

강원도산 상엽과 누에의 혈당강하 활성물질의 특성

김성훈 · 김금수¹ · 이진하 · 정을권² · 박영식² · 박유정³ · 이현용*

강원대학교 식품생명공학부, ¹미국 국립 건강 연구소,
²명진농장 건강식품 연구소, ³기린 농협, 가공 사업부

Comparison of Glucose-lowering Activity of the Extracts from Kangwon-do Mountain Mulberry Leaves (*Moli Folium*) and Silk Worm. Sung-Hoon Kim, ¹Keum-Soo Kim, Jin-Ha Lee, ²Eul-Kwon Chung, ²Young-Shik Park, ³You-Jeong Park and Hyeon-Yong Lee. Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea, ¹National Institute of Health, Bethesda 20892, USA, ²Research Institute of Health Food, MyungJin, Inje 250-852, Korea, ³Department of Food Processing, Kirin Agricultural Cooperatives, Inje 250-852, Korea - It was proved that both ethanol extracts from *Mori Folium* from Kangwon do and silk worm had higher inhibition activity on α -glucohydrolase than the water extracts. In adding above 8.5 (mg/L) of silkworm extracts, the inhibition rate on α -1,4 glucosidase was saturated while the inhibition rate was continuously increased in adding the extracts from *Moli Folium*. It was also found that the diethyl ether fraction showed much better inhibition activity than water fraction from ethanol extracts, yielding ca. 85% of inhibition rate for the extract of *Moli Folium*, compared to 91% for a commercially available hypoglycemic drug, Chlorpropamide. In separating the diethyl ether fractions by Consecutive Sephadex gel filtration and Thin layer chromatography, three and four active spots were obtained from *Moli Folium* and silkworm, respectively. It is interesting that the similar Rf spots from both species among several spots in TLC have the highest inhibition activity on a target enzyme, which can imply that the active substances from both species are same or similar molecular weight and structure. Glucose-lowering activities of both species were also examined *in vivo*, showing that the fraction from *Moli Folium* had better activity than that from silkworm, and its activity was similar to that of a commercial drug.

최근 건강 식품에 대한 일반 소비자들의 요구가 급증하면서 다양한 형태의 건강식품들이 개발되고 있다(1-3). 이들 중 최근 관심이 증가되는 것의 한 부분이 인체 내 혈당 조절에 의한 당뇨병(diabetes mellitus)의 예방 및 치유 효과가 있는 천연 식품 및 이들 소재의 개발이다(4,5). 이를 위해 현재 고로쇠 수액, 옥수수 수염 등 수종의 식품들이 관심의 대상이 되고 있으나 당뇨의 여러 병리 특징들 때문에 이 식품들의 정확한 효과가 학술적으로 입증되지 못하고 있다. 이에 최근에는 누에 가루가 당뇨에 좋다는 보고가 있어 이들을 이용한 기능성 식품들이 개발되고 있다(6). 하지만 이 누에 고치를 이용한 식품은 누에 자체가 주는 혐오성 때문에 식품으로 상용화 하는데 식품 및 소비자 정서상 많은 문제점들이 있다. 또한 누에를 생산하기 위해 투자되는 비용들이 경제성 해결을 위한 난제로 작용하고 있다. 더군다나 이 누에의 어떤 특정 성분이 당뇨에 효과가 있는지는 아직 연구가 진행 중이며, 지금까지는 누에내 어떤 특정 물질이 당 결합에 관여하는 α -

glucohydrolase의 저해를 통해 당뇨에 효과가 있을 것이라고 추측되고 있는 실정이다(7, 8). 이에 누에의 주 영양원인 상엽이 동의보감 등 민간 처방에서도 혈압 강하 및 당뇨에 효험이 있는 것으로 보고되고 있다(9).

