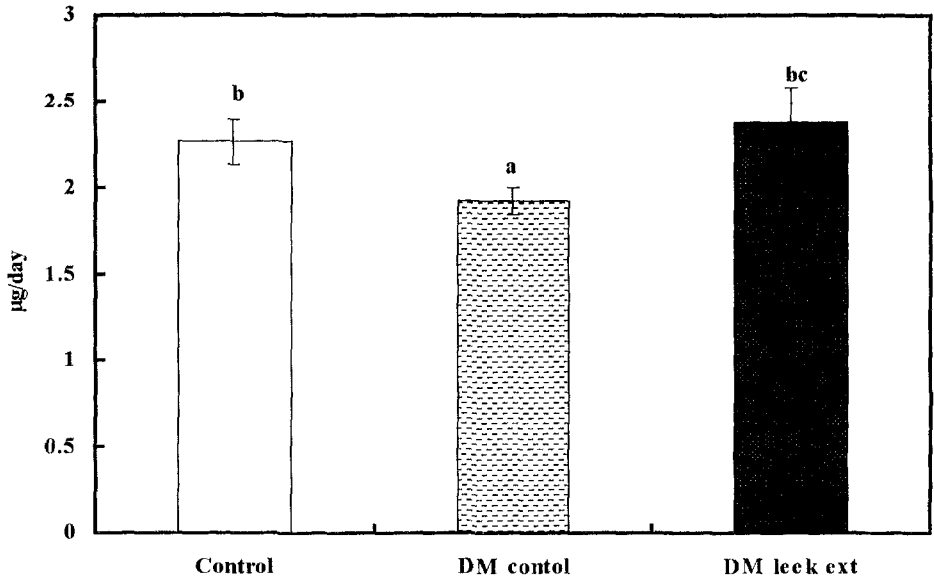


Fig. 39. Fecal bile acid excretion in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract.

10) SEM에 의한 대동맥궁의 미세구조 관찰과 TEM에 의한 간조직의 미세구조 관찰 대동맥 내피의 미세구조를 주사 전자 현미경으로 관찰한 결과 정상군에 비해 당뇨 대조군에서 지방구가 침착이 되고, fibrous plaque가 형성된 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 부추당뇨군은 당뇨대조군에 비해 혈관벽에 지방구나 fibrous plaque의 형성이 적게 나타났으며(Fig. 40), 투과 전자현미경(Transmission Electron Microscopy : TEM)을 이용해서 간조직의 미세구조를 관찰한 결과, 정상군에 비해 당뇨군에서 지방구가 크고 많이 형성됨을 볼 수 있었다(Fig. 41). 그러나 부추당뇨군에서는 당뇨대조군에 비해 지방구의 크기가 다소 작아진 것을 관찰할 수 있었다.

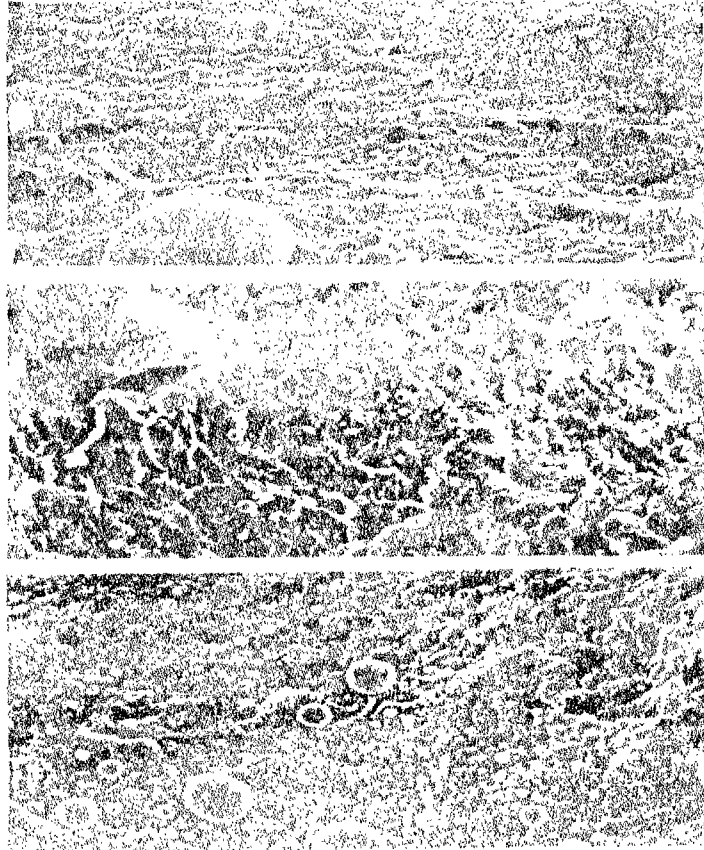


Fig. 40. Microstructure of aortic arch seen by SEM in streptozotocin induced diabetic rats fed *Buchu*(leek) extract($\times 300$).

A: control, B: DM control, C: DM leek ext

▶ : fibrous plaque

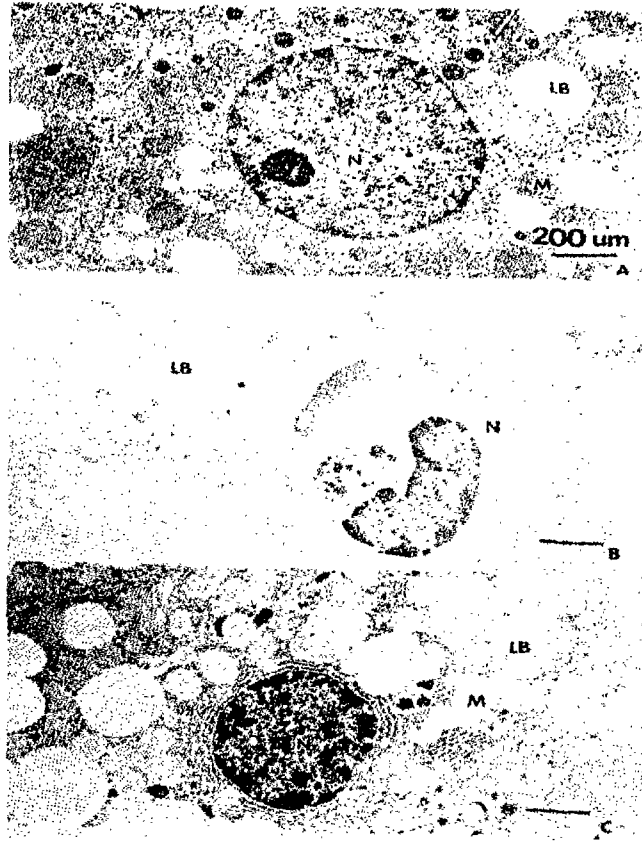


Fig. 41. Microstructures of hepatocytes of streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu(leek)* extract by TEM ($\times 5,000$).

A: control, B: DM control, C: DM *Buchu* ext
 N: nucleus, LB: lipid body, M: mitochondria

4. LDL 산화억제물질의 분리, 동정 및 항동맥경화성 부추제품 개발

가. 부추의 ethyl acetate 획분으로부터 분리된 활성 물질의 정제
 부추의 ethyl acetate 층을 Silica gel column chromatography를 행하여 이들을 TLC상에 전개하여 비슷한 Rf치를 보이는 것을 묶어 36개의 fraction을 얻었다. 36개의 fraction을 TLC상에서 전개하여 이들 fraction의 활성 test를 7% DPPH spray법으로 한 결과 1, 2, 3번 fraction에서 가장 강한 활성이 나타났고, Rf치가 유사한 fraction을 합하여 정제하였다. 이 fraction으로 Sephadex LH-20 column

chromatography를 시행하여 22개의 sub fraction으로 분리하였고, 그 fraction들을 TLC상에서 전개하여 7% DPPH spray test로 확인한 결과 8, 9, 10번에서 활성이 나타났다. 이들을 정제하기 위해 Silica gel column chromatography와 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였고, 그 결과 TLC상에서 단일 spot이 발견되었다.

나. 부추의 ethyl acetate 획분으로부터 분리된 활성 물질의 동정

최종적으로 DPPH test에 양성을 나타내는 compound를 분리, 동정하기 위해서 EI-MS, IR, UV, DEPT, COSY, HMBC, HMQC, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 분석을 행하였다. 분리된 화합물의 질량측정 및 구조해석을 위해서 EI-MS를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다 (Fig. 42). EI-MS (*m/z*)를 통해서 확인한 결과 194 *m/z*(*M*⁺)에서 분자이온 peak가 관찰되었으며 *m/z* 179 및 161에서 분자이온 peak로부터 methyl기와 *m/z* 179에서 H₂O의 이탈에 기인하는 peak가 각각 관찰되었다. IR spectrum(Fig. 43)을 살펴보면, 3437 (OH), 1694 (COOH), 1666.9 (α, β -unsaturated C=O) 그리고 1621, 1600, 1519 (aromatic C=C) cm⁻¹에서 특징적인 band를, 그리고 UV spectrum에서 나타난 217, 234, 296, 322 nm는 페놀성 화합물의 특징적인 흡수 peak를 나타내었다(Fig. 44).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)에서는 δ 7.27 (broad singlet), δ 6.78 (doublet, *J*=8.1Hz), δ 7.07 (d, 8.1)에서 1',3',4'-trisubstitued benzene ring에 기인하는 signal이, 또 δ 6.36과 7.47에서 *J* value 15.9 Hz의 doublet로 trans olefin proton signal이 관측되었고 δ 3.81에서는 phenolic methoxyl group, δ 9.55에서 phenolic hydroxy group이 각각 관찰되었다(Fig. 45). 이상과 같은 결과는 ¹³C-NMR spectrum(Fig. 46)에서 나타난 6개의 aromatic 탄소 signal과 2개의 olefin 탄소 signal, 그리고 한 개의 OCH₃탄소와 함께 이 화합물은 3',4'-disubstitued cinnamic acid로 추정할 수 있으며 OCH₃ 기의 위치는 Fig. 47에서 나타나는 바와 같이 HMBC spectrum을 측정하여 3' 위치에 결합함을 알 수 있었다. 이 화합물의 HMQC spectra(Fig. 48)에서 나타난 δ 115.49, 141.42, 111.14, 115.49, 122.76의 signal은 모두 C-2, C-3, C-2', C-5', C-6'의 탄소 peak로 결정하고, HMBC spectra를 보면 Fig. 47에서 나타난 바와 같이 H-2' 수소가 C-6', C-3, C-4'와 correlation하고 CH₃O- 수소는 C-3', H-5' 수소는 C-3', H-6' 수소는 C-4', C-3와 서로 correlation하는 것으로 Table 18과 같이 결정하였다. Compound의 COSY와 DEPT결과는 Fig. 49와 Fig. 50에 각각 나타내었다. 이상과 같은 결과로부터 compound는 CH₃O 및 OH로 치환되어있는 phenolic 화합물로 Mp 174°C, 분자식이 C₁₀H₁₀O₄, 분자량이 194.2인 4-Hydroxy-3-methoxy cinnamic acid (ferulic acid)로 동정할 수 있었다(Fig. 51).

Table 18. ^1H and ^{13}C NMR data of compound- I isolated from *A. tuberosum* in $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz for ^1H , 100 MHz for ^{13}C).

position	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^b$
1		167.99(s)
2	6.36(d, 15.9)	115.49(d)
3	7.47(d, 15.9)	144.42(d)
1'		
2'	7.27(brs)	125.76(s)
3'		111.14(d)
4'		147.89(s)
5'	6.78(d, 8.1)	149.03(s)
6'	7.07(d, 8.1)	115.49(d)
OMe	3.81	122.76(d)
OH	9.55	55.67(q)

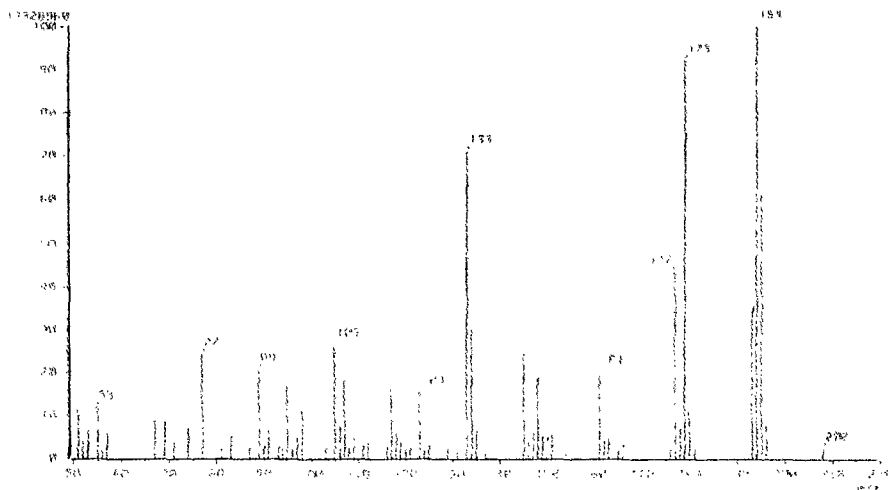


Fig. 42. EI-MS spectrum of compound- I isolated from *Buchu*.

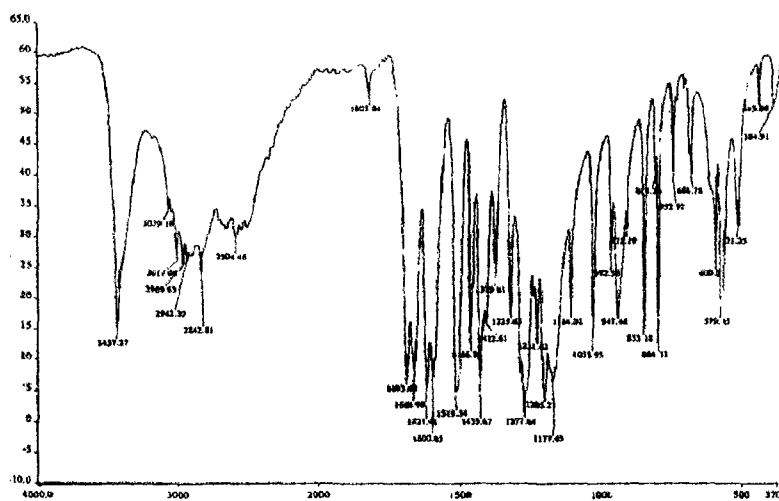


Fig. 43. IR spectrum of compound-I isolated from *Buchu*.

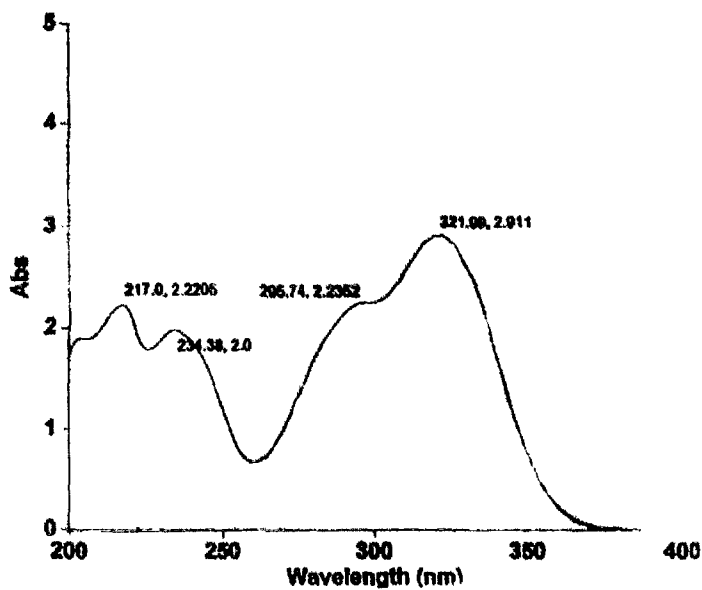


Fig. 44. UV spectrum of compound-I isolated from *Buchu*.

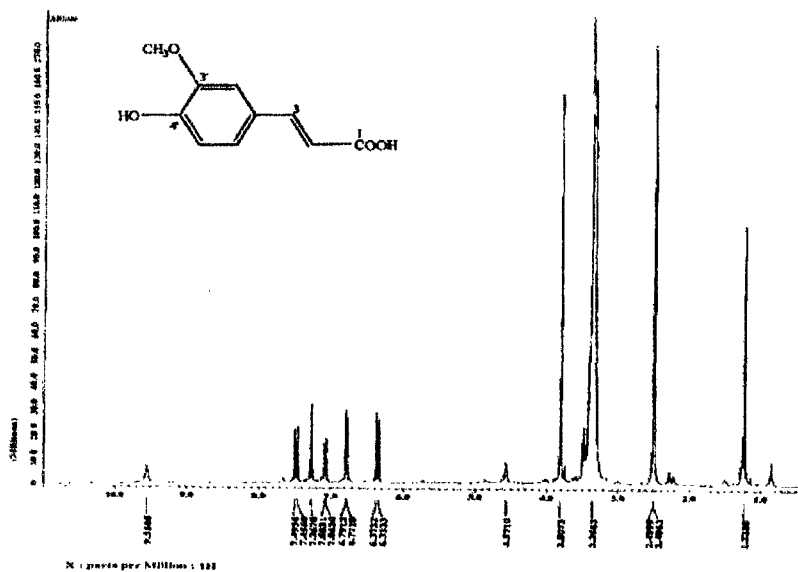


Fig. 45. ¹H-NMR spectrum of compound-I isolated from *Buchu*.

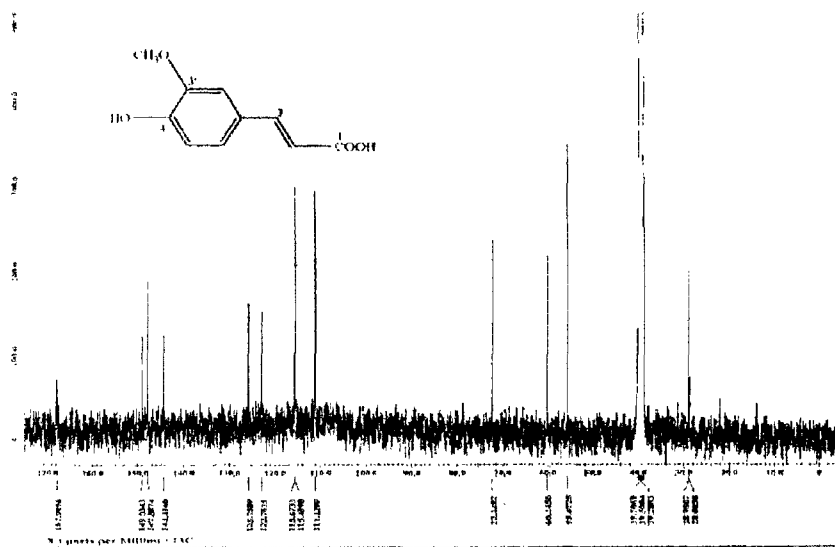
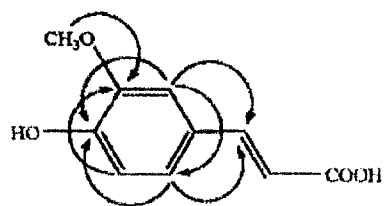


Fig. 46. ¹³C-NMR spectrum of compound-I isolated from *Buchu*.



HMBC →

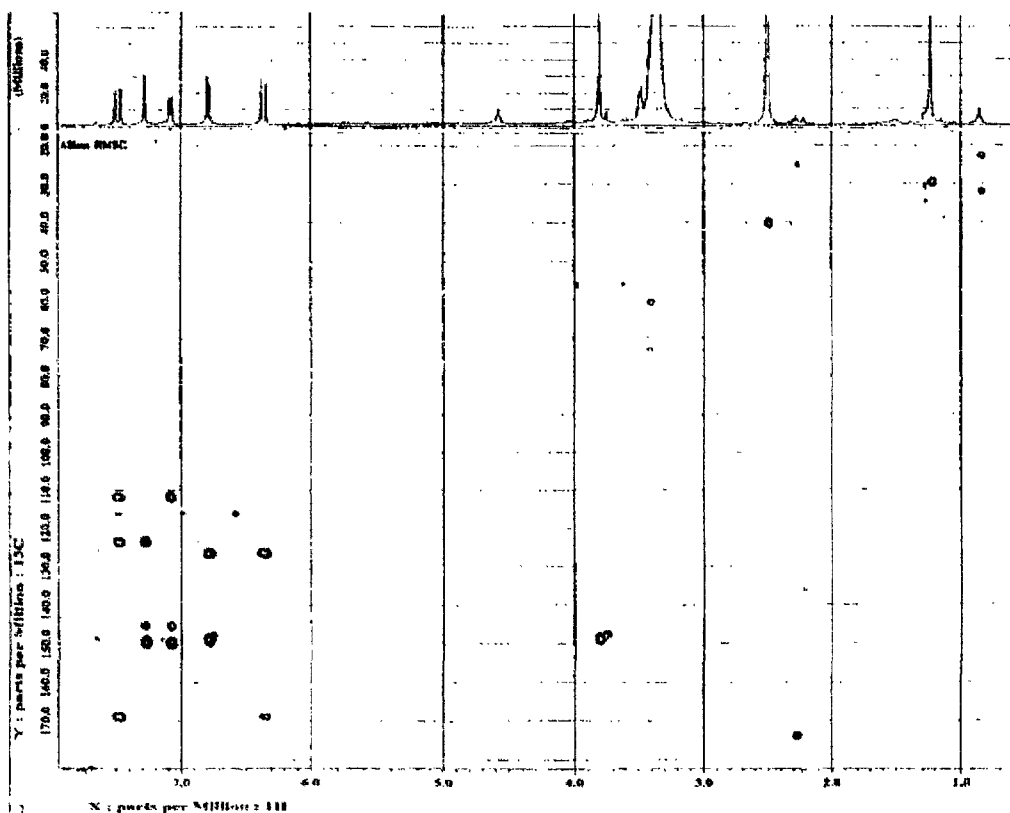


Fig. 47. HMBC spectrum of compound- I isolated from *Buchu*.