따라서 본 연구는 누에 사육을 위해 집단으로 재배하는 청일뽕과 같은 재배엽이 아닌 강원도 산에 야생으로 생육하는 상엽의 혈당강하 기능을 확인하고자 한다. 또한 이 물질의 추출 및 규명과 누에 고치 성분내 존재하는 성분들과의 비교를 통해 현재 상용 식품으로 제품화하기에 여러 문제점이 있는 누에 고치를 대체할 수 있는 기능성 식품의 개발을 위한 자료를 제공하고자 한다. 특히 α -glucohydrolase 는 현재 혈당 조절에 사용되는 다른 약물들과는 달리 저혈당을 일으키지 않으며 불필요한 인슐린 분비를 억제해 인슐린 비 의존성 당뇨환자들에게 분비 능력을 유지시켜 주는 특징이 있어(10)이 단백질을 이용한 기능성 식품으로 개발시 많은 장점이 있을 것이다.

재료 및 방법

시료의 제조

본 실험에 사용한 상엽은 강원도 인제군 야산에 자연

*Corresponding author

Tel. 82-361-50-6455, Fax. 82-361-56-4819

E-mail: hyeonl@cc.kanwon.ac.kr

Key words: Mulberry leaves, Silk worm, Glucose-lowering activity, Diabetes mellitus

으로 서식하는 상백나무에서 채취해 열풍 건조 후 잘게 썰어 추출시 사용했다. 누에는 잠엽 협동조합에서 5령 3일간 기른 것을 동결 건조해 분쇄된 시판 가루를 실험에 사용했다. 각 시료들을 식용으로 가능한 추출 용매인 물과 에탄올을사용해 1:10 비율로 넣어 추출했다. 각 용매의 비등점에서 24시간 동안 추출후 0.45 um 구멍 크기의 여과지에서 걸러진 용액을 감압 진공 농축기에서 8시간 농축한 후 동결 건조기에서 12시간 동안 건조시켜 완전한 분말을 얻어 시료로 사용했다. 또한 얻어진 조시료들의 활성 증진을 위해 각 시료를 분획여두에 넣고 증류수를 첨가한 후 동량의 diethyl ether 로 진탕 현탁시켜 5시간 정치해 수층과 유기층으로 분획했다. 이같이 분리된 각층을 모아 감압 농축기에 넣고 농축후 동결 건조해 시료로 사용했다.

α-1,4 glucohydrolase 활성 억제 측정

생체내 혈당 상승에 결정적인 역할을 수행하는 α-glucohydrolase(Sigma,USA)의 억제 효과를 검토하기 위해 기질로서 효소를 pH 6.8의 PIPES buffer에 녹인 후 10 mM maltose와 상엽 추출물을 농도별로 섞어(최종 부피 60 μL) 37°C에서 20분간 반응시켰다. 이 반응액 내 유리된 glucose 양을 측정하기위해 trinder 시약 1 mL를 가한 뒤 실온에서 20분 방치 후 505 nm에서 흡광도를 측정해 시료를 넣지 않은 경우와 넣은 경우의 흡광도 차를 이용해 효소 활성 저해율을 계산했다(1 IU=1.0 μmole/mg/min at 37°C and pH 6.8) (11). 또한 상엽 및 누에 추출물들의 효소 저해 효과를 비교하기 위해 시판되는 혈당 조절 물질인 chlorpropamide(한국 화이자)도 같은 방법으로 첨가해 효소 활성 저해도를 측정했다.