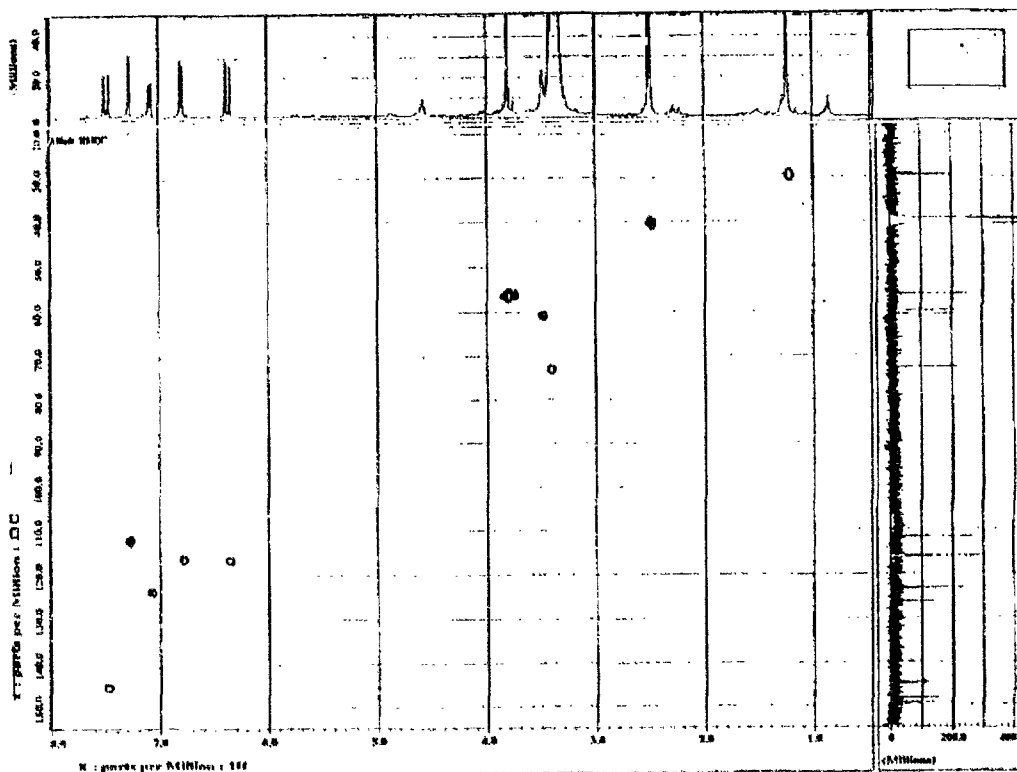


Fig. 48. HMQC spectrum of compound- I isolated from *Buchu*.

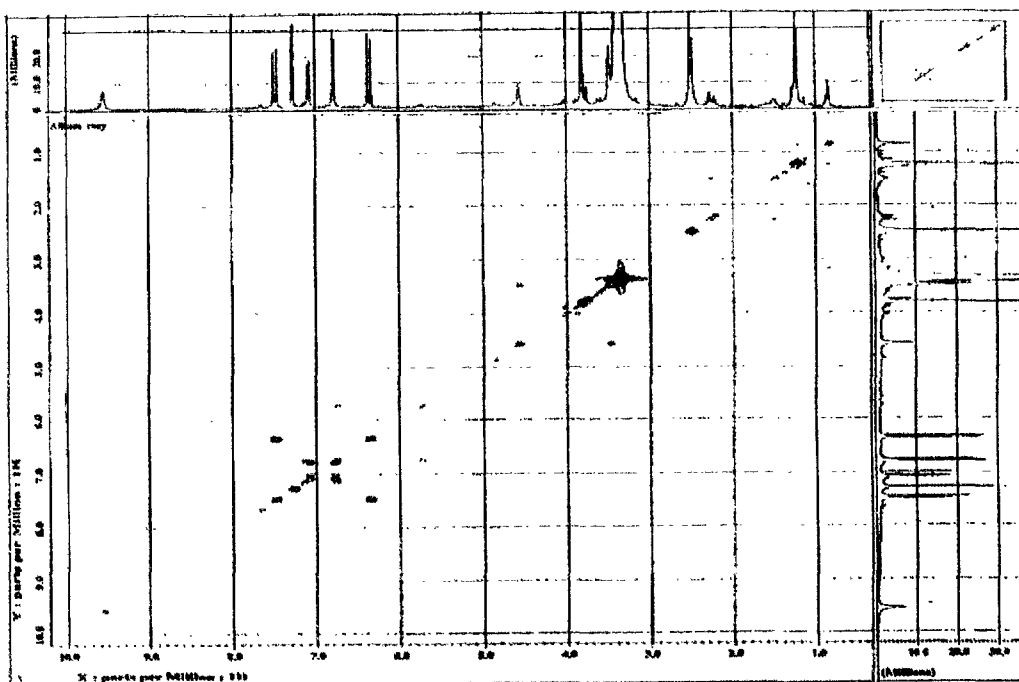


Fig. 49. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound-I isolated from *Buchu*.

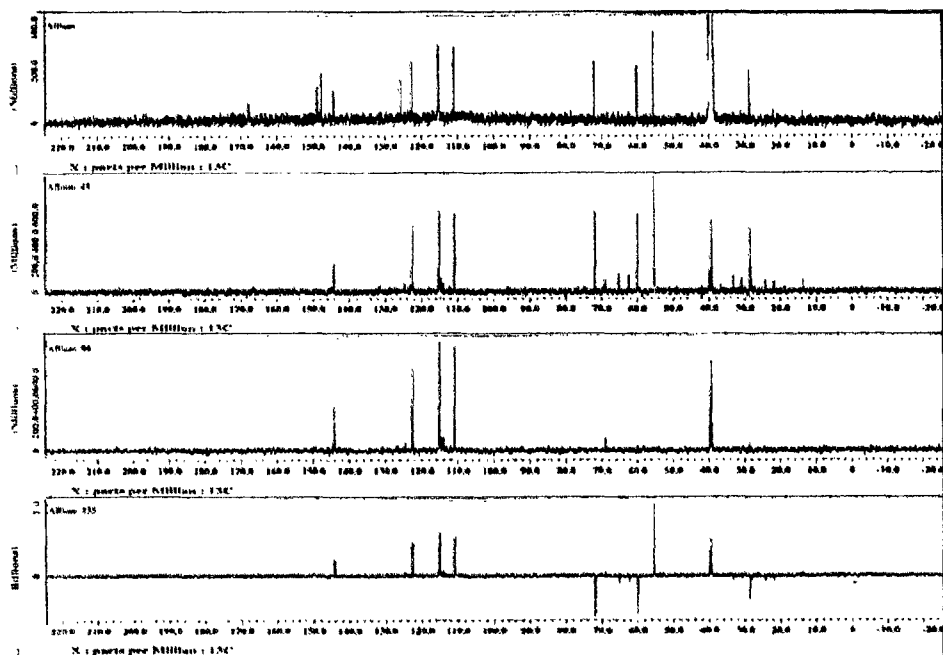


Fig. 50. DEPT spectrum of compound- I isolated from *Buchu*.

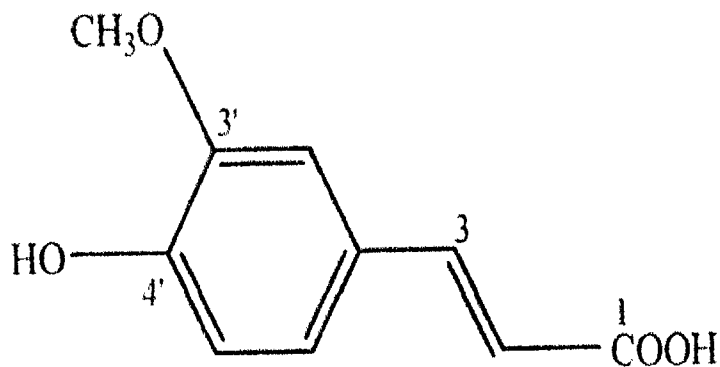


Fig. 51. Structure of compound- I , 4-Hydroxy-3-methoxy cinnamic acid, isolated from *Buchu*.

라. 분리, 동정된 compound의 LDL 산화 억제 효과

분리, 동정된 compound의 LDL 산화억제 효과는 TBARS로 측정하였다. 사람의 혈액으로부터 분리한 LDL에 분리된 compound, L-ascorbic acid, α -tocopherol, BHT를 농도별로 첨가하여 조사하였다. LDL의 산화는 모든 시료 첨가군에서 농도 의존적으로 억제 되었다(Fig. 52). 분리된 compound를 50 μ g/ml 첨가하였을 때 LDL 산화억제는 대조군에 비해 89% 저해되었으며, 동일농도로 합성 항산화제인 BHT는 대조군에 비해 65%저해되었다. 분리된compound와 BHT의 LDL 산화억제 정도를 비교해 보았을 때 산화억제 효과는 BHT에 비해 3.3배 이상 높아 강력한 항산화작용이 있음을 알 수 있었다.

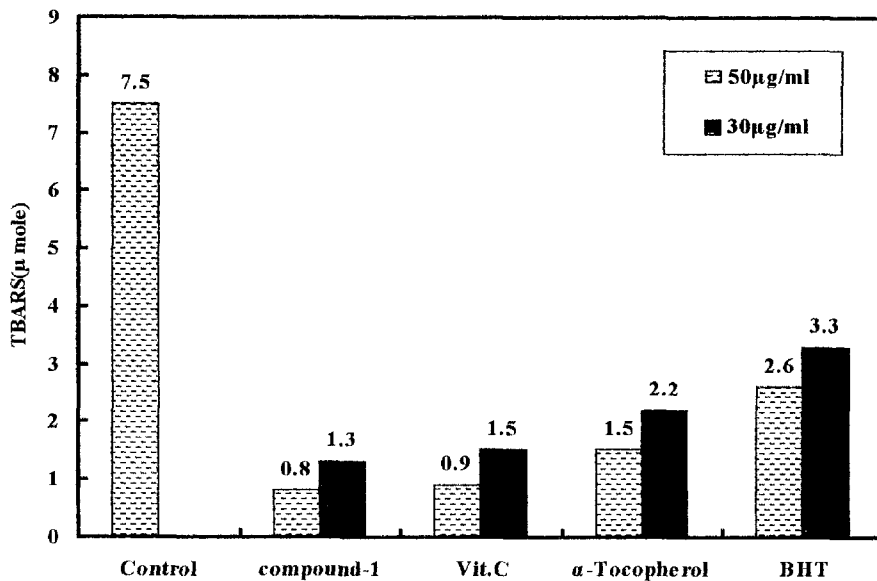


Fig. 52. Antioxidative effect of compound- I isolated from *Buchu*(leek) on LDL oxidation.

마. 부추 항동맥경화성 부추제품개발

1) 부추의 항혈전물질 분리공정

기초조사에 의한 용매분획을 대량생산용 파일럿 공정으로 스케일업하여 확인하였다. 동결건조부추시료 10kg을 100mesh 사이즈로 분쇄한 후 연속 추출하였다. 고형물량과 총 생리활성을 Table 19에 나타내었다.

Table 19. Solid yield and total biological activities

Fraction	Solid yield(%)	Relative activity(%)	
		TBARS	Conjugated Diene
Ethanol	100	100	100
Hexane	2.9	2.8	3.0
dichloromethane	61.3	25.3	37
Ethyl acetate	6.9	3.1	4.0
Butanol	2.7	2.9	2.9

이론적으로는 methanol 추출액을 dichloromethane으로 추출하면 순수한 항동맥경화 물질을 얻을 것으로 판단되나 잔류액에 고형분은 26.2%, 생리활성기준으로 TBARS 65.9%, conjugated diene 53.1%가 남게된다. 즉, 대량생산에서는 용매분획이 의미가 작다는 결론에 도달하였다. 따라서 동결건조부추를 ethanol로 추출하여 소재로 활용하는 것이 가장 경제적인 것으로 판단된다. 이때 동결건조부추 kg당 solid yield가 52g이었으며, TBARS 기준 생리활성은 건고물 1g 기준 0.22mole, 동결건조부추 kg 기준 11.3mole의 TBARS활성을 얻었다.

2) 부추의 항혈전물질 소재화

Ethanol 추출물을 증 지질성분은 공기와의 접촉과정 중 산화하여 품질을 떨어뜨릴 우려가 있으므로 먼저 동결건조 부추분말 10kg을 hexane으로 탈지한 후 잔사 중량비 10배의 cold ethanol을 가하여 추출하였다. 상세공정은 Fig 53과 같다.

3) 부추의 항혈전물질을 활용한 제품개발

동결건조부추분말과 용매추출 잔사를 부형제로 하여 Table 20과 같은 조성으로 소재를 만들어 500mg capsule에 담아 제품화하였다. 캡슐 1개당 생리활성은 220 μ mole TBARS였다. (Fig 54)

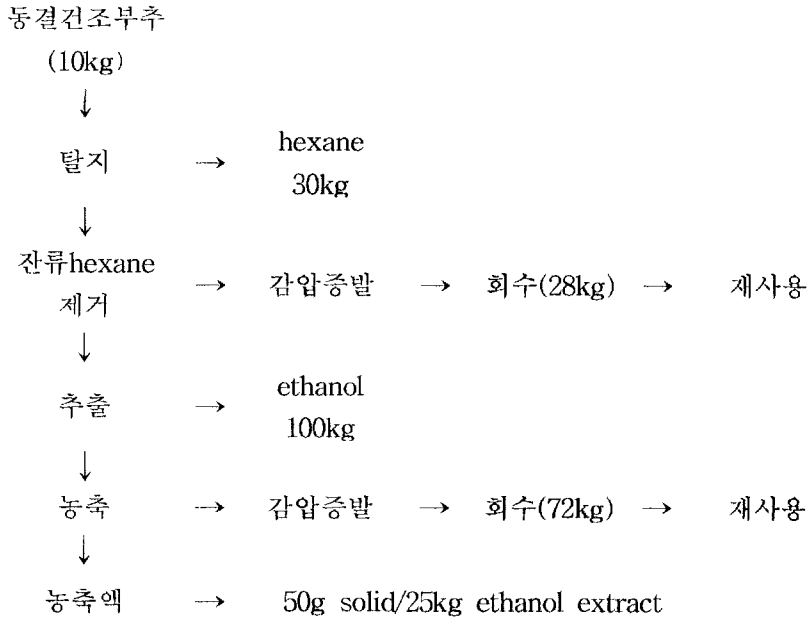


Fig 53. Process flow chart for the preparation of anticlotting active substance from Korean *Buchu*.

Table 20. Composition of capsule with anticlotting substance from Korean *Buchu*.

Material	g/kg	Remark
Freeze dried Korean leek powder	450	
Residue from solvent extraction	400	
Concentrate of anticlotting substance	1000	2gsolid/kg conc.
Vitamin C	20	
Whey calcium(Ca 28%)	30	
Vitamin A	2.0	
Vitamin B ₁ (HCl)	2.0	
Vitamin B ₂	0.3	
Vitamin B ₆	1.5	
Wheat starch	1.0	
	91.2	



Fig 54. Capsule for the anticlotting substance from Korean *Buchu*.

제 4 절 결론

부추의 항균물질은 분자량 5,000이하의 저분자 물질이라 추정되며 chloroform 분획물에서 22~40mm까지의 inhibition zone이 형성되어 가장 큰 항균활성을 보였다. 또한 chloroform 분획으로 TLC를 하여 UV 254nm를 조사한 결과 8개 영역 중 6번 영역에서 Clear zone이 27.5mm로 가장 큰 항균활성을 보였다.

부추 항균물질을 코팅한 polyethylene film의 항균성을 측정한 결과 부추 항균물질을 코팅한 polyethylene film으로 포장된 어묵의 생균수(7일째, 4.5×10^4 CFU/g)가 polyethylene film으로 포장된 어묵의 생균수(7일째, 8.9×10^5 CFU/g)보다 현저히 감소함을 알 수 있었다. 그러나 부추를 추출·코팅시 경제적 시간적 손실이 따르므로 포장 어묵 원가의 상승을 유발하며 경제성에 문제가 있을 것으로 판단된다.

부추의 장내균총 개선효과 탐색으로 부추즙을 첨가하였을 때 *Bifidobacterium adolescentis*와 *Clostridium butyricum*에 대한 생육 증진효과가 가장 컸으며, 동결 건조한 부추 분말의 섬유질부분(50%)과 분무 건조한 부추 분말 기능성(50%)으로 만든 부추 캡슐을 섭취한 결과 섭취 전·후 정상인과 변비환자 분변 속의 *Bifidobacterium*속이 정상인 변비환자 모두에게서 섭취 후의 증가를 가져왔다.

*In vitro*에서 부추 용매별 추출물의 LDL 산화억제능을 알아보기 위해 TBARS와

conjugated dienes의 단위 시간당 생성 감소량을 측정한 결과 대조군에 비해 dichloromethane층과 ethyl acetate층이 LDL 산화를 효과적으로 억제하였다. 이처럼 ethyl acetate 층의 LDL 산화억제능이 높은 것은 부추속에 존재하는 페놀성 물질에 기인하는 것으로 사료되며 혈전용해능에 미치는 영향을 fibrin tube 법으로 측정한 결과 dichloromethane층과 ethyl acetate층에서 모두 0.244unit로 혈전용해능이 가장 높게 나타났다. 혈소판 응집에 미치는 영향을 측정한 결과 대조군에 비해 모든 층에서 혈소판 응집 억제 효과가 나타났으며, 특히 hexane층과 ethyl acetate층이 가장 효과가 컸다. 콜레스테롤 합성 율속 효소에 부추 용매별 추출물이 미치는 영향은 대조군에 ethyl acetate층이 15.79% 정도 감소하여 활성 저해 효과가 가장 높았다.

부추 추출물의 장기간 섭취는 당뇨쥐의 항산화 효소계를 활성화시켜 LDL 산화를 억제하고 지질 과산화를 억제하는 등 당뇨쥐의 oxidative stress를 감소시켜 만성질환을 예방하는 효과가 있다고 사료된다. 또 부추 속에는 LDL 산화억제 효과를 나타내는 물질로 분리, 동정된 phenolic acid인 4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid(ferulic acid)뿐만 아니라, 강력한 항산화제인 kaempferol, quercetin 등이 함유되어 있어 이들이 당뇨쥐의 지질 과산화억제에 영향을 미친 것으로 사료된다. 따라서 *Allium*속의 부추는 당뇨성 동맥경화 예방 및 치료를 위한 dietary food 혹은 medical food로 사용될 가능성을 제시하였다.

부추의 항혈전물질 분리는 동결건조부추를 methanol로 추출한 후 dichloromethane으로 추출하는 것이 가장 순수한 항동맥경화물질을 얻을 것으로 판단되나 ethanol로 추출하여 소재로 활용하는 것이 경제적인 것으로 판단된다. 부추의 항혈전물질을 활용한 제품개발을 위해 동결건조부추분말과 용매추출 잔사를 부형제로하여 소재를 만들어 500mg capsule에 담아 제품화 하였다.

참고문헌

1. 이병완, 신동화 : 식품 부패미생물 증식을 억제하는 천연 항균성물질의 검색, 한국식품과학회지, **23**, 200~204(1991)
2. 신동화 : 천연 항균성 물질의 연구현황과 식품가공에의 이용, 식품과학과 산업, **23**, 68~73(1990)

3. 박옥연, 장동선, 조학래: 한약재 추출물의 항균효과 검색. *한국영양식량학회지*, **21**, 91~96(1992)
4. 정동욱, 정지흔 : 영지의 항균성 물질에 관한 연구, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **24**, 552~557(1992)
5. 조순영, 유병진, 장미화 : 수산 미이용자원 중에 존재하는 항균성 물질의 검색, *한국식품과학회지*, **26**, 261~265(1994)
6. Sheppard J. D., Jumarie, C. and Cooper, D. G.: Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1064**:13~23(1991)
7. Zuber, P., Nakano, M, and Marahiel. M. A.: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington. D.C. Peptide antibiotics of bacilli and other gram-positive bacteria, 897~916(1993)
8. Cummings, J.H. and Macfarlane, G.T.: The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. App. Bacteriol.*, **70**, 443(1991)
9. Mitsuoka, T.: Taxonomy and ecology of Bifidobacteria. *Bifidobact. Microbiol.*, **3**, 11(1984)
10. Shsnhai Science and Technological Publisher : "The Dictionary of Chinese Drugs"(Zhong Yao Da Ci Dion), Vol 1, Shougakukan, Tokyo, p.449(1985)
11. Okuyama, T., shbata, S., Hoson, M., Kawaca, T., Osada, H. and Noguchi, T. : Effect of oriental plant drugs on platelet aggregation : III. Effect of Chinese drug "Xiebai" on himan platelet aggregation. *Planta Medica*, **52**, 171(1986)
12. 장지연 : 건강 음식으로서의 김치의 효능. *김치의 과학과 산업*, **2**, 68(1993)
13. Zhao, G., Hui, Y., Rupprecht, J.K. and Mclaughlin, J.L. : Additional bioactive compounds and trilobacin, a novel highly cytotoxic acetogenin from the bark of *Asimira trioba*. *J. Nat. Prod.*, **55**, 347(1992)
14. Kim, S.J. and Park, K.H. : Retardation of Kimchi fermentation by the extracts of *Allium tuberosum* and growth inhibition of related microorganisms. *J. Korean. Sci. Technol.*, **27**, 813(1995)
15. Shsnhai Science and Technological Publisher : "The Dictionary of Chinese

- Drugs”(Zhong Yao Da Ci Dion), Vol 1, Shougakukan, Tokyo, p.449(1985)
16. Okuyama, T., shbata, S., Hoson, M., Kawaca, T., Osada, H. and Noguchi, T. : Effect of oriental plant drugs on platelet aggregation: III. Effect of Chinese drug “Xiebai” on himan platelet aggregation. *Planta Medica*, 52, 171(1986)
 17. 장지연 : 건강 음식으로서의 김치의 효능. *김치의 과학과 산업*, 2, 68(1993)
 18. Zhao, G., Hui, Y., Rupprecht, J.K. and Mclaughlin, J.L. : Additional bioactive compounds and trilobacin, a novel highly cytotoxic acetogenin from the bark of *Asimira trioba*. *J. Nat. Prod.*, 55, 347(1992)
 19. Kim, S.J. and Park, K.H. : Retardation of Kimchi fermentation by the extracts of *Allium tuberosum* and growth inhibition of related microorganisms. *J. Korean, Sci. Technol.*, 27, 813(1995)
 20. Ziliversmit, D.B. : Atherogenesis : A postprandial phenomenon. *Circulation* 60, 473(1979)
 21. Yang, P.E. and Pratt, D.E. : Antithiamine activity of polyphenolic antioxidants. *J. Food Sci.*, 49, 489(1984)
 22. Branen, A.L. : Toxicology and biochemistry of butylated hydrocyanisole and butylated hydrowytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 63(1975)

제 3 장 부추의 항당뇨효과 탐색 및 항당뇨 성분을 이용한 기능성 부추제품의 개발

제 1 절 서설

부추는 마늘과 같은 *Allium*계 식물로서, 그 독특한 냄새는 유기 황화합물인 황화아릴이 주체이며 항산화 영양소로 알려져 있는 클로로필, 베타 카로틴, 비타민 C 등의 함량이 높다. 현재 우리나라는 당뇨병의 유병율이 약 5-10%에 달하며, 그 유병율이 지속적으로 증가하는 경향을 보이고 있다. 이는 급속한 경제발전에 수반되는 환경적 요인이 크게 작용했을 것이라고 생각되며, 앞으로 당뇨병이 국가적으로 심각한 건강장에 질환이 될 것으로 예상된다. 산화적 스트레스는 당뇨병의 발생과 관련이 깊으며, 여러 가지 당뇨 합병증의 주요 요인이 된다. 생체는 활성산소종으로부터 스스로를 보호하기 위해, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px), catalase 등의 효소적 항산화계와, 비타민 C, 토코페롤, 셀레늄 등의 비효소적 항산화계를 가지고 있다. 당뇨병과 같은 비정상적인 상황에서는 지질과산화가 더욱 증가하므로, 지질과산화물의 생성을 줄이기 위하여 더 많은 효소적 및 비효소적 항산화계가 필요하다. 따라서 부추에 존재하는 천연항산화 물질들은 당뇨 합병증의 예방에 도움이 되리라 기대된다. 또한 부추는 건조중량 기준으로 35% 정도의 식이섬유질을 함유하고 있어 혈당조절 효과를 기대할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 동물모델에 있어서 부추의 항당뇨효과 및 항산화효과를 규명하고, 건강증진용 기능성 부추제품을 개발하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 부추의 항당뇨효과 규명

가. 당뇨쥐에 있어서 부추분말의 섭취가 혈당 조절에 미치는 영향

1) 실험동물 및 식이

평균체중 320g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐에게 Streptozotocin(Sigma Co., 50mg/kg BW)을 대퇴부 근육에 1회 주사함으로써 당뇨를 유발시켰다. Streptozotocin은 0.1M citrate buffer(pH 4.5)에 용해시켜 사용하였다. 당뇨 유발의 확인은 투여

2일 후 공복상태에서 꼬리정맥으로부터 채혈하여 간이혈당계로 혈당치를 측정하여 200mg/dl 이상인 경우 당뇨병이 유발된 것으로 간주하였다.

당뇨쥐를 평균혈당이 같게 2군으로 나누어 basal diet 또는 10% 부추 함유식이료(Table 1) *ad libitum*으로 14주간 섭취시켰다. 두 식이의 탄수화물, 단백질, 지방, 식이섬유, 회분의 함량을 동량이 되게 하였고, 복합당과 단순당의 섭취 비율도 동일하도록 하였다. 원료부추는 김해 대동산 7벌 부추를 수세 후, 동결건조하여 분말로 사용하였다. 부추의 수분, 조단백, 조지방, 조회분, 식이섬유, 탄수화물의 함량을 Table 2에 나타내었다. 수분은 상압가열건조법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조단백질은 Kjeldahl법, 조회분은 회화법, 식이섬유는 Prosky에 의해 개발 수정된 AOAC법으로 측정하였다. 동결건조한 부추는 34.21%의 식이섬유를 함유하고 있어 좋은 식이섬유 급원임을 알 수 있었다. 부추의 다량 무기질 및 미량원소 함량을 atomic absorption법으로 분석하여, 부추식이에 포함된 각 무기질 함량이 basal diet와 동일하도록 부족한 무기질은 보충하였다.

Table 1. Composition of basal diet and *Buchu*-containing diet.

Ingredients	Control diet	<i>Buchu</i> diet
<i>Buchu</i> ¹⁾	-	10.00
Casein	20.00	19.50
Corn starch	50.00	50.00
Sucrose	11.20	7.07
Corn oil	10.00	9.70
D,L-methionine	0.30	0.30
Mineral mixture ²⁾	3.50	2.43
Vitamin mixture ³⁾	1.00	1.00
Choline bitartrate	0.20	0.20
Cellulose	3.30	-
Cholesterol	0.50	0.50

¹⁾ Freeze-dried *Buchu*

²⁾ AIN-76 mineral mixture

³⁾ AIN-76 vitamin mixture

Table 2. Proximate composition of casein and *Buchu*(%).

	수분	조단백	조지방	조회분	Total dietary Fiber	당질
Casein	7.5	87.75	0.5	0.90	0	3.35
<i>Buchu</i>	6.70	4.46	4.55	14.25	34.21	35.83

2) 포도당 부하검사

동물을 13주간 사육한 후 포도당 부하검사를 실시하였다. 검사 전날, 당노위를 overnight-fasting 시켰다. 다음날 공복시 혈액을 꼬리에서 채취한 후, 포도당 용액 (1g/kg BW)을 gastric tubing으로 공급하고, 30, 60, 90, 120, 180분에 혈액을 채취하여 glucometer (Acutrend, 녹십자)를 사용하여 혈당을 측정하였다. 실험의 분석결과는 Mean±SD로 표시하였으며, 각 식이군간의 유의성은 t-test로 검정하였다($\alpha = 0.05$).

3) 당화 헤모글로빈 측정 및 혈당, 혈당조절호르몬 농도 측정

식이섭취 14주째 실험동물을 dry ice를 이용하여 마취시키고 EDTA를 가한 주사기를 이용하여 심장에서 채혈한 후, 당화헤모글로빈의 농도를 크로마토그래피법으로 측정하였다. 혈장 중의 포도당 함량은 효소법으로 측정하였다. 인슐린 농도 측정은 radioimmunoassay(RIA)법으로 측정하였다. 혈장에 ^{125}I -insulin과 rat insulin antibody (Linco Research Inc., USA)를 첨가한 후 24시간동안 4°C에서 incubation 시켰다. 24시간 후 cold precipitating reagent를 첨가하고 20분간 4°C에서 incubation시킨 후 2,000~3,000×g로 20분간 원심분리하여 침전물의 radioactivity를 gamma counter (COBRA, Wallac)로 측정하였다. 혈장의 glucagon 농도 측정은 radioimmunoassay법으로 실시하였다.

나. SHR에 있어서 장기간의 부추 섭취가 혈당에 미치는 영향

체중 100g의 암컷 SHR(spontaneous hypertension rat)을 한국화학연구소에서 구입하여 pellet diet를 먹이면서 2주간 환경에 적응시킨 후 난괴법에 의해 평균체중이 유사하도록 대조군($150 \pm 15.3\text{g}$)과 부추 섭취군($153 \pm 15.3\text{g}$)으로 나누었다($n=13$). 부추는 동결건조 분말로 만들어 식이에 10% 수준으로 첨가하였다. SHR은 실험동물 사

육실에서 해당식이와 물을 *ad libitum*으로 공급하면서 7주간 사육하였다. 7주간 해당식을 섭취시킨 후, 3일간 식이를 낮 동안만 공급하는 train feeding을 실시하였다. 실험 전날, 대조군과 부추섭취군에게 해당 식이를(대조식이 및 부추 함유 식이) 낮 동안만 공급한 후 overnight-fasting 시켰다. 실험 당일, overnight-fasting 한 쥐의 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 공복시 혈당치를 측정하였다. 대조군에게 basal diet, 부추 섭취군에게 부추 함유식이를 4g 섭취시킨 후, 식후 30-210분에 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당치를 측정하였다.

다. 부추 섭취가 식이의 상부소화관 내 이동속도에 미치는 영향

생후 7주된 흰쥐 12마리에게 basal diet를 2주간 *ad libitum*으로 섭취시킨 후, 4일간 식이를 낮 동안만 공급하는 train feeding을 실시하였다. 실험 당일 overnight-fasting한 쥐에게 basal diet 또는 10% 부추 함유식이 2g을 섭취시킨 후 10 μ Ci의 ⁵¹Cr₂O₃을 섭취시키고 식이를 2g 더 섭취시켰다. ⁵¹Cr dose를 섭취한 30분 후 동물을 희생시켜, 위, 소장, 맹장, 대장을 각각 수집하고, γ -counter를 사용하여 radioactivity를 측정하였다.

라. 부추가 탄수화물 소화효소 저해활성 및 인슐린 리셉터에 미치는 영향 조사

1) 시험용 추출물의 제조

부추시료는 6개 지역(김해, 대구, 영광, 여주, 포항, 하남)에서 99년도에 생산된 것을 사용하였다. 시험용 부추는 수세, 동결건조를 거쳐 분말화하고, 건조분말 1g당 20ml의 물 또는 메탄올을 사용하여 20°C에서 24시간 추출하여 실험에 사용하였다.

2) 부추 추출물의 alpha-glucosidase 저해활성

시료의 alpha-glucosidase저해활성은 Watanabe등의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 50ul alpha-glucosidase(Sigma, St Louis, MO, USA; 0.7U/ml)와 시료추출물 10ul를 96-well plate의 well에 넣고 microplate reader(Model 550, Biorad, Hercules, CA, USA)에서 ABS₄₀₅를 측정하였다. 5분후에 기질용액 (5mM para-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside in 0.1M phosphate buffer, pH7.0) 50ul를 첨가하고 실온에서 5분간 반응시킨후 ABS₄₀₅를 측정하여 흡광도 변화로부터 효소저해활성을 계산하였다.

3) 부추추출물의 alpha-amylase 저해활성

시료의 alpha-amylase 저해활성은 효소로서 porcine pancreatic alpha-amylase (Sigma, St. Louis, MO, USA; 100U/ml)와 기질로서 para-nitrophenyl-alpha-maltoheptaoside(Megazyme, Ireland)를 사용하여 측정하였다.

4) Insulin-binding assay를 위한 시료제조

추출/분획한 시료와 함께 배양한 Human fibroblast cells (CCD986SK, $0.5-2 \times 10^6$)를 PBS로 수세하고, 침전시킨 후 세포용해시약(1ml 50mM HEPES (pH7.5), 1mM PMSF, 0.5mg/ml bacitracin, 1% Triton-X 100)를 첨가하여 4°C에서 60분간 교반/혼합하였다. 4°C 10,000g에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 취하여 분석에 사용하였다.

5) Insulin-binding assay

CCD986SK(human fibroblast)세포를 1×10^4 cells /ml 농도로 plate에 분주하고 세포가 착상을 하면 즉시 부추추출물을 0.5mg/ml가 되도록 첨가하고, 시료추출물을 첨가하지 않은 대조군 세포가 confluency에 도달하면 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 씻고, 1ml의 PBS를 가하여 rubber policeman으로 세포를 수집한 다음, 원심분리하여 상등액을 제거하고 세포에 1mM PMSF, 0.5mg/ml bacitracin, 1% Triton X-100 함유하는 50mM Tris buffer(pH7.5) 1ml를 가하고 4°C에서 60분간 교동하면서 반응시켰다. 반응액을 10,000Xg에서 10분간 원심분리하고, insulin 수용체를 함유하는 상층액을 수집하여 insulin binding assay에 사용하였다. 100ul 상층액에 400ul의 0.1mM PMSF, 0.1% Triton X-100, 0.1% BSA, (\pm unlabeled human insulin, 20ug/ml) 그리고 0.01nM - 100nM의 cold insulin을 함유하는 50mM Tris-HCl buffer(pH7.4)를 가하고, 125 I-labeled human insulin(20,000cpm, 0.2ng)을 넣어 4°C에서 16시간 반응시켰다. 0.1ml 0.4% gamma-globulin과 0.5ml 25% PEG 6000을 가하고 1500Xg에서 20분간(4°C) 원심분리 하였다. 상청액을 제거하고 pellet을 gamma-counter에서 방사능을 측정하였다. Scatchard plot를 작성하고 receptors 수와 affinity를 평가하였다. 이때 nonradioactive insulin(20ug/ml) 존재 하에서 침전되는 방사능을 nonspecific binding으로 간주하였다.

마. 부추 용매획분의 항당뇨 효과

1) 당뇨쥐에 있어서 부추추출물의 섭취가 혈당조절에 미치는 영향

동결건조한 부추의 methanol 추출물을 제조한 후, hexane, ethyl acetate, butanol, water 순으로 계통 분획하여 감압 농축하였다. 용매획분의 alpha-glucosidase 저해활성을 측정하여, 저해활성이 가장 큰 ethyl acetate획분을 감압농축한 후 동결건조하였다. Streptozotocin으로 당뇨를 유발한 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐(평균체중 360g)와 정상쥐를 각각 2그룹으로 나누어 basal diet 또는 ethyl acetate 분획물을 0.64% 수준으로 첨가한 식이를 8주간 섭취시켰다. 식이 섭취 7주째 oral glucose tolerance test를 실시하였고, 식이섭취 8주째 동물을 희생하여 당화헤모글로빈과 fructosamine 농도를 측정하였다.

2) Carbohydrate load test

정상쥐 및 당뇨쥐에게 carbohydrate loading test를 실시하여 부추 ethyl acetate 획분의 식후 혈당 증가 억제능을 조사하였다. 평균 몸무게 151g인 정상쥐 및 평균 몸무게 354g인 streptozotocin 유발 당뇨쥐를 12시간 절식시킨 후, 2g/kg의 maltose 를 함유하는 1% tween 용액 또는 2g/kg의 maltose 및 400mg/kg의 부추 ethyl acetate 획분을 함유하는 1% tween 용액을 투여하고, 0-240분에 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 식후 혈당 변화를 조사하였다.

2. 부추의 항산화효과 측정

가. 용매별 추출물의 in vitro 항산화 효과 측정

1) 부추의 용매별 추출

동결 건조한 부추를 마쇄한 후 용매의 극성을 이용하여 각 용매별 추출물을 제조하였다. 동결건조 부추를 methanol로 추출한 후 여과하여 rotary vacuum evaporator(BUCHI Laboratoriums Technik AG, Germany)로 감압 농축하였다. hexane:methanol:distilled water(10:1:9, v/v/v)로 분획하여 hexane 추출물을 얻은 후, dichloromethane, ethyl acetate, butanol, water의 순으로 계통 분획하여 감압 농축하였다.

2) 용매별 추출물의 항산화 효과 측정

가) 과산화물가의 측정

용매별 추출물의 항산화 효과는 Hayase와 Kato의 방법에 따라 linoleic acid에 대한 과산화물가로 측정하였다. Linoleic acid 1.0g을 ethanol에 용해시켜 0.2M phosphate buffer(pH 7.0) 25ml을 가하고 각각의 용매별 추출물을 그 용해성에 따라

ethanol 또는 phosphate buffer에 0.05%로 용해시켜 첨가하여 shaking incubator에 넣고 50°C에서 20일간 incubation시키면서 경시적으로 POV를 측정하였다. Incubator에서 반응시킨 후, 분액 여두에 옮겨 증류수(5.0ml)와 NaCl(2.0g)을 가한 후 chloroform 25ml을 가해 흔들어서 분리시켜 두고 하층을 삼각 플라스크에 모으고, Acetic acid 25ml과 포화 KI용액 1ml을 가해 1분간 흔들고 암소에 10분간 방치시켜 두었다. 여기에 50ml의 증류수를 가하고 1% 전분용액을 지시약으로 하여 0.01N Na₂S₂O₃로 적정하였다. 계산식은 다음과 같다.

$$POV(\text{meq/kg}) = S \times N \times 10 / \text{linoleic acid의 중량}(g)$$

S : 0.01N Na₂S₂O₃의 소비량(ml)

N : 0.01N Na₂S₂O₃의 규정농도

나) DPPH에 의한 free radical scavenging 효과의 측정

부추의 각 용매별 추출물의 free radical scavenging 효과는 Blois에 의한 방법에 따라 측정하였다. 즉, DPPH(α, α' -diphenyl- β -picryl-hydrazyl) 16mg을 100ml의 ethanol에 녹인 후 100ml의 증류수를 혼합하여 여과지로 여과한 후, 이 여액 2.5ml에 일정농도의 시료용액 0.5ml을 혼합한 후 528nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다.

나. 용매별 추출물의 항산화물질 함량 측정

용매별 추출물의 total phenol 함량은 Hammerschmidt와 Pratt의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 용매별 추출물 0.01g을 용해성에 따라 methanol과 증류수 2.0ml에 녹여 시료를 제조하였고 시료액의 0.1ml과 2% Na₂CO₃ 용액 2.0ml을 혼합하였다. 2분 후 50% Folin-Ciocalteu reagent 0.1ml을 가하여 실온에서 30분간 방치시킨 후 750nm에서 흡광도를 측정하였고 chlorogenic acid로 표준곡선을 만들어 total phenol 함량을 구하였다.

다. 당뇨쥐에 있어서 부추 식이 및 용매분획물의 산화억제 효과 탐색

1) 실험동물 및 식이

평균체중 320g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐에게 streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 후 basal diet 또는 10% 부추 분말 함유 식이를 14주 동안 제공하였다. 또 다른 실험에서 평균체중 360g의 streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 쥐와 정상쥐에게

른 실험에서 평균체중 360g의 streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 쥐와 정상쥐에게 basal diet 또는 부추 디글로로메탄 및 에틸아세테이트 획분 첨가 식이(0.64%)를 8 주 동안 제공하였다. 사육기간이 끝난 동물은 14시간 절식 후 희생시켜 간, 심장 및 피부조직을 수집하였다.

2) 간과 피부조직의 산화 정도 측정

가) 지질과산화의 측정

지질과산화의 측정은 Ohkawa 등의 방법을 이용하여 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 malondialdehyde(MDA)의 함량으로 측정하였다. 일정량의 간 조직을 조직의 9배의 1.15% KCl 용액과 함께 homogenizer를 이용하여 균질화시켜 시료로 이용하였고 피부조직의 경우, 균질화시킨 후 800×g에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 시료로 이용하였다. 준비한 시료 0.2ml와 8.1% SDS 0.2ml, 50% NaOH를 이용하여 pH 3.5로 보정한 20% acetic acid 1.5ml과 0.8% TBA 1.5ml를 cap test tube에 넣고 4.0ml이 되도록 증류수를 첨가하여 혼합하였다. 이 혼합용액을 water bath에서 95℃로 60분간 반응시킨 후, 찬물에서 식히고 증류수 1.0ml와 n-butanol:pyridine(15:1, v/v) 5.0ml을 넣고 vortex하였다. 4,000rpm에서 10분간 원심분리를 하여 분리된 유기 용매층을 취해 spectrophotometer를 이용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로는 1,1,3,3-tetramethoxy propane(TMP)를 사용하였으며 측정된 흡광도 값을 표준곡선에 대입하여 malondialdehyde(MDA)의 양으로 환산하였다.

나) 단백질 산화의 측정

단백질의 carbonyl 함량은 DNPH(2,4-dinitrophenyl hydrazine)를 이용한 Oliver 등의 방법에 준하여 측정하였다. 조직을 1.15% KCl을 이용하여 균질화시킨 후 800×g에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 Lowry 등의 방법으로 단백질 함량을 측정하였다. 1.0mg의 단백질을 함유하는 시료의 양을 계산하여 2개의 원추형 원심분리관에 넣었다. 여기에 시료와 동량의 20% trichloroacetic acid(TCA)를 가해 원심 분리(4000×g, 3min)하여 단백질을 침전시키고, 다시 10%의 TCA를 첨가하여 한번 더 원심 분리시켰다. 하나의 tube(blank용)에는 2N HCl을 가하고 다른 하나의 tube(test 용)에는 2,4-DNPH reagent를 가해 25℃에서 1시간 방치하여 반응을 일으켰다. 20% TCA로 반응을 정지시키고 ethanol:ethylacetate(1:1, v/v)의 혼합액으로 세척한 후, 20mM sodium phosphate buffer(pH 6.5)에 녹인 6M guanidine-HCl 용액을 가하여 침전된 단백질을 용해시켜 370nm에서 흡광도를 재어 그 차이를 구하였다.

다) 간과 피부조직에서 항산화 효소계의 활성 측정

(1) superoxide dismutase(SOD)활성의 측정

간조직의 SOD(superoxide dismutase)활성은 Marklund와 Marklund 등의 방법을 이용하여 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색으로 측정되었다. 1.1mM diethylene triamino-pentaacetic acid(DTPA)와 55.6mM Trizma base를 혼합한 후, cacodylic acid를 사용하여 pH 8.2로 보정한 buffer 6.0ml을 간 조직 0.1g과 함께 homogenation으로 균질화한 후 3,000rpm에서 2분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 시료로서 사용하였다. Buffer 2.95ml에 시료 0.05ml을 혼합한 용액 2.7ml을 취하고 10mM HCl에 용해되어 있는 6mM pyrogallol(25°C) 0.3ml을 가하여 420nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조실험은 buffer 2.7ml에 6mM pyrogallol 0.3ml을 가하여 같은 방법으로 측정하였다. SOD 1unit는 1분 동안 pyrogallol의 자동산화를 50%까지 억제하는데 요구되는 효소의 양으로 하였다.

피부조직에서의 SOD 활성은 McCord와 Fridovich가 개발한 방법을 이용하여 xanthine oxidase에 의해 생성된 superoxide anion($O_2^{\cdot -}$)에 의한 cytochrome C 환원을 저해하는 SOD 양으로 측정하였다. 반응액은 0.05M potassium phosphate buffer(pH 7.8), 1×10^{-4} M EDTA, 1×10^{-5} M ferricytochrome C, 5×10^{-5} M xanthine, 8×10^{-9} M xanthine oxidase와 반응액을 혼합하여 총 volume이 3.0ml이 되게 하고 spectrophotometer를 이용하여 550nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다. SOD 1unit는 cytochrome C 환원율을 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다.

(2) Catalase 활성 측정

Aebi의 방법에 의해 50mM Na-K phosphate buffer(pH 7.0)와 triton X-100을 이용하여 조직을 마쇄한 후 시료로 사용하였다. 기질로 30mM H_2O_2 용액을 이용하여 시료액과 혼합한 후 240nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조실험으로는 기질인 30mM H_2O_2 용액 대신에 50mM Na-K phosphate buffer(pH 7.0)를 가하고 다른 조건은 위와 동일하게 하여 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소의 활성은 1분 동안 $1 \mu\text{mol}$ 의 H_2O_2 를 분해시키는 효소의 양을 1 Unit로 하였다.