효소 활성 억제 물질의 분리

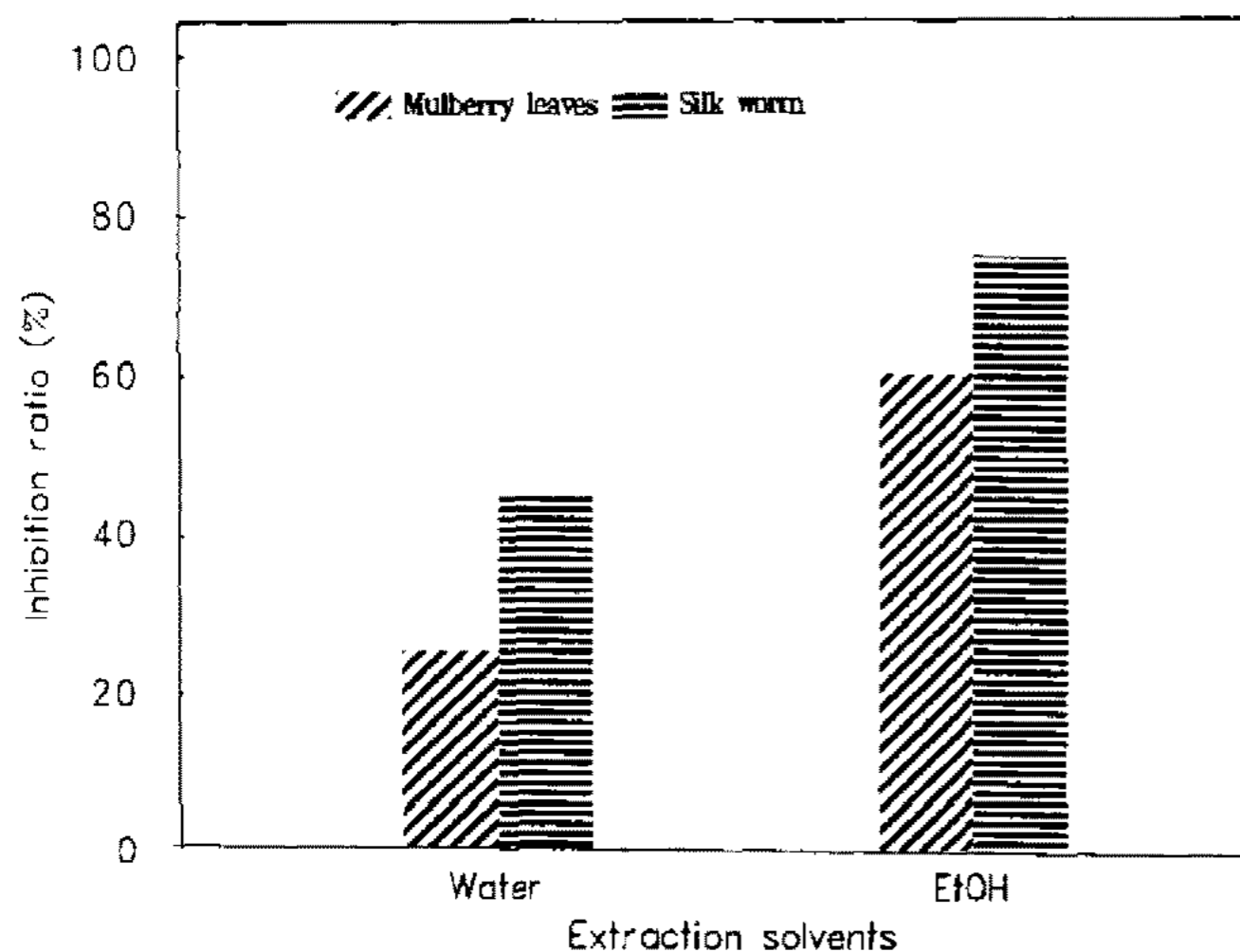


Fig. 1. The ratio of inhibiting α-glucohydrolase in adding the extracts of *M. folium* and silkworm by different extraction solvents.

상기 실험에서 활성이 높은 분획의 분리를 위해 Sephadex G-75 resin(3×50 cm)을 이용해 1.0 mL/min의 속도로 70% ethanol 용액을 용출 시키며 활성 부분을 모았다. 이같이 모아진 분획의 순도를 알기위해 butanol:ethanol:water(2:8:4)의 용액에 섞은 후 silica gel로 coating 한 판으로 Thin layer chromatography (TLC)를 실시했다. 이같이 분리된 spot을 떼어내 상기 방법으로 효소 활성 억제 실험을 실시했다.

in vivo 혈당 강하 실험

상엽 및 누에의 혈당 강하 정도를 *in vivo*로 확인하기 위해 6 주령 mouse를 12시간 절식 후 혈당 활성이 강한 추출 분획 시료와 대조군로 maltose 를 각각 350 mg/Kg 투여해 식후 45분 후에 꼬리 정맥에서 혈액을 채취해 혈액내 glucose 측정 kit(Sigma, USA)를 이용해 시료 투여전 혈당치와 시료 및 대조군 투여후 혈당치를 비교해 그 비율을 45 분후 혈당 강하율로 산출했다(12).