(3) Glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성 측정

간과 피부조직 균질물에서의 GSH-Px의 활성은 Lawrence와 Burk의 방법에 의해 측정되었다. 효소활성은 GSH-Px가 hydrogen peroxide를 제거하면서 소비된 GSH를 산화형인 GSSG로 전환시키는데 필요로 하는 NADPH의 양을 250mM potassium phosphate

인 GSSG로 전환시키는데 필요로 하는 NADPH의 양을 250mM potassium phosphate buffer(pH 7.0), 10mM EDTA, 10mM sodium azide, 10mM GSH, 2mM NADPH, glutathione reductase(500U/ml), 그리고 증류수를 이용하여 측정하였다. 이때 GSH-Px 1unit은 1 μ M의 NADPH를 1분간 산화시키는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

(4) 활성산소종의 함량 측정

간 또는 피부조직에서 활성산소종을 측정하기 위하여 최 등의 방법을 이용하여 subcellular fraction을 조제하였다. 간 또는 피부조직 1.0g과 1.15% KCl-10mM phosphate buffer(pH 7.4)에 5mM EDTA solution을 첨가한 용액을 조직의 9배의 양으로 첨가하여 균질화시킨 후 3,000rpm에서 10분간 원심 분리시켜 상등액을 취하였다. 이 상등액을 다시 10,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 pellet은 mitochondria fraction으로 homogenizing buffer에 현탁하여 실험에 이용하였다. 상등액은 다시 40,000rpm에서 60분간 원심 분리하였고, 얻은 pellet은 microsome fraction으로 homogenizing buffer에 현탁하였고 상등액은 cytosol로 실험에 이용되었다. 이 과정을 Fig. 1에 나타내었다.

간과 피부에서 분리한 cytosol fraction에서의 superoxide anion의 측정은 Phillip 등의 방법을 이용하여 측정하였다. Sample에 0.1mM EDTA를 함유한 0.3M phosphate buffer(pH 7.4), 3mM potassium cyanide, 0.1mM cytochrome C를 혼합한 혼합용액을 첨가한 다음 vortex 한 후 550nm에서 흡광도를 측정하였고 모든 과정은 얼음 위에서 실시하였다.

Mitochondria fraction에서의 hydroxyl radical(\cdot OH) 함량은 Halliwell과 Gutteridge의 방법을 변형한 최 등의 방법에 따라 측정하였다. 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 10mM sodium azide, 7mM deoxyribose, 5mM ferrous ammonium sulfate, 0.54M NaCl을 취하여 혼합시킨 용액을 test용은 37°C에서 15분간 배양시키고, blank용은 배양시키는 과정을 제외하여 실험하였다. 혼합액에 8.1% SDS, 20% acetic acid, 증류수, 그리고 1.2% TBA를 첨가하여 30분간 끓인 후, 실온에서 식혀 3,000rpm으로 5분간 원심 분리하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 눈과 심장조직에서 lipofuscin 측정

Lipofuscin의 함량은 Fletcher 등의 방법에 따라 측정하였다. 조직 표면의 수분을 제거한 후 chloroform:methanol(2:1, v/v)을 시료의 20배 양으로 첨가하여 균질화하였다. 여기에 동량의 증류수를 가하고 고속으로 vortex한 후 3,000rpm에서 2분간

형광 스펙트럼을 측정하였다.

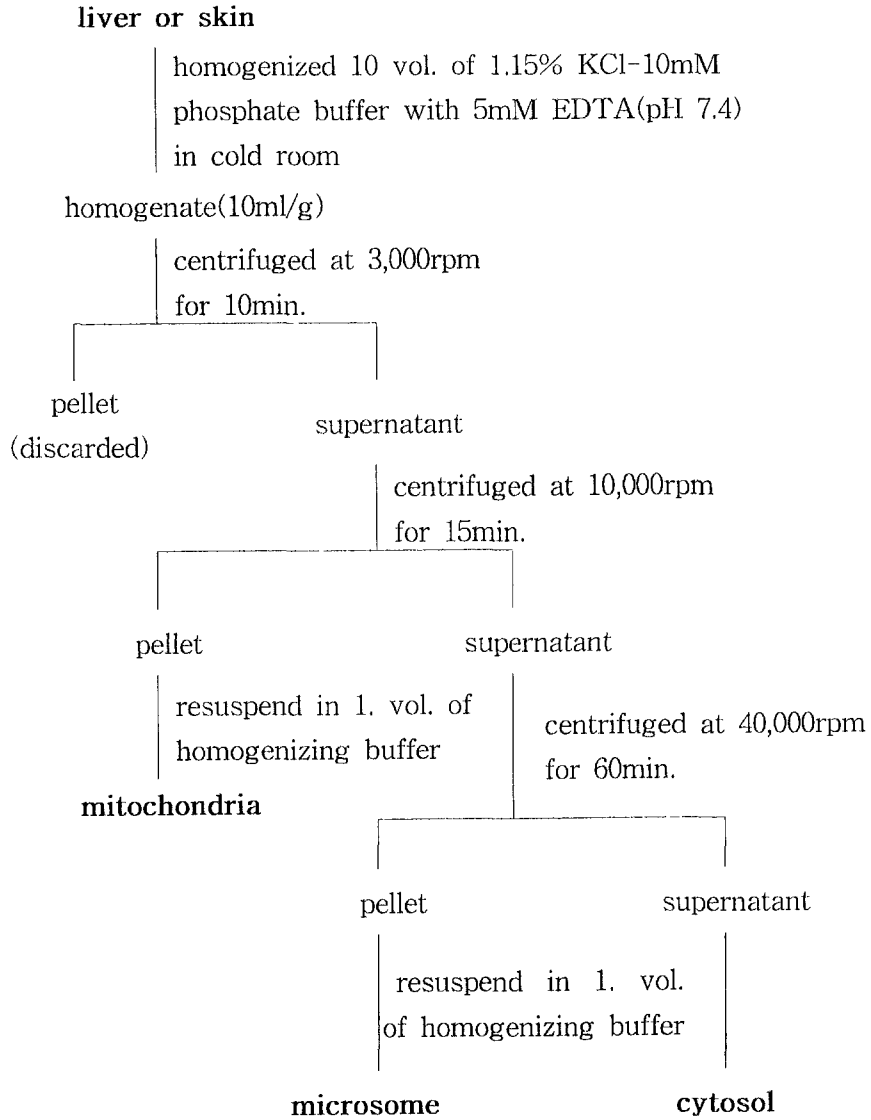


Fig. 1. Preparation of liver and skin subcellular fraction.

(6) 단백질 함량 측정

Lowry 등의 방법에 의해 bovine serum albumin(BSA)을 표준단백질로 사용하여 단백질 양을 측정하였다. 실험결과는 mean±SEM으로 표시하였으며, 각 군 간의 유의성은 t-test 및 two-way ANOVA로 조사하여 유의성이 발견된 경우 $p < 0.05$ 수준에서 Fisher's least significant difference test로 검정하였다.

3. 건강증진 식품소재로서 부추성분별 추출, 가공방법 개발

가. 기능성 부추제품의 개발

부추의 유용성분을 최대로 이용하기 위해서는 추출, 가공 중 성분의 변화를 최소화하는 것이 중요하다. 기능성 성분은 크게 부추의 액상 성분과 주로 불용성 섬유소로 구성된 고형물에 존재하는 것으로 나누어 볼 수 있다. 특정 성분만을 추출해서 활용하는 경우에는 추출용매에 제한이 가해지고 비용도 고려해야 한다. 따라서 원래 가지고 있는 수분을 이용한 착즙공정에 의해 추출되는 액상성분과 남은 고형물을 가공하여 식품가공소재로 이용하거나 부추전체를 이용할 수 있는 가공공정을 조사하였다. 부추전체를 이용하여 타블렛을 제조하였고, 불용성 식이섬유를 분리하였다.

나. 부추 타블렛의 항산화 효과 측정

부추 ethyl acetate 획분, hexane 획분 및 제조한 부추 tablet의 항산화 효과를 Hayase와 Kato의 방법에 따라 linoleic acid에 대한 과산화물가로 측정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 부추의 항당뇨효과 규명

가. 당뇨쥐에 있어서 부추분말의 섭취가 혈당 조절에 미치는 영향

1) 몸무게 및 식이효율

14주간 사육한 당뇨쥐의 식이 섭취량, 체중 증가량, 식이 효율을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 식이 섭취량에 있어서 부추군과 대조군과의 차이는 없었으나 부추군에서 식이 섭취량이 다소 낮게 나타났다. 대조군은 평균 $0.37 \pm 0.50g$, 부추군은 평균 $0.40 \pm 0.42g$ 의 체중 감소를 보여 두 군간의 유의적인 차이는 없었으며, feed efficiency ratio도 두 군간의 유의적인 차이가 없었다.

Table 3. Body weight gain, food intake and feed efficiency ratio in streptozotocin-induced diabetic rats fed 10% *Buchu* and basal diet.

	control group	<i>Buchu</i> group
Initial weight (g)	379.64±46.63 ²⁾	347.25±31.85
Final weight (g)	336.83±32.70	308.67±34.83
Weight gain (g/day)	-0.37±0.50	-0.40±0.42
Food intake (g/day)	24.06±2.92	22.60±3.31
Feed efficiency ratio ¹⁾ (%)	1.51±1.95	1.83±2.07

¹⁾ Feed efficiency ratio (%) = (weight gain g/food intake g) × 100

²⁾ Values are means ± SD, Means differ significantly (P < 0.05) if they do not share a common superscript

2) 포도당 부하검사

대조군의 혈당은 공복시 320.50±87.70mg/dl, 30분은 461.50±112.00mg/dl, 60분 476.70±79.60mg/dl이었으며, 90분에는 469.00±51.80mg/dl으로 감소하기 시작하였다(Fig. 2). 부추군의 공복시 혈당은 364.40±117.90mg/dl이었으며, 투여 30분 후에는 488.40±103.30mg/dl, 60분에 493.80±79.00mg/dl으로 증가하였다가 90분부터 혈당이 감소하기 시작하였다. 공복시 혈당을 기준으로 할 때 glucose 용액 섭취 30분 후의 혈당증가는 부추군이 124.00±111.80mg/dl으로 대조군의 140.90±59.00mg/dl에 비해 낮은 경향을 보였으며, 60, 90, 120, 180분에서도 혈당의 증가가 낮은 경향을 보였다.

3) 당화 헤모글로빈, 혈당 및 혈당조절호르몬 농도

공복시 혈장 glucose 농도 측정 결과. 부추군은 $435.60 \pm 44.30 \text{mg/dl}$ 이었고, 대조군은 $446.30 \pm 5.80 \text{mg/dl}$ 으로 두 군간에 유의적인 차이는 없었다(Fig. 3). 그러나, 당화 헤모글로빈치는(Fig. 4) 대조군이 $3.82 \pm 1.56\%$ 이었고, 부추군은 $2.64 \pm 0.55\%$ 로 부추군이 유의적으로 낮게 나타났다($P < 0.05$).

당화 헤모글로빈은 당뇨병 환자에 있어서 3~4개월 전의 평균 혈당을 알 수 있는 방법으로 중요한 혈당 조절 지표로 이용되고 있다. 적혈구의 평균수명은 120일로 이 기간 동안 적혈구 내의 혈색소(hemoglobin)에서 비효소적이고 비가역적인 당화작용이 계속해서 일어나게 되어 당뇨병에 있어서 당화 헤모글로빈치는 증가하게 된다. 따라서 장기간의 혈당조절 효과 조사에는 공복시 혈당보다 당화 헤모글로빈의 측정이 더 의미가 있다고 보고되고 있다. 부추군에서 당화 헤모글로빈 농도가 낮게 나타난 것은 대조군에 비해 부추군에서 장기간 혈당조절이 효과적이었으며, 당뇨 합병증 발생정도도 낮출 수 있을 것으로 사료된다.

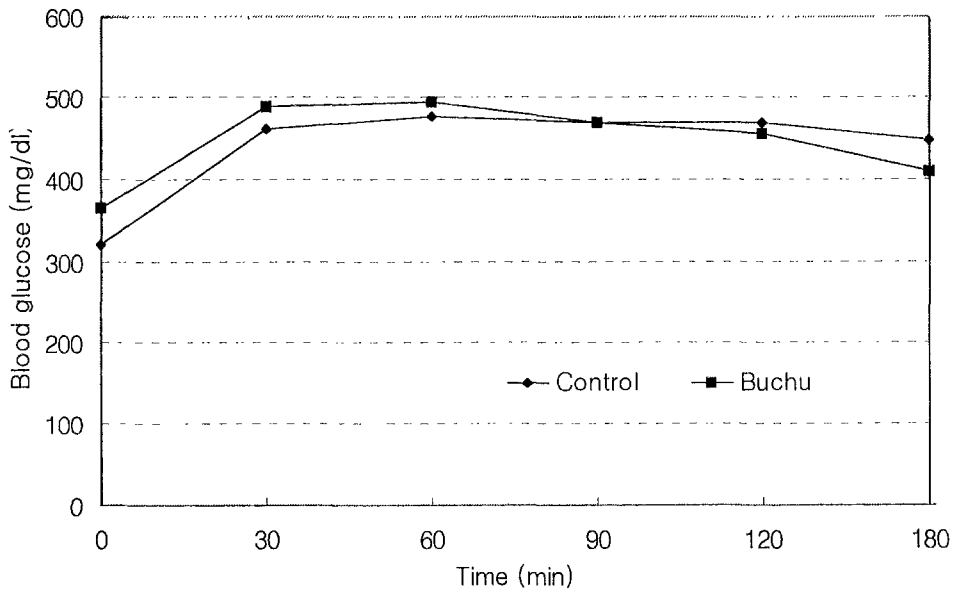


Fig. 2. Oral glucose tolerance in streptozotocin-induced diabetic rats fed basal and 10% *Buchu* diet.

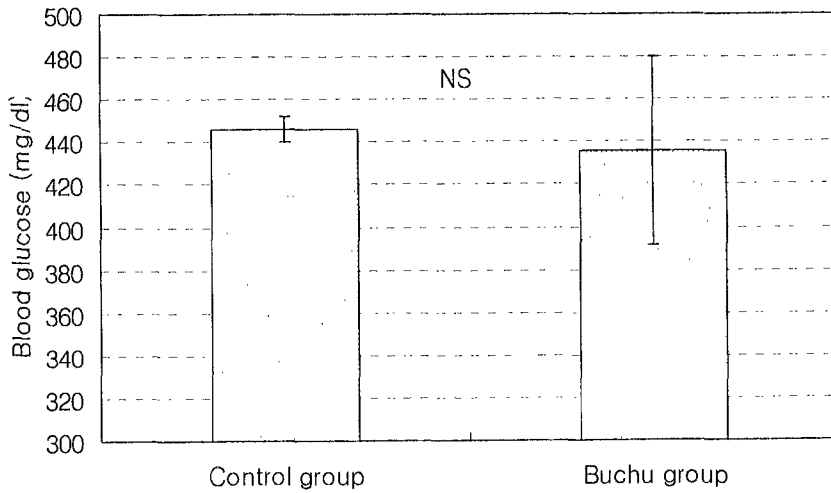


Fig. 3. Plasma glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats fed basal and 10% *Buchu* diet.

부추군의 공복시 혈장 인슐린 농도(Fig. 5)는 $8.20 \pm 2.20 \mu\text{U/mL}$ 로 대조군의 $10.80 \pm 3.10 \mu\text{U/mL}$ 보다 유의적으로 낮게 나타났다($P < 0.05$). 부추군의 공복시 혈장 글루카곤 농도(Fig. 6)는 $174.17 \pm 23.70 \text{pg/mL}$ 로 대조군의 $199.45 \pm 22.19 \text{pg/mL}$ 보다 유의적으로 낮았다. 인슐린은 간에서 세포내 cAMP를 감소시키고 cAMP의존성 단백카이네이즈를 억제하여 글리코겐의 분해, 포도당신합성 및 케톤체 생성을 차단한다. 그러나 글루카곤이 없다면 간의 cAMP농도와 cAMP의존성 단백카이네이즈의 활성도가 낮아 인슐린의 결핍으로만 당뇨병에서 발생할 수 있는 심한 고혈당과 케톤산증을 유발할 수는 없다. 따라서 당뇨병은 인슐린의 결핍과 동시에 글루카곤의 상대적 증가에 의해 대사장애가 발생되며 당뇨병자는 고혈당에 의해 글루카곤의 분비가 증가한다. 부추군의 혈중 인슐린 농도 및 글루카곤 농도의 감소는 글루카곤 분비가 적절히 억제되어 혈당조절이 개선되고 혈당 감소로 인해 인슐린 분비 자극이 감소된 것으로 사료된다.

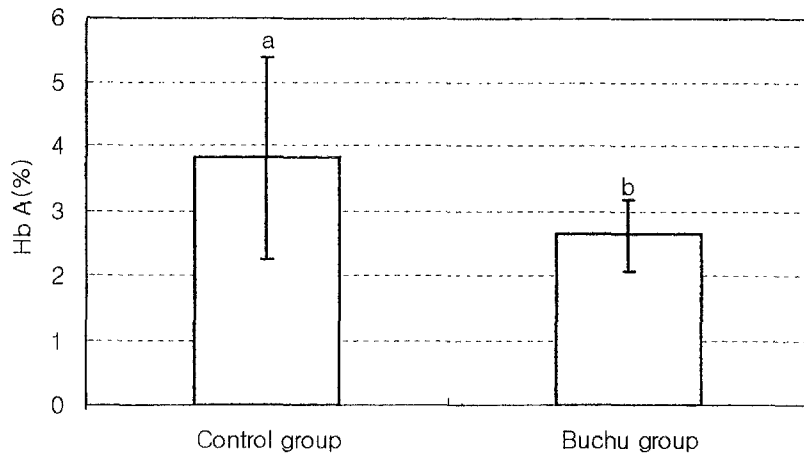


Fig. 4. Blood glycated hemoglobin levels in streptozotocin-induced diabetic rats fed basal and *Buchu* diet.

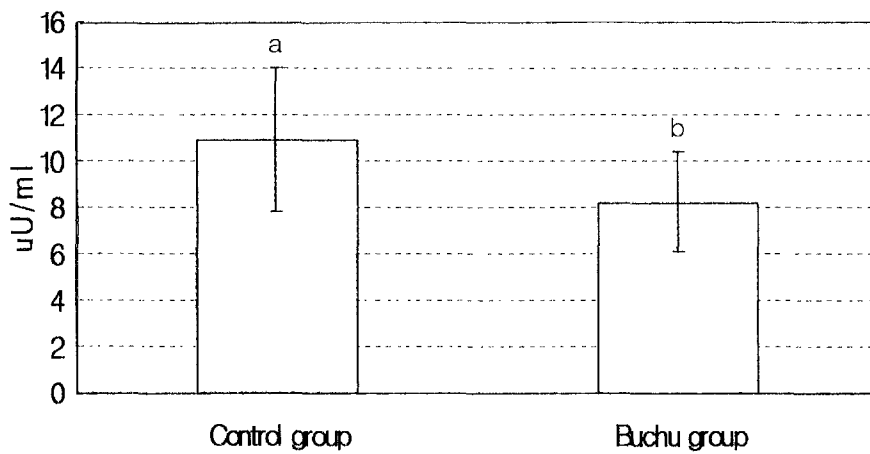


Fig. 5. Insulin levels in streptozotocin-induced diabetic rats fed basal and *Buchu* diet.

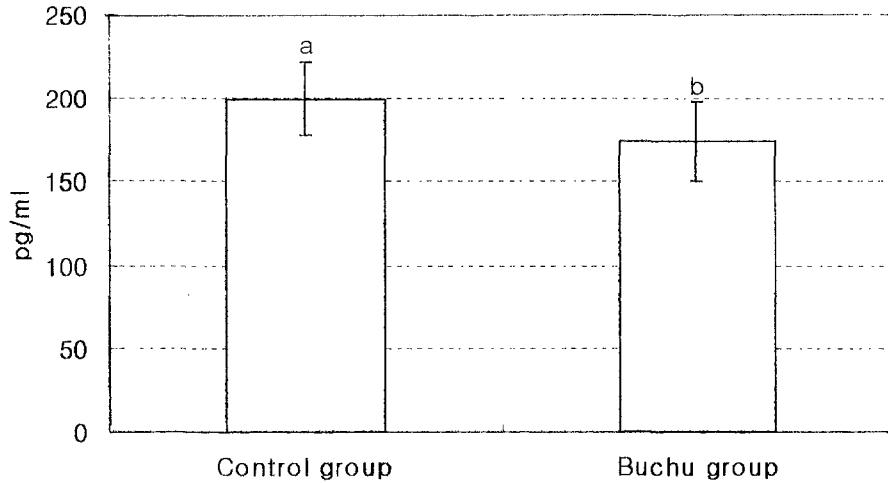


Fig. 6. Glucagon levels in streptozotocin-induced diabetic rats fed basal and *Buchu* diet.

나. SHR에 있어서 장기간의 부추 섭취가 혈당에 미치는 영향 .

대조군과 부추군의 공복시, 식후 30, 60, 90, 120, 210분에 꼬리 정맥에서 혈액을 채취한 후, 혈당치를 측정한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 대조군의 공복시 혈당치는 115.8mg/dl이었으며, 식후 30분에 138.5, 60분에 161.3mg/dl로 증가하였다가, 90분에(152.1mg/dl) 다시 혈당이 낮아지기 시작하였다. 부추 섭취군의 경우 공복시 혈당치는 112.9mg/dl이었으며, 식후 30분에 130.8mg/dl, 60분에 143.7mg/dl로 증가하였다가, 90분에다시 혈당이 낮아지기 시작하였다. 부추 섭취군의 식후 30, 60, 90, 120, 210분 혈당치는 모두 대조군 보다 낮았으나, 60분과 210분의 혈당치만 유의적으로 낮았다. 본 실험은 부추 함유 식이를 장기간 섭취한 경우, SHR의 식후 혈당치 증가를 완만하게 하는 효과가 있음을 보였다.

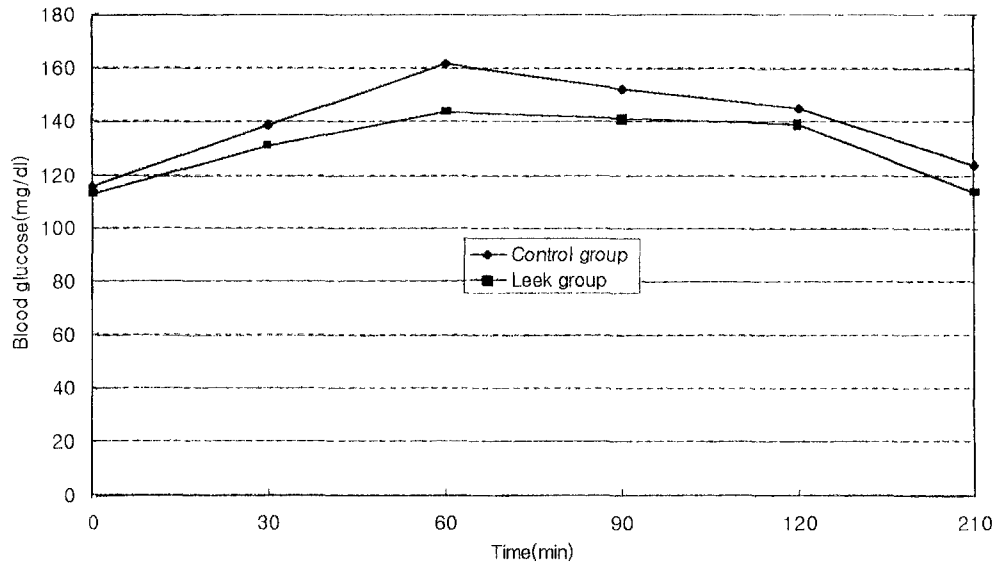


Fig. 7. Blood glucose levels of SHR after feeding the assigned diet.

다. 부추 섭취가 식이의 상부소화관 내 이동속도에 미치는 영향

51-Cr dose 섭취 30분 후에 맹장과 대장에서는 radioactivity가 검출되지 않았다. 51-Cr dose 섭취 후 30분 동안 위를 통과한 양을 Table 5에 나타내었다. 대조군의 경우 섭취한 dose의 76.1%가 위를 통과하였으며, 부추군은 68.2%가 통과하여 부추가 식이의 소화관 이동속도를 다소 느리게하는 경향이 있음을 보였다.

Table 5. 51-Cr dose past stomach.

Group	% of consumed dose past stomach
control group	76.1
<i>Buchu</i> group	68.2

라. 부추의 탄수화물 소화효소 저해활성 및 인슐린 리셉터에 미치는 영향

1) 부추추출물의 alpha-glucosidase, alpha-amylase 저해활성

부추 물 추출물(20ml/g dry sample)의 alpha-glucosidase 저해활성은 34~62%로 지역간 차이가 있는 것으로 나타났으며, 대구, 여주, 김해, 영광 순으로 효소 저해활성이 높게 나타났다(Table 6). 한편 부추의 100% 메탄올 추출물의 alpha-glucosidase 저해활성은 54~62%로 지역간 거의 차이가 없었으며, 추출물의 희석에 의한 저해활성 감소가 비교적 작은 것으로 나타났다(Table 7). 이러한 부추 추출물의 효과는 임상적으로 사용되고 있는 acarbose(1mg/ml)와 비슷한 수준이었다. 물 추출물과 메탄올 추출물 모두 효소 활성을 저해한 것으로 보아, 부추에는 수용성 당류로 추정되는 효소저해제 뿐만 아니라 극성이 비교적 낮은 저분자물질의 효소저해화합물이 함유되어 있는 것으로 판단된다. 이와 같은 결과로부터 부추의 섭취는 소화효소의 작용을 저해하여 식후 급격한 혈당상승(postprandial hyperglycemia)을 예방해 줄 가능성이 높은 것으로 평가된다. Glucosidase 저해제에 의하여 탄수화물 흡수가 지연되더라도 흡수되는 총 탄수화물 함량에는 변화가 없으며, 따라서 순수한 열량손실은 기대하기 어렵다. Glucosidase 저해제의 주요 부작용은 복부팽만 및 설사증세인데, 이러한 부작용은 일반적으로 3개월 이상 투여해야 내성이 생기기 때문에 처치 초기에는 조금씩 상태를 지켜보면서 투약수위를 조절해야 한다. 한편 식품에 내생적으로 존재하는 alpha-glucosidase 저해제는 분리하지 않고 식품형태로 섭취하여 효능을 발휘할 수 있으므로 이와 같은 부작용을 최소화할 수 있는 장점이 있다.

한편 효소원과 기질로 각각 porcine amylase, para-nitrophenyl-alpha-D-maltoheptaoside를 이용하여 부추 추출물의 alpha-amylase 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과, 부추의 물 추출물은 전분분해효소인 alpha-amylase에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 메탄올 추출물은 효소활성을 오히려 증가시키는 것으로 나타났다(Table 8, 9). 이렇듯 부추의 메탄올 분획에는 alpha-amylase의 효소활성을 증가시키는 저분자물질이 존재하는 것으로 추정된다. Acarbose는 IC₅₀ 값이 1~10 ug/ml 로서 alpha-amylase에 대하여 저해활성이 매우 높은 것으로 나타났다(Table 10). 임상적으로 이용되는 alpha-glucosidase 저해제 가운데 voglibose나 miglitol은 acarbose와 달리 alpha-amylase 저해활성이 매우 낮은 것으로 알려져 있어, postprandial hyperglycemia를 치료하는데 alpha-amylase 저해활성은 필수적이 아닌 것으로 알려져 있다. 이렇듯 부추가 alpha-amylase를 저해하는 활성은 없지만 alpha-glucosidase 저해활성이 높은 편이므로 postprandial hyperglycemia 증상을 완화시키는 식품소재로 개발할 가치가 있는 것으로 판단된다.

Table 6. Alpha-glucosidase inhibitory activities of water extracts from *Buchu* cultivated in different areas(%).

	Location cultivated						Acarbose (1 mg/ml)
	Kimhae	Taegu	Yeoju	Youngkwang	Pohang	Hanam	
no dilution	49	62	51	49	34	43	63
2-fold dilution	46	55	32	40	37	36	48
5-fold dilution	31	35	14	27	30	22	29

Table 7. Alpha-glucosidase inhibitory activities of methanol extracts from *Buchu* cultivated in different areas(%).

	Location cultivated						Acarbose (1 mg/ml)
	Kimhae	Taegu	Yeoju	Youngkwang	Pohang	Hanam	
no dilution	54	60	57	54	62	58	63
2-fold dilution	47	52	38	53	58	56	48
5-fold dilution	26	36	36	46	41	42	29

Table 8. Alpha-amylase inhibitory activities of water extracts from *Buchu* cultivated in different areas(%).

	Location cultivated					
	Kimhae	Taegu	Yeoju	Youngkwang	Pohang	Hanam
no dilution	7	3	-4	9	7	6
2-fold dilution	-2	-4	-5	-9	-5	-5
5-fold dilution	-4	-9	-10	-10	-4	-5

Table 9. Alpha-amylase inhibitory activities of methanol extracts from *Buchu* cultivated in different areas(%).

	Location cultivated					
	Kimhae	Taegu	Yeoju	Youngkwang	Pohang	Hanam
no dilution	-4	-34	-21	-33	-19	-20
2-fold dilution	-12	-26	-15	-28	-19	n. d.
5-fold dilution	-12	-28	-13	-28	-17	-9

Table 10. Alpha-Amylase inhibitory activity of acarbose.

	Concentration(ug/ml)			
	1000	100	10	1
Inhibitory activity(%)	94	94	79	38

2) 인슐린 리셉터에 미치는 영향

세포의 인슐린 결합능은 세포막으로부터 수용체를 유리시킨 다음, 여러 가지 인슐린 농도(0 - 100 nM)에서 방사능을 가진 인슐린(¹²⁵I-Insulin)과 결합시켜 침전시킴으로서, 수용체와 결합한 인슐린의 함량(%)으로 나타내었다.

부추 추출물 또는 용매획분에 노출된 MCF-7 세포의 경우, 대부분 경우 전형적인 역비례 곡선형태를 보이지 않았다 (Fig. 8). 그러나 이는 사용한 MCF-7 세포의 인슐린 수용체 숫자가 극히 적거나, 결합능이 매우 낮은데서 기인하는 것으로 추정된다. 그러나 100% 메탄올 추출물과 ethylacetate 분획에 노출된 세포에서 인슐린 결합능이 관찰되었으며, 이는 대조군, 물추출물군, 80% 메탄올 추출물, hexan 그리고 부탄올획분에 비하여 인슐린 결합능이 약간 증가한 것을 의미한다. 그러나 두 군간의 유의적인 차이는 없었다. 본 실험에서는 부추 추출물과 그 획분의 항당뇨 메카니즘으로서 인슐린 결합능 조절가능성을 조사하였으나, 부추추출물이 MCF-7 세포의 인슐린 결합능에 유의적인 영향을 미친다는 것은 확인하지 못하였다. 따라서 부추의 항당뇨 효과는 탄수화물 소화효소의 저해활성이나 혈당조절 호르몬 등과 관련이 더 깊은 것으로 추정된다.

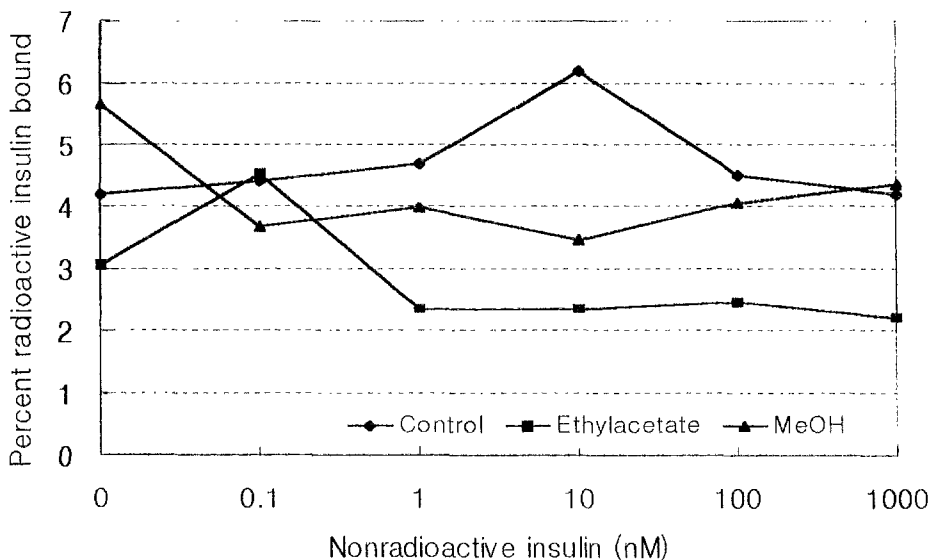


Fig. 8. Insulin binding activity of ethyl acetate extract of *Buchu*.

마. 부추 용매획분의 항당뇨 효과

1) 부추추출물의 alpha-amylase 저해활성

부추의 용매별 추출물의 alpha-glucosidase 저해활성은 ethyl acetate층에서 79.4%로 효소저해활성이 가장 높게 나타났고 hexane층에서 20.6%, buthanol층은 12.2%, 물층은 4.0%순으로 저해활성이 나타났다(Table 11). Acarbose(5mg/ml)는 22.8%의 저해활성으로 hexane층과는 비슷한 수준이었고 ethyl acetate층 보다는 낮았다. 부추추출물의 alpha-amylase 활성에 미치는 영향은 hexane층에서 40.1%로 가장 높게 나타났으며, acarbose는 0.5mg/ml의 농도에서는 85.6%, 5mg/ml에서는 89.1%로 나타났다(Table 12). 따라서 *in vitro* 실험에서 항당뇨효과가 큰 ethyl acetate층을 대량 추출하여 동물실험에 사용하였다.

Table. 11. Alpha-glucosidase inhibitory activities of *Buchu* solvent fractions (%).

Sample	Alpha-glucosidase inhibitory activities (%)
Hexane	20.6
Ethyl acetate	79.4
Butanol	12.2
H ₂ O	4
Acarbose (0.5mg/ml)	-35.1
Acarbose (5mg/ml)	22.8

Table 12. Alpha-Amylase inhibitory activities of *Buchu* solvent fractions (%).

Sample	Alpha-Amylase inhibitory activities (%)
Hexane	40.1
Ethyl acetate	-7.2
Butanol	-11.4
H ₂ O	11.4
Acarbose (0.5mg/ml)	85.6
Acarbose (5mg/ml)	89.1

2) 당뇨병에 있어서 부추추출물의 섭취가 혈당조절에 미치는 영향
 부추 에틸아세테이트 획분의 섭취(식이의 0.64%)가 당뇨병의 내당능에 미치는 영향을 경구 당부하 검사에 의해 관찰한 결과는 Fig. 9와 같다. 당뇨병부추군은 포도당 투여 후 30분의 혈당증가가 당뇨대조군에 비해 낮은 경향을 나타내었다.

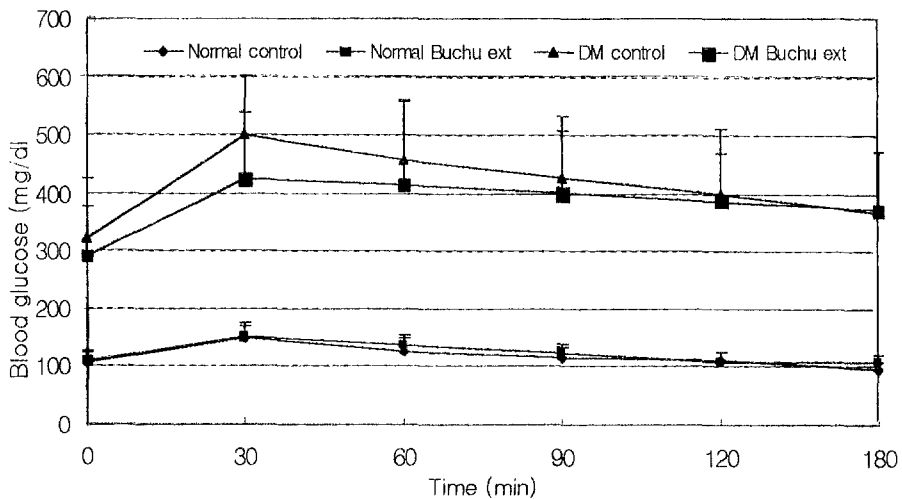


Fig. 9. Oral glucose tolerance in streptozotocin-induced diabetic and normal rats fed basal and *Buchu* extract diet.

공복시 혈장 glucose 농도는 당뇨부추군이 당뇨대조군에 비해 다소 낮은 경향을 보였다. 부추 추출물의 섭취는 혈액 당화 헤모글로빈 농도를(Table. 13) 정상군과 당뇨군에서 모두 유의적으로 낮추었다($P < 0.05$). 부추 에틸아세테이트 획분은 장기간의 혈당조절 지표가 되는 당화 헤모글로빈 조절에 효과가 큰 것으로 나타나 당뇨치료에 도움을 줄 것으로 사료된다. Fructosamine은 당뇨대조군과 당뇨부추군 사이에 유의적 차이가 없었다(Fig. 11).

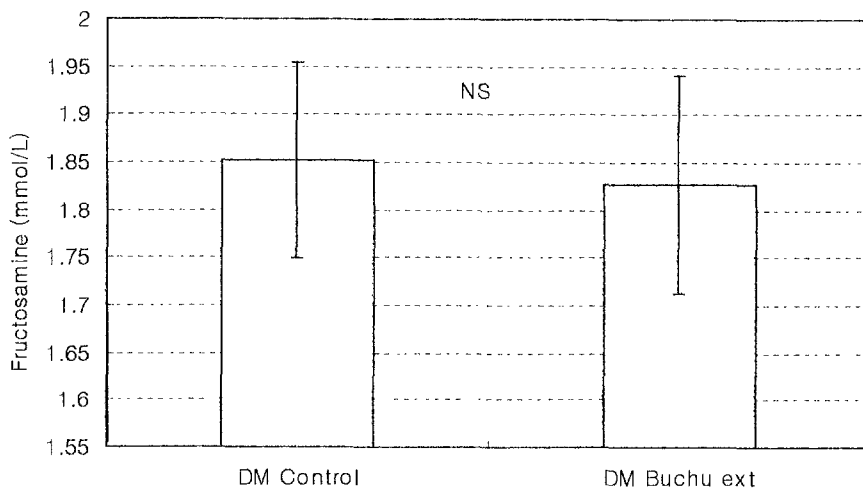


Fig. 10. Fructosamine levels in streptozotocin-induced diabetic and normal rats fed basal and *Buchu* extract diet.

Table 13. Blood glycated hemoglobin levels in streptozotocin-induced diabetic and normal rats fed basal and *Buchu* extract diet.

Group	Hb A _{1c} (%)
<u>Individual groups</u>	
Normal - Control	2.48 ± 0.65 ¹⁾
Normal - <i>Buchu</i>	1.90 ± 0.16
Diabetes - Control	5.77 ± 0.68
Diabetes - <i>Buchu</i>	5.18 ± 0.31
<u>Pooled groups</u>	
<u>Animal</u>	
Normal	2.19 ± 0.55 ^a
Diabetes	5.48 ± 0.60 ^d
<u>Dietary treatments</u>	
Control	4.13 ± 1.82 ^b
<i>Buchu</i>	3.54 ± 1.71 ^a

¹⁾ means ± SD

3) Carbohydrate load test

정상쥐의 공복시 혈당은 $114.8 \pm 13.3 \text{ mg/dl}$ 이었는데, maltose 투여후 30분에 $145.1 \pm 14.9 \text{ mg/dl}$ 로 증가한 후, 60분에 $129.6 \pm 11.0 \text{ mg/dl}$ 로 혈당이 감소하였다. 반면 maltose와 함께 ethyl acetate 획분을 투여한 경우 30분에 $130.7 \pm 13.0 \text{ mg/dl}$ 로 증가하여, 대조군에 비해 유의적으로 증가량이 작았다($P < 0.05$). 식후 60분에 $126.4 \pm 10.6 \text{ mg/dl}$ 로 혈당이 감소하였다(Fig. 11). 당뇨쥐의 공복시 혈당은 $242.2 \pm 58.9 \text{ mg/dl}$ 이었는데, maltose 투여후 30분에 $376.2 \pm 57.1 \text{ mg/dl}$ 로 증가한 후, 60분에 $356.6 \pm 61.3 \text{ mg/dl}$ 로 혈당이 감소하였다. 반면 maltose와 함께 ethyl acetate 획분을 투여한 경우 30분에 $345.8 \pm 65.9 \text{ mg/dl}$ 로 증가하여, 대조군에 비해 증가량이 작은 경향을 나타내었다. 식후 60분의 혈당치는 $346.8 \pm 48.0 \text{ mg/dl}$ 로 혈당이 감소하였다(Fig. 12).

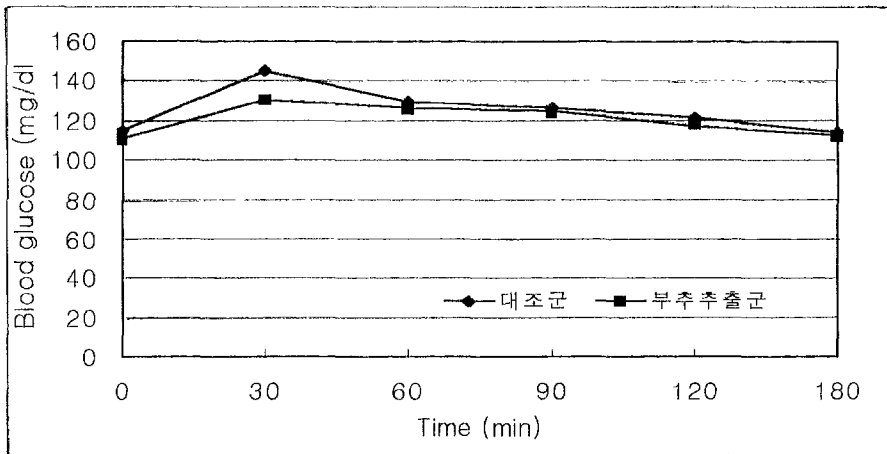


Fig 11. Blood glucose levels of normal rats after maltose load.

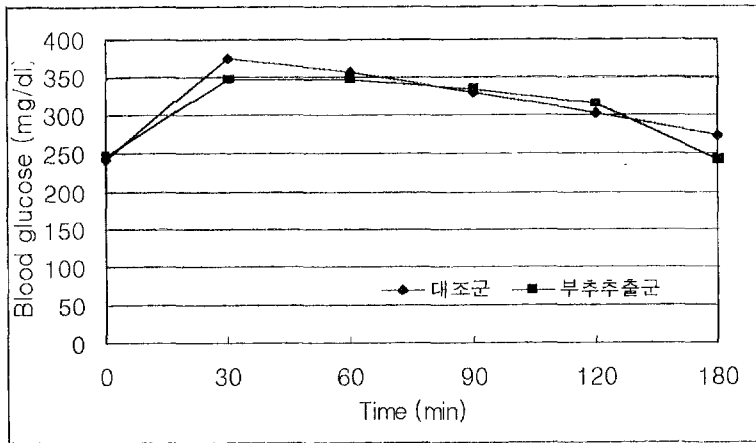


Fig. 12. Blood glucose levels of streptozotocin-induced diabetic rats after maltose load.

2. 부추의 항산화효과 측정

가. 용매별 추출물의 *in vitro* 항산화 효과 측정

1) 과산화물가의 변화

동결건조부추의 메탄올 추출물로부터 얻은 hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol 및 물 희분에서 측정한 과산화물가는 Fig. 13과 같았다. 대조군의 과산화물가 생성은 시간이 변함에 따라 급격히 증가하는 경향을 보였으나, 추출물을 첨가한 그룹에서는 완만하게 증가하였다. 추출물 중 dichloromethane과 ethylacetate 층을 첨가한 그룹에서 과산화물의 생성이 가장 억제되었으므로 두 용매분획물의 항산화 효과가 가장 높은 것으로 확인되었다.

2) DPPH에 의한 free radical scavenging 효과

항산화물질의 가장 특징적인 기작은 oxidative free radical과 반응하는 것으로 전자공여능 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 식물종의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 이용된다. 본 실험에서는 부추의 용매별 계통 분획물에서 free radical scavenging 효과를 측정하여 Fig. 14에 나타내었다. DPPH는 안정한 free radical로 cysteine, glutathione과 같은 함유황 아미노산과 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy aromatic compounds(hydroquinone, pyrogallol), 그리고 aromatic amines (*p*-phenylenediamine, *p*-aminophenol) 등에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화 물질의 항산화능 측정에 편리한 방법이다. DPPH에 의한 부추 추출물

의 free radical scavenging 효과는 ethylacetate층에서 가장 높게 나타났고 butanol, dichloromethane, water, hexane층의 순으로 나타났다. 앞의 linoleic acid emulsion 하에서의 분획물의 항산화 효과 또한 dichloromethane과 ethylacetate층에서 높게 나타났으므로 부추의 항산화 효과를 나타내는 물질이 이 두 층에 함유되어 있을 것으로 사료된다.