결과 및 고찰

Fig. 1은 상엽과 누에의 추출 용매에 따른 α-glucohydrolase의 활성 저해 효과를 나타낸 것으로 5 (mg/L)의 동일 양의 추출물에 대해 두 시료 공히 ethanol 추출물이 아무것도 첨가하지 않은 대조군에 비해 60-70%의 높은 활성 저해 효과를 나타냈다. 이에 반해 물 추출물의 경우 25-40% 극히 낮은 저해 효과를 보였다. 따라서 시판되는 누에를 가장 보편적인 식용 방법인 열수로 추출해 복용시는 예상 효과는 낮을 것으로 예측된다. 따라서 Fig. 2는 Fig. 1의 결과에 근거해 혈당 강하 효과가 큰 ethanol 조 추출물의 투여 농도에 따른 효소 활성 저해 효과를 나타낸 것이다. 두 추출물다 5 (mg/L) 이하의 낮은 농도에서는 적용 농도에 따라 저해 효과가 비례적으로 증가했으나 8.5 (mg/L) 이상의 시료 투여 농도에서

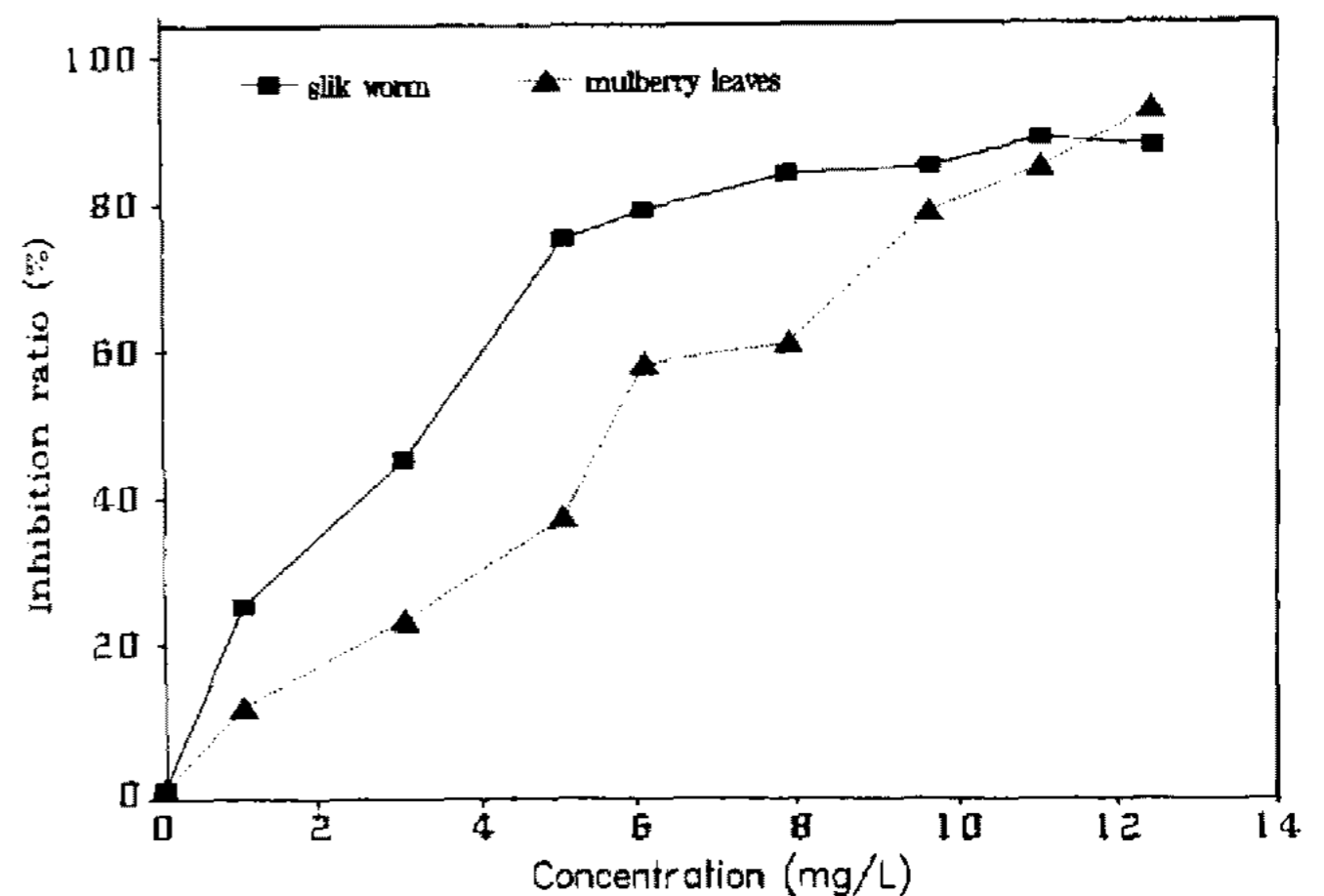


Fig. 2. The comparison of inhibition ratio between ethanol extracts of *M. folium* and silkworm.

는 누에 추출물은 더 이상 증가하지 않는 포화 반응을 보인 반면 상엽 추출물은 지속적으로 증가하는 현상을 보였다. 또한 이 Fig. 2에는 표시되지 않았지만 상엽 추출물의 반응 포화 농도를 알기위해 투여 농도를 지속적으로 증가하며 반응 정도를 확인한 결과 21.5(mg/L)의 농도에 도달했을 효소 저해 정도가 포화 상태에 도달하는 것으로 나타났다. 