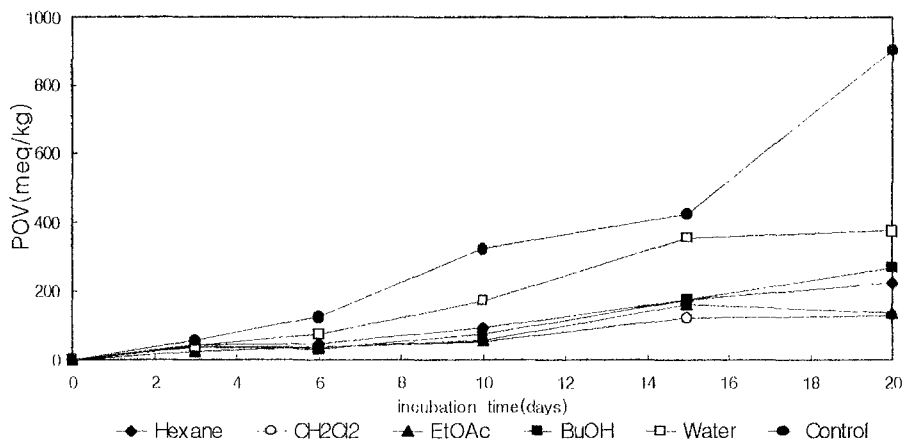


Fig. 13. Peroxide values in solvents of freeze-dried *Buchu* about linoleic acid emulsion at 50°C.

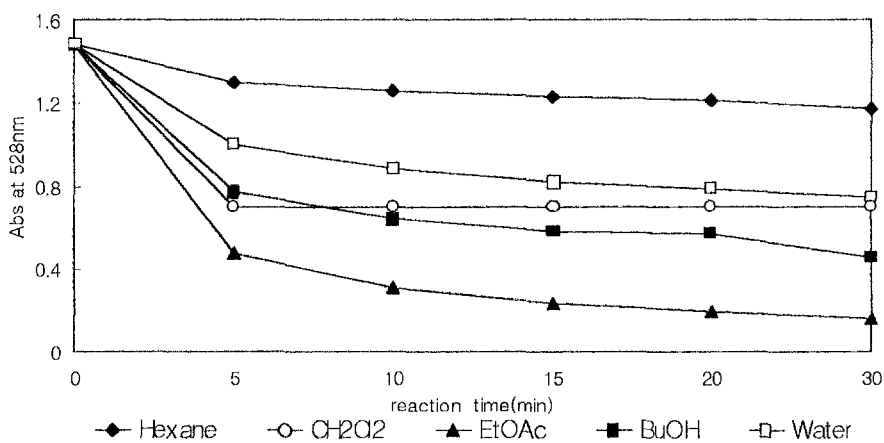


Fig. 14. Free radical level by DPPH method.

나. 용매별 추출물의 항산화물질 함량

부추의 용매별 추출물의 total phenol 함량을 측정한 결과는 Fig. 15와 같았다. 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 이들은 페놀성 수산기를 가지고 있기 때문에 단백질 및 기타 거대분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화 효과 등의 생리활성 기능도 가진다. 페놀성 화합물에는 플라보노이드류, 카테킨류 및 탄닌류가 있다. 이러한 페놀성 물질은 식물의 고유한 색을 부여하고 떫은맛과 쓴맛의 주체로 식물성 식품의 고유한 맛에도 깊이 관여한다. 본 실험에서는 dichloromethane 층에서 총페놀의 함량이 가장 높게 나타났고 ethylacetate 층과 butanol 층에서도 높게 나타났다. 따라서 부추의 dichloromethane 층이 항산화 효과가 높은 것을 확인하였다.

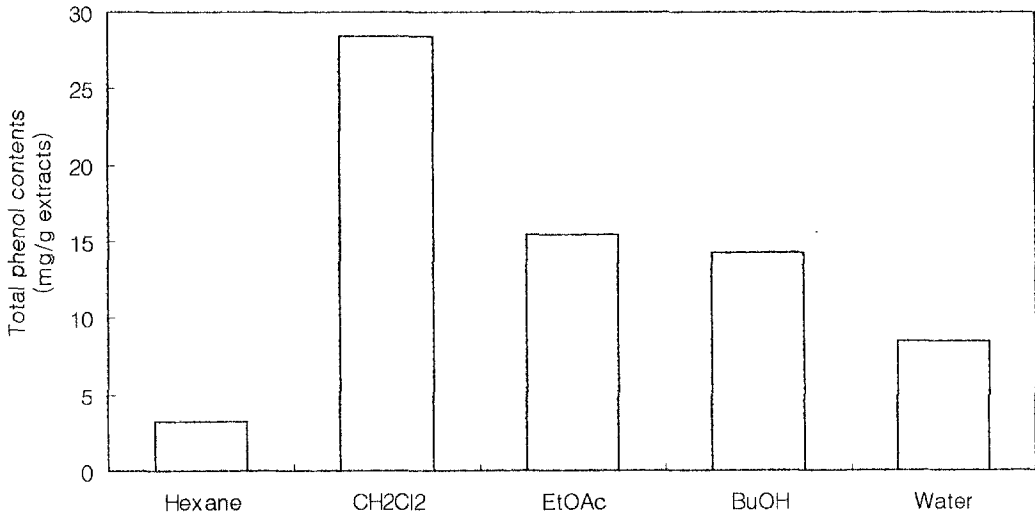


Fig. 15. Contents of total phenol in solvent extracts of *Buchu*.

다. 당뇨쥐에 있어서 부추 식이 및 용매분획물의 산화억제 효과 탐색

1) 부추 분말의 섭취가 미치는 영향

가) 간과 피부조직의 산화

당뇨와 같은 병리적 상태에서는 산화적 스트레스가 증가하게 되며 이로 인해 지질의 과산화 또한 증가하게 된다. 여러 연구자에 의해 당뇨쥐에서 지질 과산화가 측정되고 있는데, 이 등은 당뇨쥐의 간 microsome에서 지질과산화물이 정상군의 2배로 증가한 것을 관찰하였고, 서 등도 황백피와 두릅나무 추출물을 투여한 당뇨군의 간

에서 TBARS 값이 유의적으로 감소하였다고 보고하였다.

지질 과산화 반응은 여러 가지 독성화합물이나 약물에 의해 생성된 유리기들의 연쇄적 반응이 주원인이 되어 일어나며 이때 이차적으로 생성된 과산화지질이나 유리기들이 관여한다. 지질은 생체막에서 단백질과 같이 존재하며 밀접한 관계를 유지하고 있다. 지질의 산화시에 생기는 peroxy radical과 이의 중간분해산물인 여러 종류의 aldehyde들이 주위의 단백질을 산화시킬 것이고 지질막의 유동성이 떨어져 이차적으로 막 결합 단백질의 구조와 기능에 영향을 주게 된다. 지질의 산화로 생성된 malondialdehyde(MDA)는 아미노기와 반응하여 단백질과 cross-linking 하여 피부의 단백질에 영향을 줄 수 있다.

생체조직의 과산화적 손상의 지표로 알려져 있는 TBARS 함량을 측정한 결과를 Fig. 16에 나타내었다. 간에서의 TBARS 함량은 유의적인 차이는 없었으나 10% 부추 식이군에서 지질 과산화 정도가 감소하는 경향을 보였으며, 피부조직에서는 유의하게 TBARS 함량이 감소하였다.

항산화 물질인 클로로필, 비타민 C, 베타 카로틴이 풍부한 채소와 과일의 섭취가 세포의 산화적 손상을 감소시키는데 유의성을 가진다는 결과로 보아 부추식이군에서 지질과산화가 감소한 것은 부추 속의 여러 항산화 물질의 작용에 의한 것으로 사료된다.

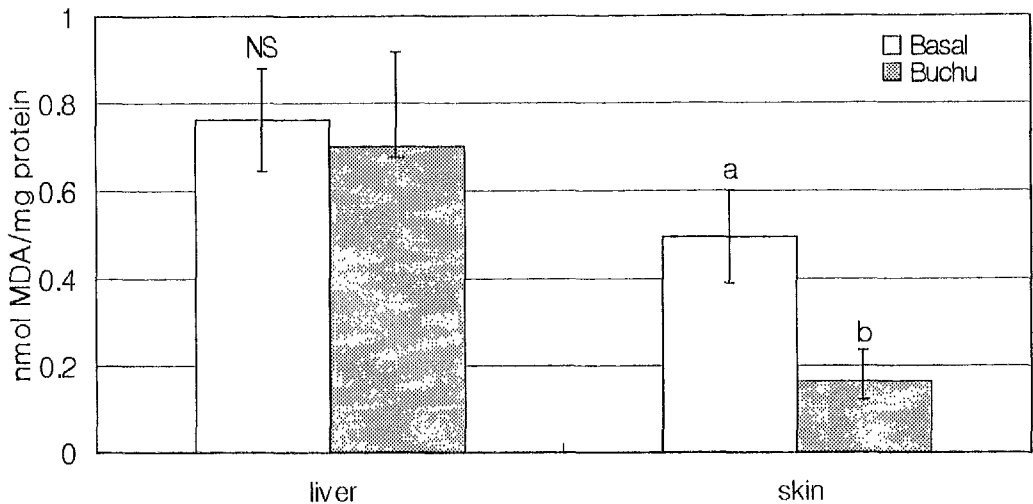


Fig. 16. TBARS contents of liver and skin in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu* diet.

나) 간과 피부에서 단백질의 산화

생체내의 대사과정에서 생성되는 활성산소나 지질의 과산화물이 지니고 있는 free radical에 의한 생체내의 손상을 측정하는 protein carbonyl 방법은 지질의 산화로 형성된 유리기들이 생체내의 단백질과 반응하여 이들을 파괴시킴으로서 protein carbonyl compound가 형성되고 이러한 단백질의 파괴는 지질산화생성물인 hydroperoxide나 malondialdehyde의 생성보다 먼저 일어난다고 하였다.

10% 부추첨가 식이를 당뇨쥐에게 14주간 공급한 후 희생하여 간과 피부조직에서의 단백질 산화 정도를 측정하여 Fig. 17에 나타내었다. 간에서는 대조군과 부추식이군 사이에 유의성은 발견되지 않았지만 부추 식이군에서 감소하는 경향을 보였고, 피부에서는 부추 식이가 유의적으로 단백질의 산화를 억제하였다. 이는 부추 속의 항산화 물질이 단백질의 파괴로 생성되는 carbonyl 화합물의 생성을 감소시키는 것으로 나타났다.

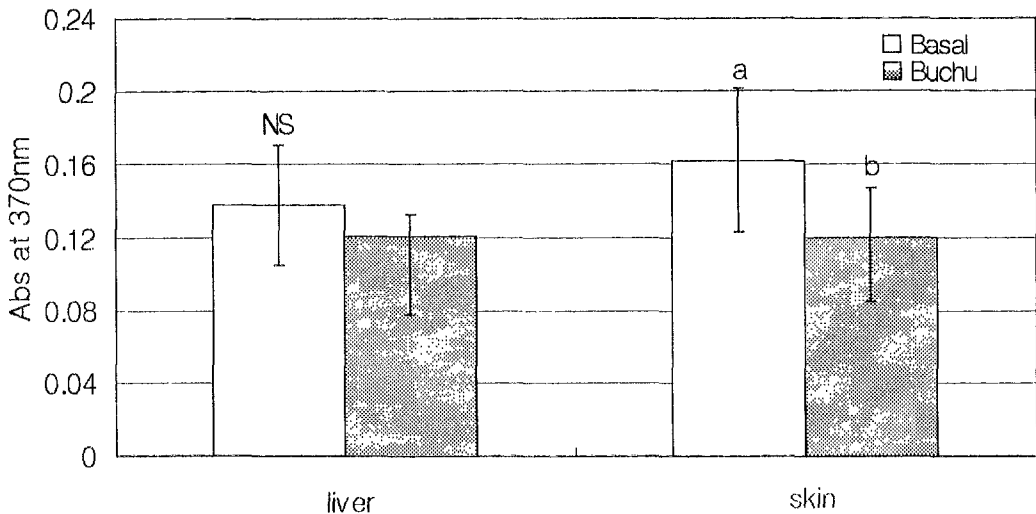


Fig. 17. Protein carbonyl values of liver and skin in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu* diet.

다) 간과 피부조직에서 항산화 효소계의 활성화

생체내에서는 정상적인 대사과정에서 의해 free radical이 생성되어 세포독성을 유발하는데 체내에는 이러한 free radical로부터 신체를 보호해 주는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GSH-Px), glutathione

reductase 등의 항산화 효소계가 있다. 당뇨병에서는 산화적 스트레스가 증가되며, SOD와 catalase 활성의 변화를 일으켜 지질 과산화물이 증가된다고 하였다. 체내의 항산화 효소계는 간에 주로 많은 양이 함유되어 있으며 이들 효소계는 대사과정 중에서 발생하는 활성산소종의 유리기를 제거하여 생체를 보호한다. 간과 피부에서 항산화 효소계의 활성을 측정하여 Fig. 18~20에 나타내었다.

SOD는 활성산소를 과산화수소로 분해시키는 효소로서 생체내 해독계 중의 하나이며, 동물의 간장 중의 SOD 활성과 수명 사이에 양의 상관관계를 나타낸다는 보고는 SOD의 항산화성을 잘 나타낸다. Metalloprotein으로 활성부위에 Cu, Zn, Mn, Fe 등의 금속이 존재하며, 그 중 동물조직에서는 Cu, Zn-SOD와 Mn-SOD가 발견된다. SOD의 활성(Fig.18)은 간과 피부에서 부추식이의 급여로 유의적으로 증가하였고 피부에서 그 효과가 현저하였다.

Catalase는 동물조직의 간과 적혈구에 다량 존재하는 효소로, 과산화수소를 분해하여 물과 산소를 형성하고 수소 공여체의 산화에 관여하여 간의 peroxisome에서 과산화수소의 level 조절과 specific peroxidase로서 작용한다. 본 실험에서는 부추식이의 급여로 간 및 피부조직에서 catalase의 활성이 유의적으로 증가하였다.

Glutathione(GSH)은 glutamic acid와 cysteine, glycine의 tripeptide로 구성되며 cysteine의 SH기가 항산화 능력을 나타내게 된다. 동물세포에서 높은 수준(>5mM)으로 존재하며 환원형(GSH)과 산화형(GSSG) 사이를 순환하는데 GSSG는 전자 공급원으로서 NADPH를 사용하는 플라빈 단백질인 glutathione reductase에 의해 GSH로 환원된다. glutathione은 산소를 사용하는 생명체에 의해 생기는 유해한 부산물인 과산화수소나 유기 과산화물들과 반응함으로써 해독작용에 중요한 역할을 한다. 이 때 활성자리에 Se 원자를 가지고 있는 glutathione peroxidase(GSH-Px)가 촉매작용을 하게 된다. 또한 환원형 glutathione은 적혈구의 정상적인 구조를 유지하고 헤모글로빈을 제일철 상태로 유지하는데 필수적이다. 간과 피부조직에서 측정된 GSH-Px의 활성을 측정된 결과(Fig. 20) 유의적인 차이는 없었으나 부추식이의 급여로 다소 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 당뇨로 인하여 감소된 항산화 효소계의 활성이 부추 식이의 섭취로 인해 증가하는 것은 부추가 당뇨쥐에서 증가되는 과산화적 손상을 방지하는 즉, 항산화 효과가 있는 것으로 확인되었다.

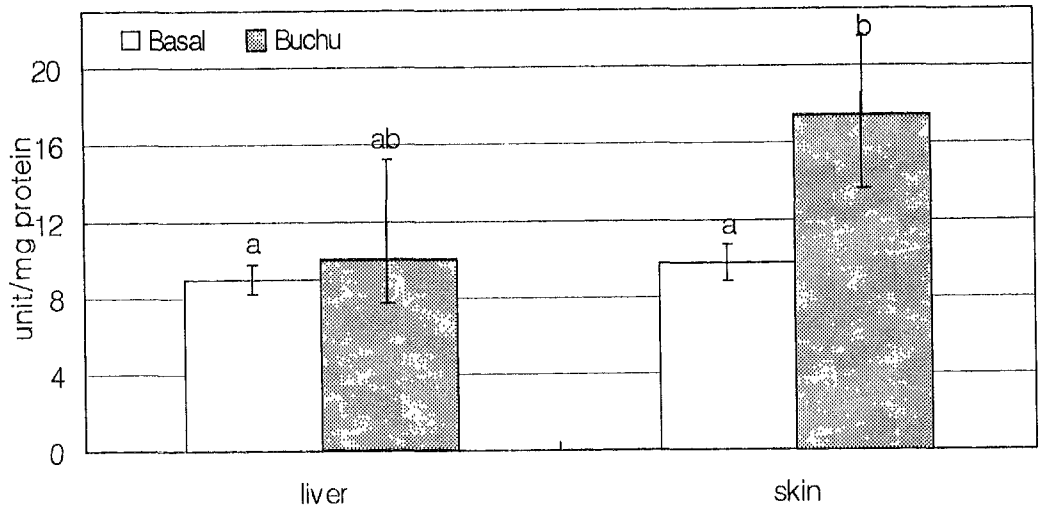


Fig. 18. SOD activities of liver and skin in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu* diet.

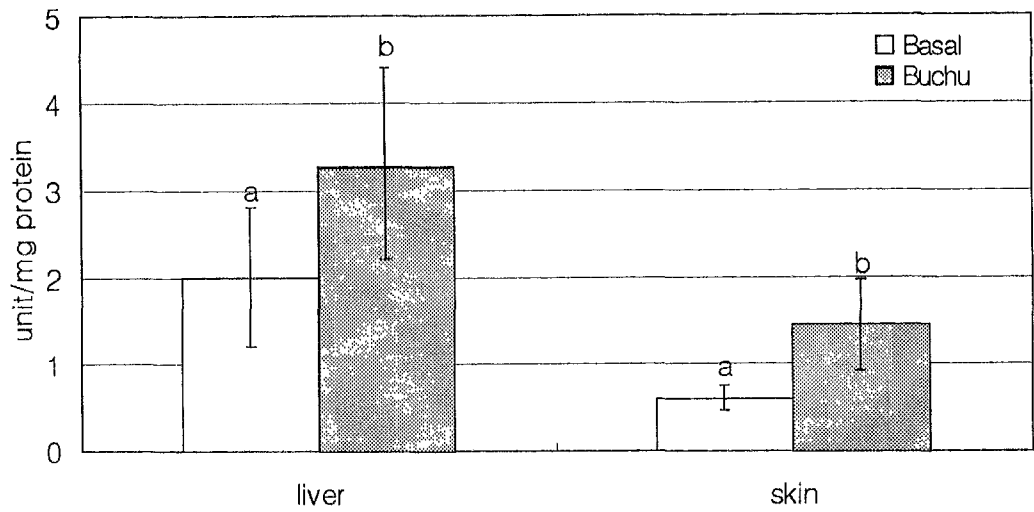


Fig. 19. Catalase activities of liver and skin in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu* diet.

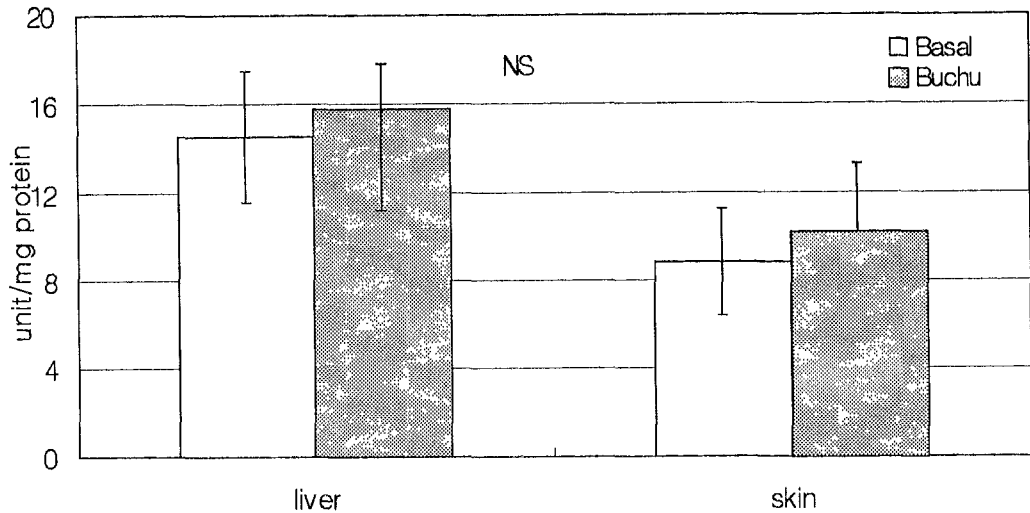


Fig. 20. GSH-Px activities of liver and skin in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu* diet.

라) 간과 피부조직에서 활성산소종의 함량

최근 oxygen radical이 지질, 단백질, 당질 그리고 핵산과 같은 biomolecule의 산화적 손상을 유도한다는 보고가 있다. 산소는 호기성 세포의 생존에 필수적이지만 정상적인 대사의 한 부분으로 활성산소종이 생길 수 있으며 세포에 독성 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 신체는 활성산소종을 불활성화시키는 다양한 메커니즘을 가지고 있지만 이러한 메커니즘에 결함이 생기면 암, 뇌졸중, 그리고 신경퇴행성 질환 같은 여러 가지 질병을 야기시킬 수 있다.

Superoxide anion($O_2^{\cdot -}$)은 molecular oxygen의 전자부가, xanthine oxidase가 xanthine을 uric acid로 전환시키는 과정에서, 그리고 여러 flavoprotein oxidase의 반응에 의한 부산물로 형성되는 활성산소종으로서 superoxide dismutase(SOD)에 의해 과산화수소로 전환된다. Hydrogen peroxide는 항산화 효소계인 catalase와 GSH-Px에 의해 물과 산소로 분해되어 무독화된다. Hydroxyl radical은 Haber-Weiss 반응과 Fenton 반응을 통해 superoxide anion radical과 hydrogen peroxide로부터 형성되며 활성산소종 중 가장 반응성이 크다.

활성산소종은 핵산, 지질, 단백질 그리고 탄수화물 등과 반응하여 조직에 직접적인 상해를 유발하고 peroxy radical이나 과산화물을 반응산물로 생성하여 이차적인 연쇄반응을 일으키게 된다. 생체내에는 유리기들에 의한 과산화적 손상으로부터 생

체를 보호하는 효소적, 비효소적 항산화계가 존재하며 식품중에는 비타민 C, 토코페롤, 페놀성 화합물, 카로티노이드, 셀레늄 등의 비효소적 항산화계가 있다.

본 실험에서는 식이의 10%를 부추로 공급한 당뇨쥐에서 활성산소종인 superoxide anion의 함량과 hydroxyl radical의 함량이 감소하였다(Fig. 21, 22). 이는 superoxide anion에 SOD가 작용하여 체내의 superoxide anion을 과산화수소로 전환시킨 것으로 사료되며, 또한 catalase와 GSH-Px이 과산화수소를 물로 전환시켜 독성을 소실시켜 그 중간체인 hydroxyl radical의 함량이 감소한 것으로 생각된다. 따라서 부추가 당뇨쥐에서 활성산소종을 소거하는데 효과가 있는 것으로 나타났다.

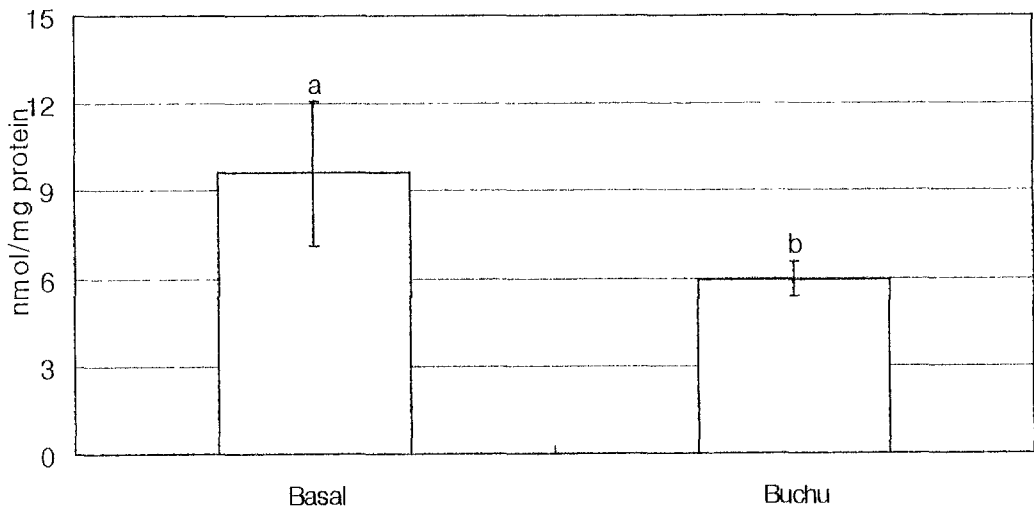


Fig. 21. Superoxide anion contents of liver in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu* diet.

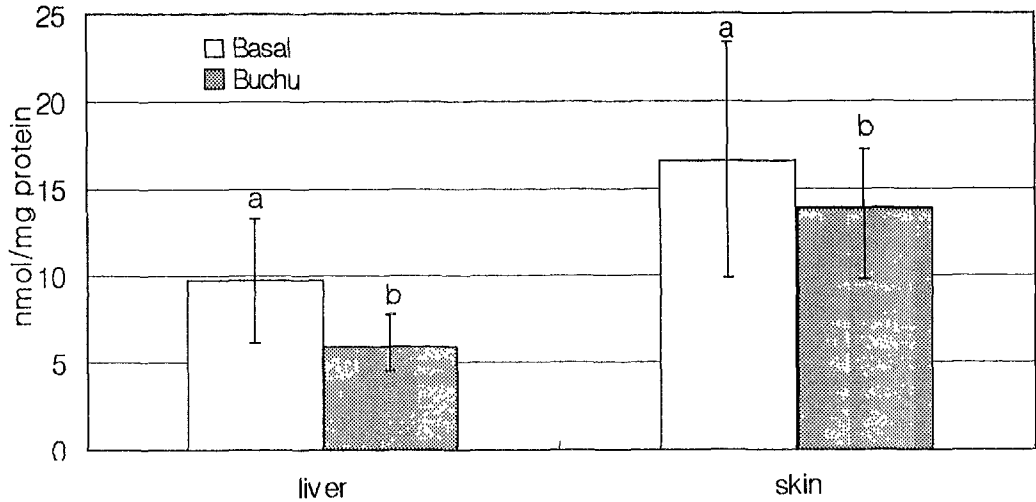


Fig. 22. Hydroxyl radical contents of liver and skin in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu* diet.

마) 눈과 심장조직에서 lipofuscin의 축적

Lipofuscin은 사람이나 동물의 망막의 상피세포의 secondary lysosome에서 나이가 들에 따라 축적되는 노화관련색소이다. 이러한 lipofuscin은 산화적인 스트레스에 의해 형성된다는 주장이 강하게 지지되고 있는데 lipofuscin의 잘 알려진 물리적 특성은 UV를 조사하였을 때 yellowish-reddish의 자가 형광성을 가진다는 것이며 lipofuscin 부근에 산소가 있으면 superoxide나 일중항 산소 같은 활성 산소종으로 활성화되기 때문에 광산화 과정을 유발하는 것으로 알려져 있다.

따라서 RPE 세포가 UV에 노출되면 lipofuscin 근처를 둘러싸고 있는 secondary lysosome의 막은 산화적 스트레스를 받기 쉽다. RPE 세포내에 lipofuscin이 축적된 secondary lysosome의 양이 충분히 많으면 세포퇴화가 일어나고 cell death를 일으키기도 한다. 이러한 lipofuscin은 신경세포, 심근세포, RPE 세포 등에 축적되어 심장이나 골격근에서 측정할 수 있으며, 간에서는 retinal의 방해형광이 커서 측정이 불가능하다.

Streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 흰쥐에 10% 부추식이를 공급한 후 눈과 심장에서 측정된 lipofuscin의 함량은 Fig. 23과 같다. 당뇨 대조군에서 측정된 lipofuscin의 함량을 기준으로 하였을 때 부추군의 눈과 심장에서의 lipofuscin의 함량은 전반적으로 당뇨 대조군보다 낮은 값을 나타내었으나 그다지 효과는 없었다.

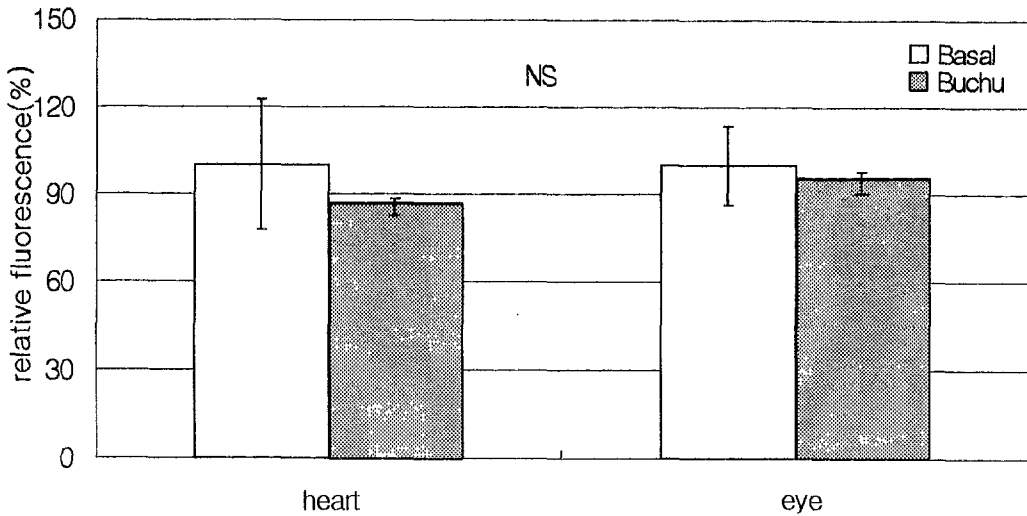


Fig. 23. Relative fluorescence of lipofuscin of heart and eye in streptozotocin-induced diabetic rats fed *Buchu* diet.

2) 부추 에틸아세테이트 획분의 섭취가 미치는 영향

In vitro 실험에서 가장 항산화 효과가 높은 것으로 나타난 dichloromethane과 ethylacetate 획분을 첨가하여 제조한 식이를 정상쥐 및 당뇨쥐에게 8주간 공급하였다.

가) 간과 피부조직의 산화

Behrens와 Madea는 free radical은 정상적인 체내의 대사과정에서도 생성되지만 당뇨쥐에서는 free radical 생성계가 정상쥐에 비해 더욱 촉진되어 지질과산화가 가속화되고 조직의 과산화적 손상도 쉽게 초래된다고 하였다. 부추에서 항산화 효과가 높은 추출물을 급여한 정상쥐 및 당뇨쥐의 간과 피부조직에서의 지질의 산화 정도를 측정된 TBARS 함량은 Fig. 24와 같았다. 당뇨로 인하여 지질의 과산화가 정상쥐에 비해 간에서는 20.72%, 피부에서는 40.87% 증가하여 Behrens 등의 결과와 일치하였다. 또한 서 등은 황백피와 두릅나무 혼합 추출물을 STZ 당뇨유도쥐에 투여하여 간과 췌장에서의 지질과산화가 감소하였다고 보고하였으며, 황 등은 김치를 용매별로 분획하여 고콜레스테롤 식이를 급여한 토끼에서 지질 산화 억제효과를 측정하였을 때 dichloromethane층 첨가군에서 가장 높았다고 하였다. 본 실험에서도 부추의

dichloromethane과 ethyl acetate 획분은 정상쥐 및 당뇨쥐에서 지질 과산화 반응을 억제하는 것으로 나타났다.

간과 피부조직에서 지질의 산화는 당뇨로 인해 증가하였는데 이는 STZ으로 당뇨를 유도한 쥐의 간에서 TBARS 함량이 증가했다고 보고한 Shah 등의 결과와 일치하였다. 또한 부추의 용매추출물을 첨가한 식이군에서의 지질 산화가 감소하는 경향을 나타내었다.

2,4-dinitrophenyl hydrazine(DNPH)을 이용하여 측정한 결과(Fig. 25), 간과 피부조직 모두에서 단백질의 산화정도는 정상군과 비교시에 당뇨군에서 증가하였으며 특히 피부에서 단백질 산화가 현저히 증가함을 볼 수 있었다. 부추 추출물 식이군의 간에서는 단백질의 산화가 억제되는 것으로 보였으나 유의차는 없었으며 피부에서는 유의적인 효과가 있었다.

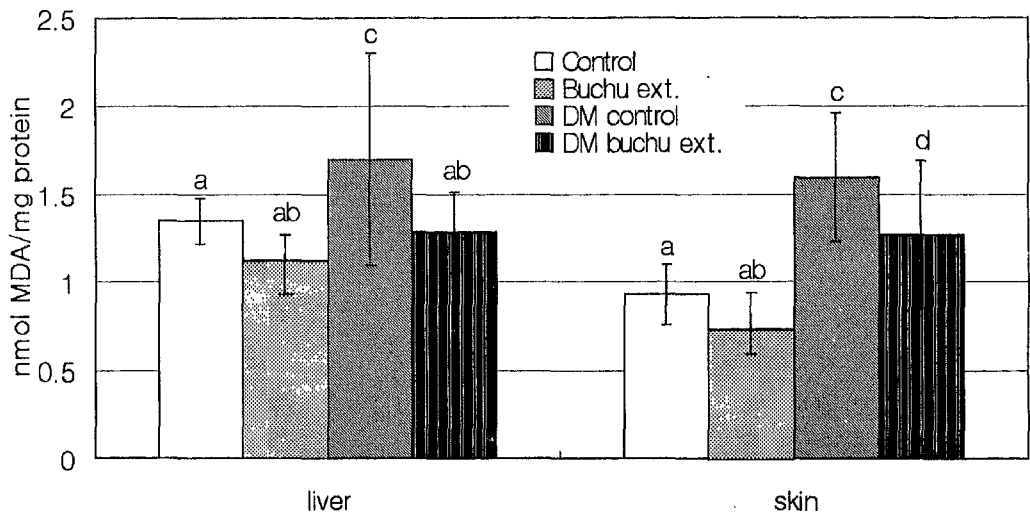


Fig. 24. TBARS contents of liver and skin in normal and STZ-induced diabetic rats fed *Buchu* extract diet.

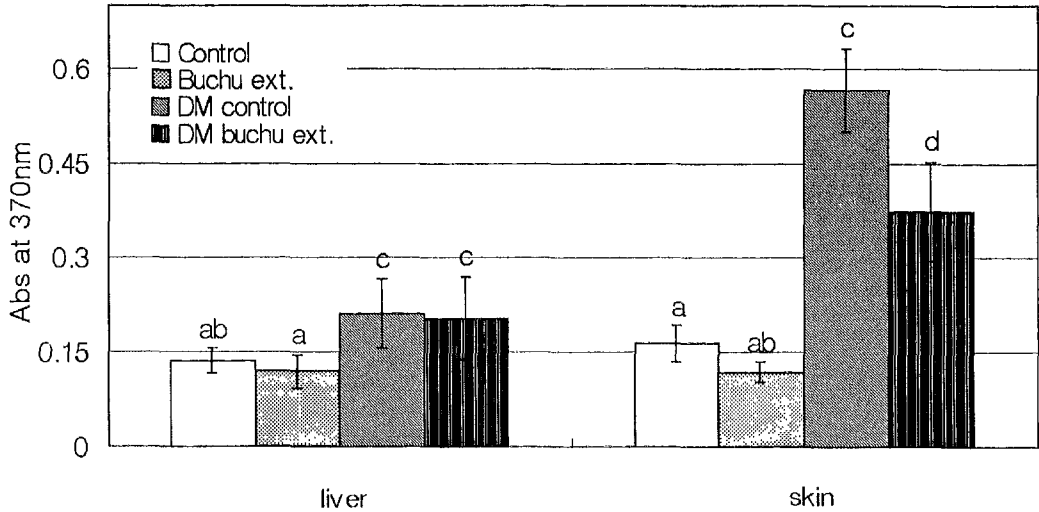


Fig. 25. Protein carbonyl values of liver and skin in normal and STZ-induced diabetic rats fed *Buchu* extract diet.

다) 간과 피부에서 항산화 효소계의 활성

항산화 효소의 활성을 측정된 결과(Fig. 26-28), 정상쥐와 비교시에 당뇨쥐에서 효소의 활성이 감소하였는데 이는 당뇨쥐에서는 항산화 효소계의 활성이 변하여 감소한다고 했던 Matkovic 등의 결과와 일치하였다. SOD의 경우, 정상쥐와 비교시에 당뇨로 인하여 조직에서의 효소활성이 감소하였으나 추출물 식이의 공급으로 유의차는 없었지만 다소 활성이 증가하는 경향을 보였다. SOD는 산화적 스트레스로부터 세포나 호기성 유기체를 보호하는데 중요한 역할을 하는 효소로서 효소가 가지고 있는 금속이온의 산화·환원과 연관지어 superoxide radical에 전자를 전달하여 독성의 superoxide radical을 제거한다. 당뇨로 인하여 조직에서의 과산화적 손상이 증가하여 radical의 생성 또한 정상상태에서보다 증가하였는데 부추 추출물의 공급으로 효소활성이 다소 증가하여 과산화적 손상을 감소시키는 것으로 생각된다.

Catalase는 대사과정 중 발생하는 활성산소종의 유리기를 제거할 뿐만 아니라 이들 활성산소종에 의해 그 활성이 비가역적으로 불활성화 될 수 있으며, 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 것으로 보고되어 있다. Catalase 또한 당뇨로 인하여 그 활성이 감소하였으나 정상쥐의 간에서 추출물 식이를 공급받은 경우 효소의 활성이 유의적으로 증가하였다. 하지만 당뇨쥐에서는 유의차를 보이지 않았다. GSH-Px의 활성은 당뇨로 인하여 간에서 효소의 활성이 급격히 감소하였으며 정상쥐

의 간에서는 유의적으로 활성이 증가하였지만 당뇨쥐에서는 유의차를 나타내지 않았다.

정상쥐에서의 추출물을 이용한 연구에서 도토리 추출물은 고지방 식이로 인한 항산화 효소활성을 정상수준으로 완화시켜주었고, 쪽 추출물의 투여는 흰쥐의 항산화 효소계의 활성을 증가시켰으나, 부추의 용매 분획물을 STZ으로 당뇨를 유발시킨 흰쥐에게 공급하였을 때 항산화 효소계의 활성에서 유의적인 차이를 나타내지 않았는데, 이것은 정상쥐와는 다르게 당뇨와 같은 병리적 기전에 의해 효소의 활성이 증가하지 않은 것으로 생각된다.

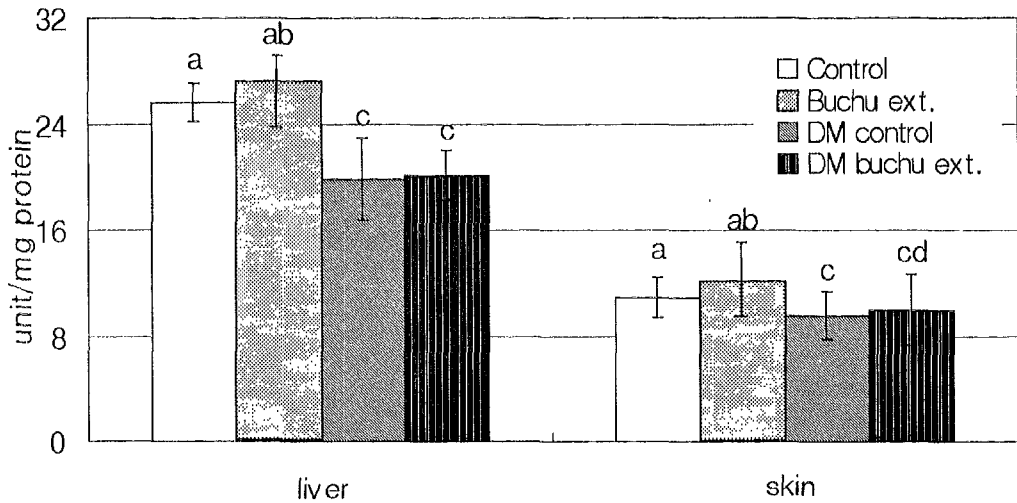


Fig. 26. SOD activities of liver and skin in normal and STZ-induced diabetic rats fed *Buchu* extract diet.

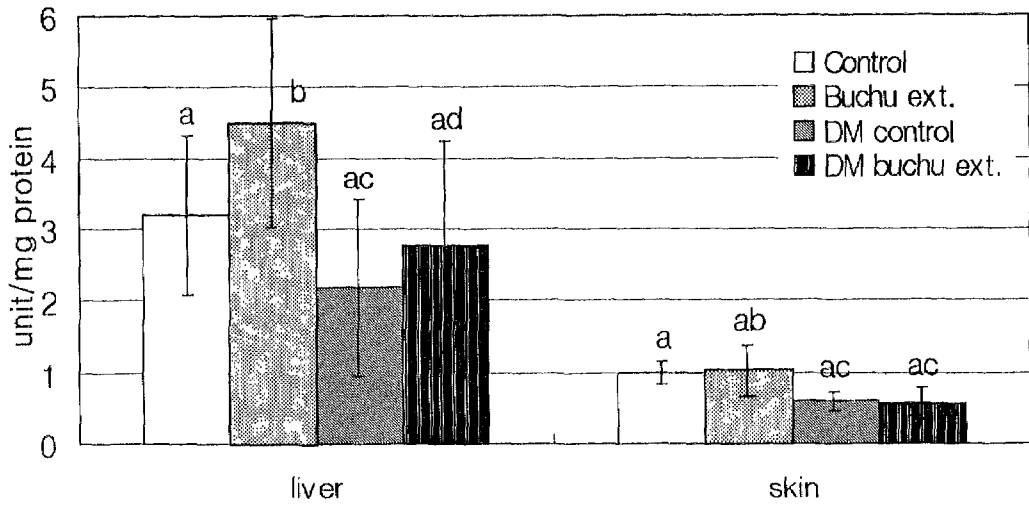


Fig. 27. Catalase activities of liver and skin in normal and STZ-induced diabetic rats fed *Buchu* extract diet.

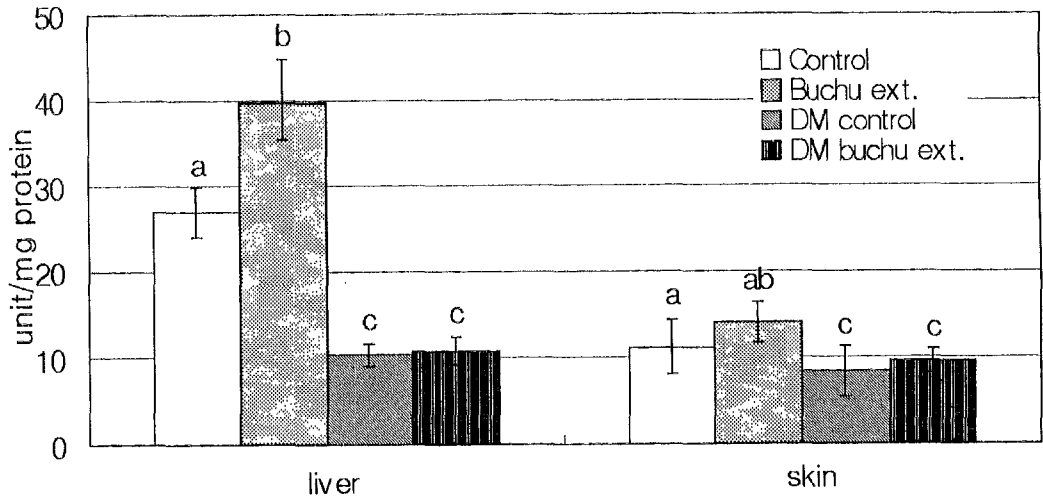


Fig. 28. GSH-Px activities of liver and skin in normal and STZ-induced diabetic rats fed *Buchu* extract diet.

라) 간과 피부에서 hydroxyl radical의 함량

Hydroxyl radical은 Haber-Weiss 반응에 의해 superoxide anion으로부터 형성되거나 Fenton 반응에 의해 hydrogen peroxide로부터 형성되며 전이금속을 필요로 하는 활성산소종으로서, 반응성이 아주 크고 독성을 가지는 산소종이다. 간과 피부조직에서 hydroxyl radical의 함량을 측정한 결과, 정상군 및 당뇨군에서 유의적인 차이는 없었으나 추출물 식이를 공급받은 군에서 hydroxyl radical의 함량이 감소함을 볼 수 있었다(Fig. 29). 이는 생체내에서 활성산소종의 소거능력을 가지는 항산화 효소계인 catalase와 GSH-Px가 hydroxyl radical을 소거하여 독성을 소실시킨 것으로 사료된다.