이 농도는 누에의 효소 반응 포화 농도인 8.5(mg/L) 보다 3배 정도 높은 수치로서, 누에 추출물을 과량 사용한다 할지라도 기대하는 효소 저해 활성이 증가되지 않으나 상엽 추출물의 경우는 어느정도 지속적으로 적용해도 활성 저해 효과가 유지되는 장점을 확인할 수 있다. 또한 고농도 누에 조 추출물의 경우 최대 저해율이 83% 정도로 상엽 추출물의 94%에 비해 상대적으로 두 물질이 효소에 대한 반응 정도가 다름을 알 수 있다. 이는 두 물질이 다르다기 보다는 유사한 형태나 그 반응 정도가 다른 것으로 사료된다. 이는 다음에 기술될 TLC에 의한 분리 결과에서도 설명되고 있다.

Fig. 3은 조추출물의 활성 증가를 위해 diethyl ether 로 분획된 층과 수층을 기존의 혈당강하 약제의 하나인 chlorpropamide를 control로 2.5(mg/L)을, 분획물들은 조추출물 실험(Fig. 2)시 효과가 극히 미약한 5(mg/L)의 농도로 투여해 효소 활성 저해 효과를 비교한 결과다. 상엽과 누에의 수층의 경우는 조추출물들이 대상 효소에 대해 활성 저해 효과가 큰 차이 없어 수층에는 활성 성분이 거의 없는 것으로 예측됐다. 이에 반해 diethyl ether 층의 경우 활성이 80% 이상 증가돼 유용 성분이 유기층에 있음을 알 수 있다. 특히 분획물의 경우 상엽이 누에의 경우 보다 높은 활성을 나타내 지금까지 알려진 누에의 혈당강하 효과보다 상대적으로 우수한 것으로 평가된다. 더욱이 현재 시판되는 제약품이 약 91% 정도의 효과를 내는 것에 비해 상엽 분획물이 85%의 높은 효과를