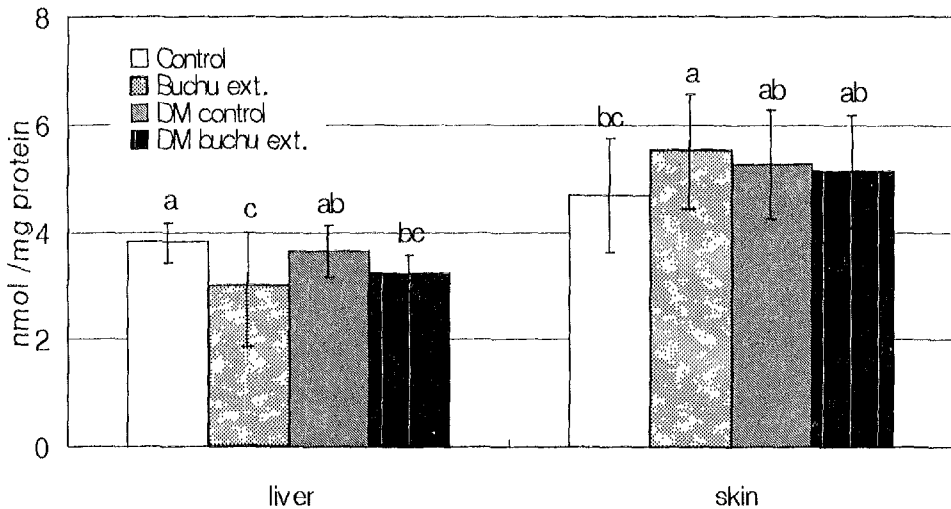


Fig. 29. Hydroxyl radical contents of liver and skin in normal and STZ-induced diabetic rats fed *Buchu* extract diet.

바) 눈과 심장조직에서 lipofuscin의 함량

부추의 항산화 효과가 높게 나타난 ethyl acetate와 dichloromethane 분획물의 급여 후, 눈과 심장조직에서 측정한 lipofuscin의 함량을 Fig. 30에 나타냈다. 축적 정도는 정상군에 비해 당뇨군에서 증가하였고, 추출물 급여군이 basal군보다 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 노화관련색소인 lipofuscin은 다양한 postmitotic cell(감수분열 후의 세포)의 lysosome 내에 축적되고 세포노화의 생화학적 지표로 고려된다. lipofuscin의 축적은 여러 종(species)에서 노화속도

와 일치하며, 대사적인 활성과 산화적 스트레스의 정도에 따른 영향을 받으며, 고농도의 산소와 가시광선에 노출된 망막의 상피세포 내에 위치한다. Julie 등의 연구에서 lipofuscin이 망막세포의 기능을 손상시켜 lysosome의 integrity를 손실시키고 이것이 노화와 관련

된 macular degeneration 같은 질병의 요인이 될 것이라고 했다. 또한 lipofuscin이 가시광선의 illumination으로 지질과산화, 효소 불활성, 그리고 단백질 산화에 기여하는데 이때 항산화제의 첨가로 인하여 lipofuscin의 축적에 이어 나타나는 생체내의 반응들이 유의적으로 감소한다고 보고하였다. 따라서 *in vitro*에서 부추 추출물의 항산화 효과가 높게 나타난 층의 공급으로 lipofuscin의 축적정도가 당뇨군에 비해 감소하였으며, 따라서 lipofuscin 축적으로 인한 2차적 손상이 감소할 것이라고 생각된다.

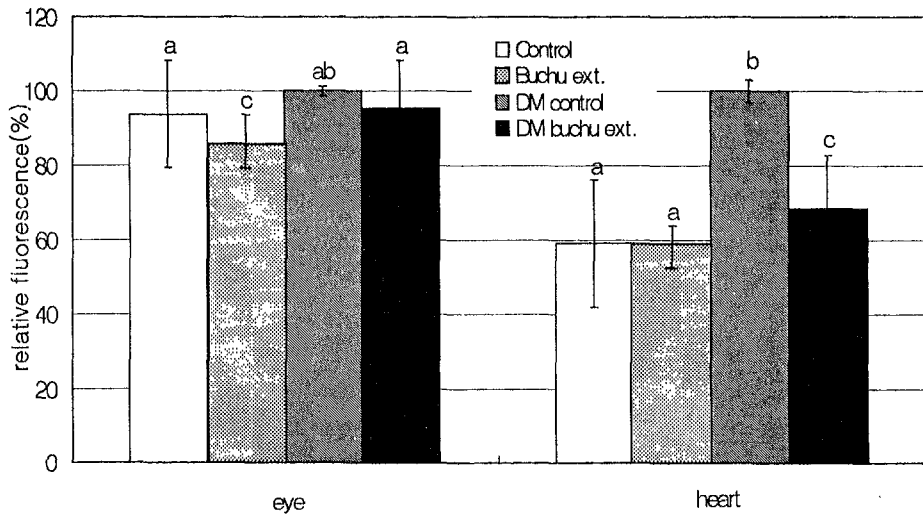
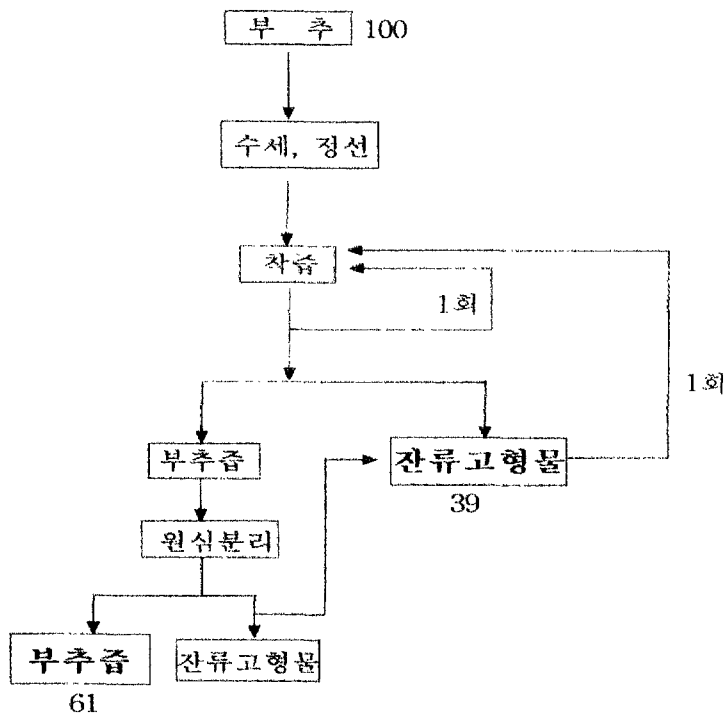


Fig. 30. Relative fluorescence of lipofuscin of heart and eye in normal and STZ-induced diabetic rats fed *Buchu* extract diet.

3. 건강증진 식품소재로서 부추성분별 추출, 가공방법 개발

가. 기능성 부추제품의 개발

1) Process Flow



2) 부추즙과 고형물의 일반특성

가) 착즙수율

분 회 물	수율(wt,%)
부 추 즙	64.7
잔류고형물	35.3

나) 부추 착즙원액의 성질

pH 7.09 (20 C)

색도

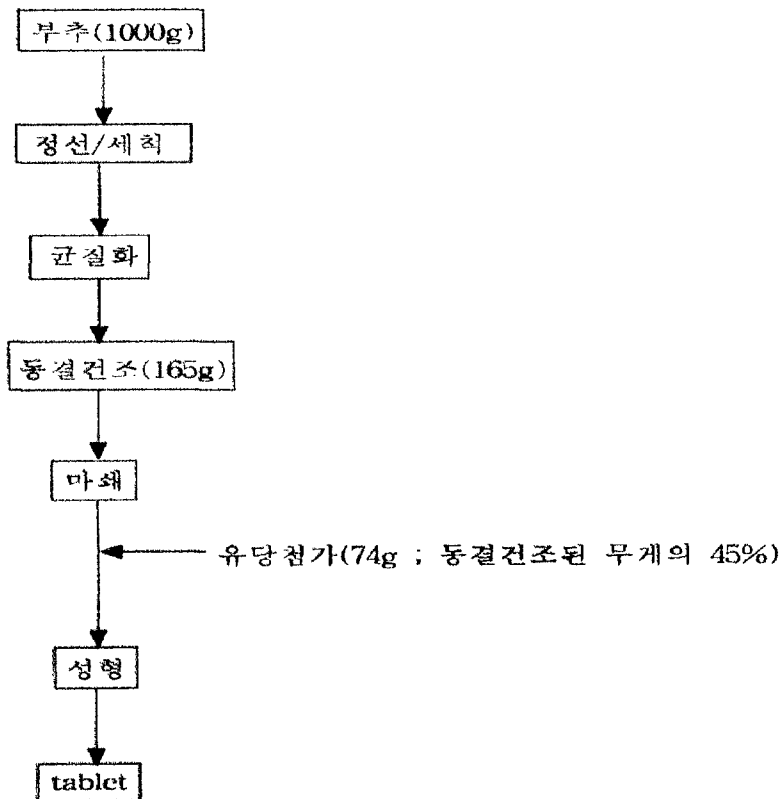
	L	a	b
10배 희석	5.70	-3.36	35.37
20배 희석	20.77	-15.76	35.38
40배 희석	38.45	-13.34	26.03

다) 고형분 함량

종 류	고형분함량(wt,%)
부 추 즙	1.6
추출잔류물	39.2

3) 부추건조 가공품 tablet 제조

부추성분의 열에 의한 변화를 억제하고, 부추 전체를 이용하기 위해 15℃에서 균질화하여 동결건조하였다. 동결건조한 분말은 섬유질로 인해 부피가 커서 바로 tablet으로 만들기는 어려워 마쇄하여 입자크기를 작게 한 뒤 유당(lactose)을 첨가하여 성형하였다.

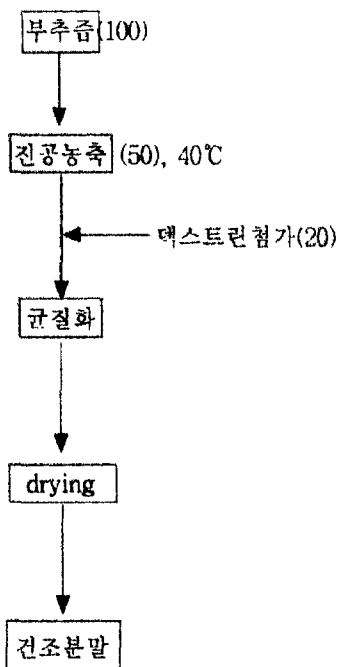


4) 부추즙과 잔류고형물 가공제품

가) 부추즙 건조가공품

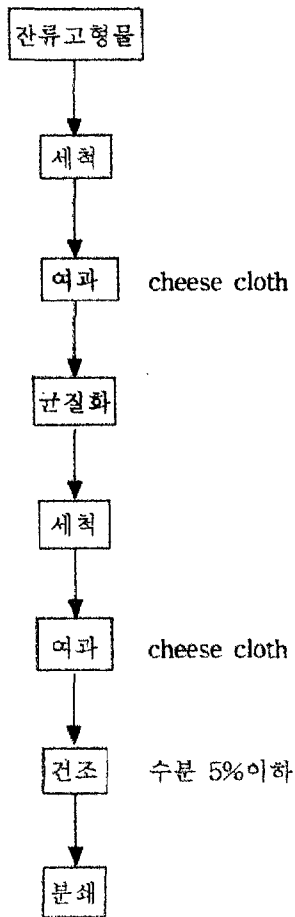
부추즙의 수용성유효성분을 활용하기 위해 착즙한 부추액을 여과하고 원심 분리하여 잔류고형물을 완전히 제거한 액에 덱스트린을 첨가하여 건조하여 분말화하였다. 건강 및 기능성 소재로써 뿐만 아니라 가공식품이나 조미향신료의 원료로써 조리, 가공 후 식품의 특한 맛을 간편하게 부여할 수 있어 용도가 매우 클 것으로 판단된다. 사용목적에 따라 부용재(단백분해물, 불용성 섬유소, 전분등)를 달리하여 만들 수 있다.

앞에서 얻은 부추즙액을 2배로 40℃에서 진공농축한 뒤, 덱스트린을 첨가하여 균질화하고 건조하였다.



나) 잔류고형물 가공제품

잔류고형물은 불용성섬유소가 주성분이므로 가공식품의 증량제나 물성안정제, 또는 건강 식품소재로 사용하기 위해 세척 후 균질화 하였다. 균질화한 불용성물질들을 실온에서 통풍, 건조 후 다시 마쇄하여 미세한 분말로 만들었다.



나. 부추 타블렛의 항산화 효과

부추의 ethyl acetate 획분, hexane 획분 및 부추 tablet(Fig. 31)의 과산화물가를 측정된 결과를 Fig. 32에 나타내었다. 부추 tablet의 경우 ethyl acetate 획분보다 과산화물 생성 억제 정도가 낮았으나, 부추 타블렛 0.1% 시료는 hexane 획분 0.05%시료와 유사한 정도로 과산화물 생성을 억제하였다.

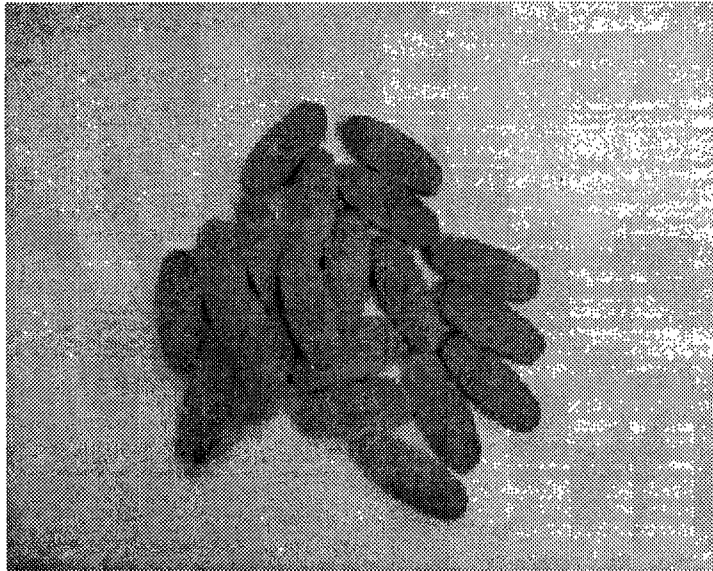


Fig. 31. *Buchu* tablet.

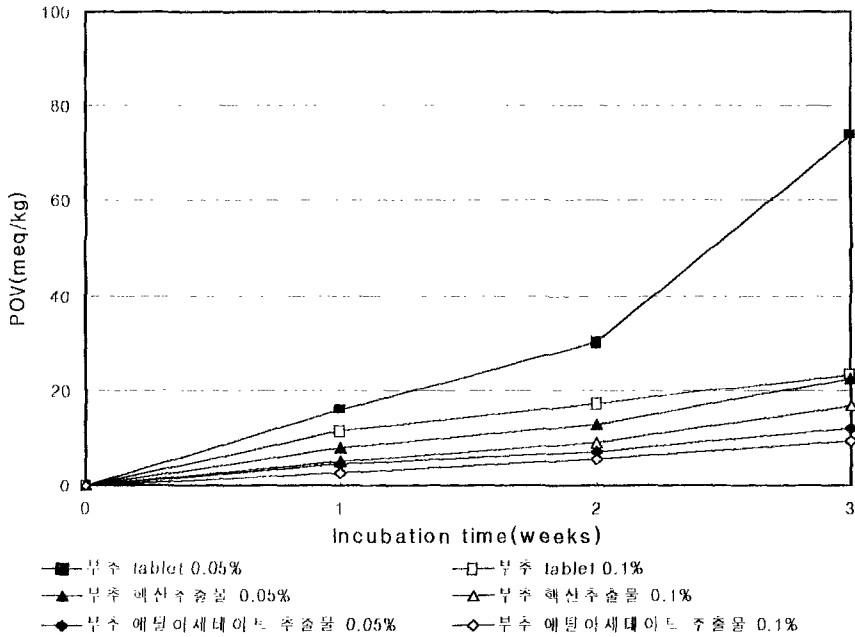


Fig. 32. Peroxide values in solvents of freeze-dried *Buchu* and *Buchu* tablet about linoleic acid emulsion at 50°C.

제 4 절 결론

Streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 흰쥐에게 동결건조한 10% 부추 첨가 식이를 14주간 섭취시킨 경우, 공복 혈당이 감소하는 경향을 보였다. 부추식은 당화 헤모글로빈 수치를 유의적으로 감소시켰으며, 공복시 인슐린과 글루카곤 농도를 저하시켜, 혈당조절 효과가 있음을 나타내었다. 고혈압쥐에서도 장기간의 부추 섭취는 식후 혈당치 증가를 완만하게 하였다. 부추의 혈당조절 기전으로 소화관 이동 속도의 저하, 탄수화물 소화효소 활성 저해 및 인슐린 리셉터의 조절이 제시되었는데, 탄수화물 소화효소 활성의 저해가 주된 작용기작으로 나타났다. 부추 계통분획물 중 α -glucosidase 저해활성은 헥산층과 에틸아세테이트층에서, α -amylase 저해활성은 헥산층에서 높게 나타났다. 당뇨쥐에게 에틸아세테이트 획분을 8주간 섭취시킨 경

우, 당화 헤모글로빈의 수치를 유의적으로 감소시켰으며, 포도당 부하시 혈당치 증가를 완만하게 하는 경향이 있었다. 따라서 부추의 식이섬유와 에틸아세테이트 획분이 항당뇨 효과를 나타내며, 에틸아세테이트 획분은 소장에서 탄수화물 소화효소 활성을 저해하여 혈당조절에 기여하는 것으로 사료된다.

부추를 용매별로 분획하여 항산화 효과를 측정한 결과, ethyl acetate층과 dichloromethane층에서 높은 항산화 효과를 보였다. Streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 흰쥐에게 10% 부추식이를 급여하여 14주간 사육한 후 지질 및 단백질의 산화를 측정한 결과, 피부조직에서는 부추식이가 유의적으로 조직의 산화를 억제하였고 간에서는 다소 억제하는 경향을 보였다. 당뇨쥐의 SOD와 catalase의 활성은 부추식이군에서 증가하였으며 특히 SOD는 피부에서, catalase는 간에서 유의적으로 높았다. 활성산소종인 superoxide anion과 hydroxyl radical의 함량은 부추당뇨군에서 당뇨대조군보다 유의적으로 감소하였다.

부추의 ethyl acetate분획물을 첨가한 식이는 정상쥐와 당뇨쥐 모두 조직의 지질 산화를 억제하였다. 단백질 산화정도는 당뇨쥐의 피부에서 매우 증가하였으나, 식이 중의 부추추출물은 단백질 산화를 유의적으로 감소시켰다. 항산화 효소계인 SOD, catalase, GSH-Px의 활성을 측정한 결과, 정상쥐의 간에서는 부추 추출물 첨가 식이가 유의적인 차이를 보였지만 당뇨쥐에서는 효소의 활성에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Lipofuscin의 축적정도는 당뇨군에서 증가하였는데, 부추 추출물 첨가는 lipofuscin의 축적정도를 감소시켰다. 따라서 부추의 항산화효과는 당뇨합병증 예방에 도움이 되리라 사료된다.

압착에 의해 분리된 수용성추출액과 고형분의 중량비는 각각 64.7%와 35.3%였다. 증온(40℃), 감압상태에서 부추의 수용성 추출액은 16시간 후 초기중량의 21.7%까지 농축되었다. 부추 수용성 추출액의 동결은 -1.5℃에서 일어난 뒤 온도의 상승을 수반하면서 -1.2℃에서 완전히 동결되었다. 추출된 부추즙의 고형분함량은 1.6%이었으며, 잔류고형물의 수분 함량은 60.8%로 나타났다. 잔류 고형분에 남아 있는 부추 수용성 물질을 세척, 여과과정을 거쳐 분리하여 앞에서 얻은 수용성 추출액과 합쳐 농축하였다. 부추전체를 저온에서 마쇄하여 동결, 건조하여 타원형의 타블렛으로 만들었다. 45%의 유당을 첨가하여 타정된 입자의 크기는 13 x 8 mm로 이용하기에 알맞았다. 분리 후 건조된 불용성섬유질은 분쇄하여 가공식품이나 건강식품의 보조제로 사용할 수 있도록 하였다. 제조한 부추 타블렛은 과산화물 생성을 억제하였다.

참고문헌

1. al-Attas OS, al-Dagheri NM, Vigo NT :Vanadate enhances insulin-receptor binding in gestational diabetic human placenta. *Cell Biochem Funct.* Mar:13(1):9-14(1995)
2. Blois M. S., Antioxidant determination by the use of stable free radical, *Nature*, **26**, 1199(1958)
3. Choi J. H. and Yu B. P., The effect of food restriction on kidney membrane structure of aging rats, *AGE*, **12**, 133-136(1989)
4. Fickova M, Hubert P, Klimes I, Staedel C, Cremel G, Bohov P, Macho L: Dietary fish oil and olive oil improve the liver insulin receptor tyrosine kinase activity in high sucrose fed rats. *Endocr Regul* Dec:28(4):187-97(1994)
5. Hammerschmidt P. A. and Pratt D. E., Phenolic antioxidants of dried soybean, *J. Food Sci.*, **43**, 556(1978)
6. Hayase F. and Kato H., Antioxidative components of sweet potatoes, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **30**, 37(1984)
7. Knott RM, Grant G, Bardocz S, Pusztai A, de Carvalho AF, Hesketh JE: Alterations in the level of insulin receptor and GLUT-4 mRNA in skeletal muscle from rats fed a kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) diet. *Int J Biochem. Jun*:24(6):897-902(1992)
8. Lawrence R. A. and Burk F., Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **71**, 952(1976)
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J., Protein determination with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
10. MacDonald RS, Steel-Goodwin L, Smith RJ: Influence of dietary fiber on insulin receptors in rat intestinal mucosa. *Ann Nutr Metab* 35(6):328-38(1991)
11. Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351(1979)

12. Oliver C. N., Ahn B, Moerman E. J., Goldstein S. and Stadman E. R., Age-related changes in oxidized proteins, *J. Biol. Chem.*, **262**, 5343(1987)
13. Pezzino, V., Papa, V., Trischitta, V., Brunetti, A., Goodman, P.A., Treutelaar, M.K., Williams, J.A., Maddux, B.A., Vigneri, R. and Goldfine, I.D.: Human insulin receptor radioimmunoassay: applicability to insulin-resistant states. *J. Physiol.*, 257:(endocrinol metabol. 20): E451-457(1989)
14. Stansbie D., Brownsey R. W., Crettaz M. and Denton R. M., Acute effects *in vivo* of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl CoA carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats., *Biochem. J.*, **169**, 413(1976)
15. Thomson K. H., Godin D. V. and Lee M., Tissue antioxidant status in streptozotocin-induced diabetes in rats. Effects of dietary maganase deficiency, *Biol. Trace Elem. Res.*, **35**, 213(1992)
16. Wang, Z., Bell-Farrow, A.D., Sonntag, W. and Cefalu, W.: Effect of age and caloric restriction on insulin receptor binding and glucose transporter levels in aging rats. *Experimental Gerontology* 32: 671-684(1997)
17. Watanabe, J, Kawabata, J., Kurihara, H., and Niki, R.: Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from Tochu-cha(*Eucommia ulmoides*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 177-178(1997)