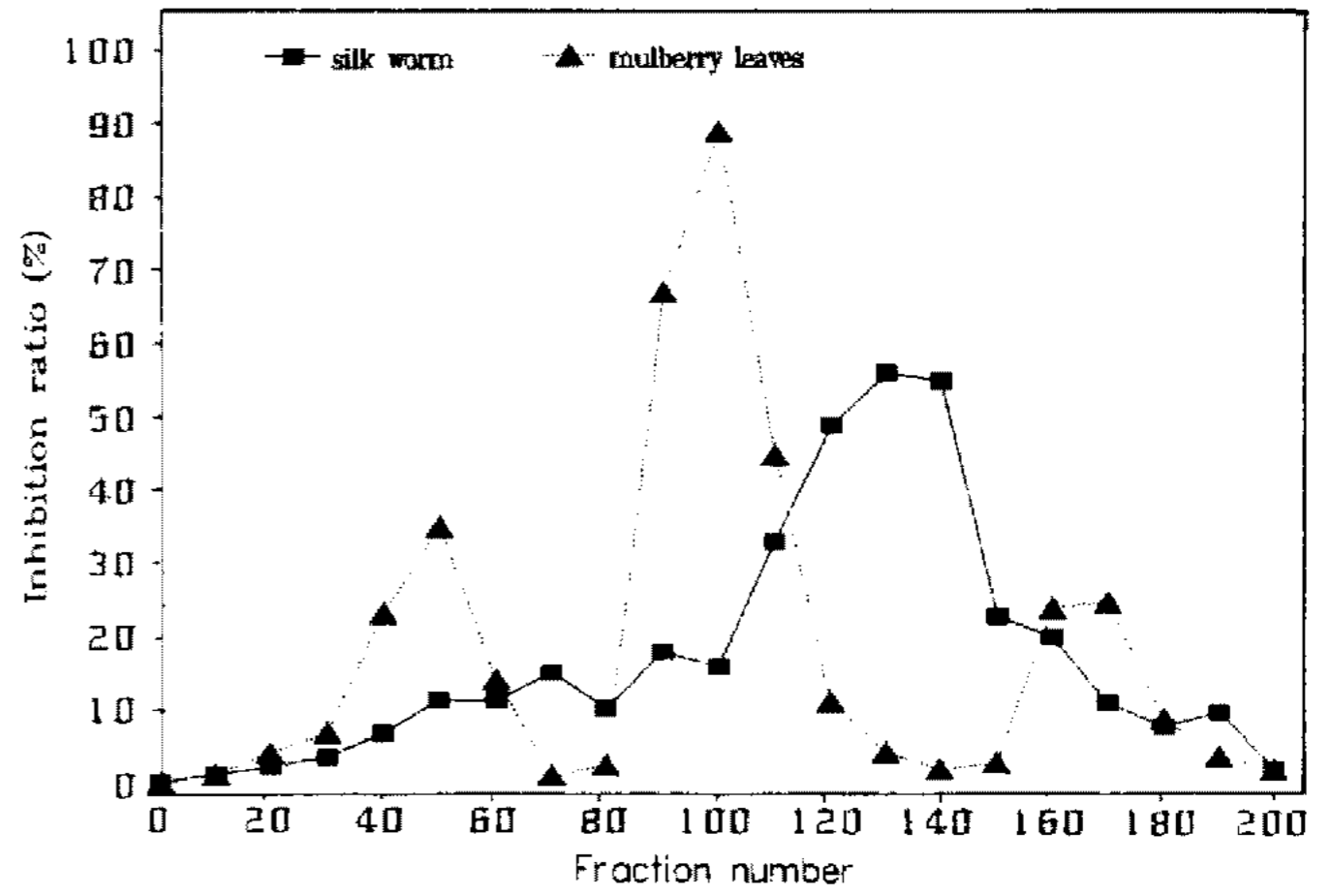


Fig. 4. The results of measuring the inhibition activities of the diethyl ether fractions through Sephadex gel permeation.

나타내 실제적인 임상에서 높은 혈당 조절 기능이 있을 것으로 예측된다.

Fig. 4는 상엽의 ethanol 추출물 중 diethyl ether 분획물의 활성이 높아 이 물질의 분리를 위해 Sephadex resin을 이용해 상엽과 누에 분획물을 분리한 것이다. 컬럼을 통해 나오는 각 분획물에 대해 활성을 측정한 결과 상엽의 경우 전체적인 활성 성분이 세부분에 나타나 반면 누에의 경우 한 부분만 나타났으며 그 활성 정도도 Fig. 3과 마찬가지로 상엽의 경우가 높은 것을 알 수 있다. 상엽의 분리물 중 활성이 적은 부분을 제외하고 활성이 강한 부분과 누에의 활성 부분의 순도를 확인하기 위해 TLC로 분리한 것이 Fig. 5이다. 1차 정제를 통해 얻어진 분리물이 상엽의 경우는 3개, 누에의 경우 4개의 spot을 형성해 단순 1차 분리 만으로는 순수 분리가 힘든 것을 알 수 있었다. 또한 각 분리 spot이 약간의 분자량 차이가 있음이 확인됐으며 이중 한 spot(상엽의 B, 누에의

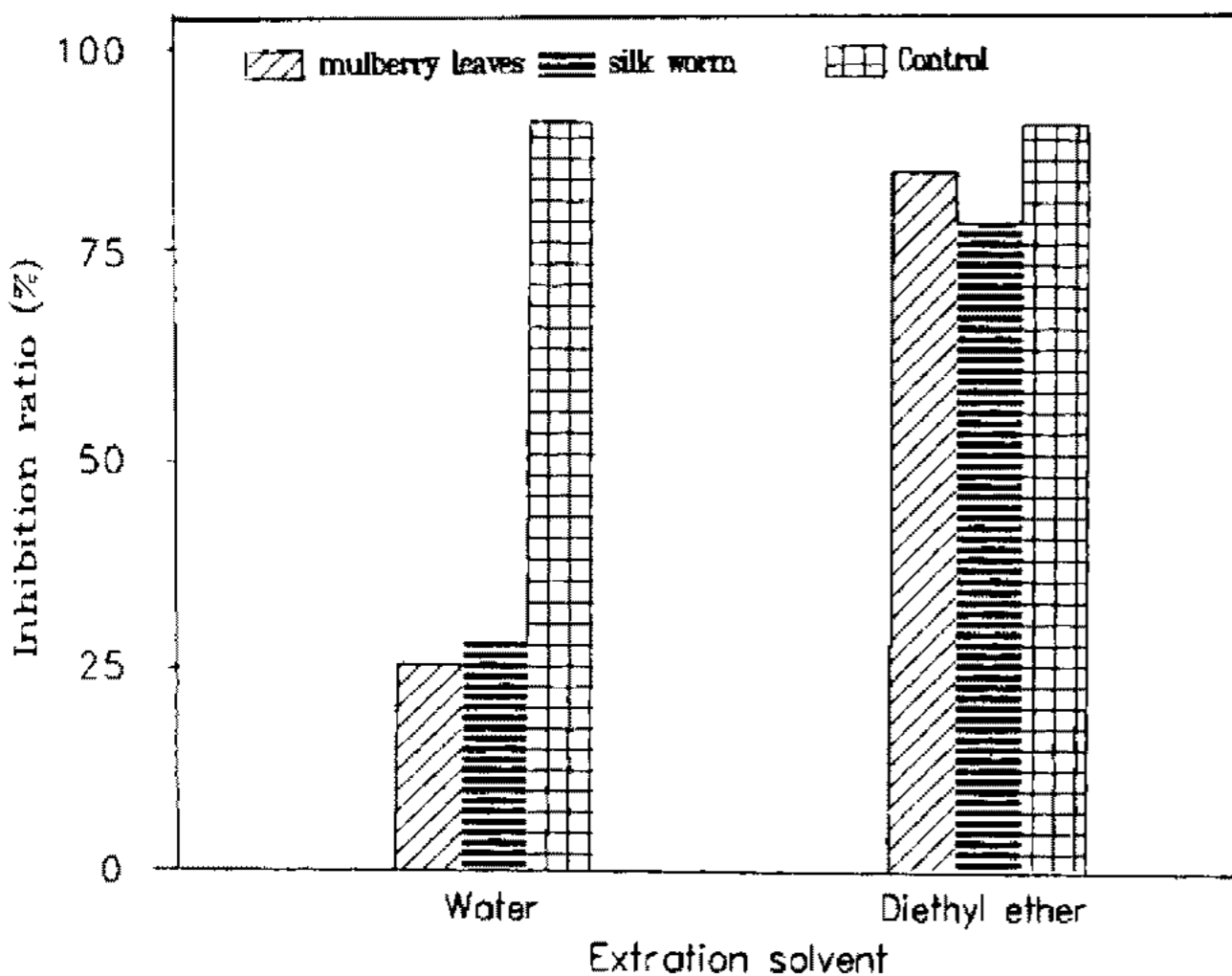


Fig. 3. The comparison of inhibition ratio between two fractions of water and diethyl ether after fractionizing ethanol crude extracts as well as a commercially available drug.

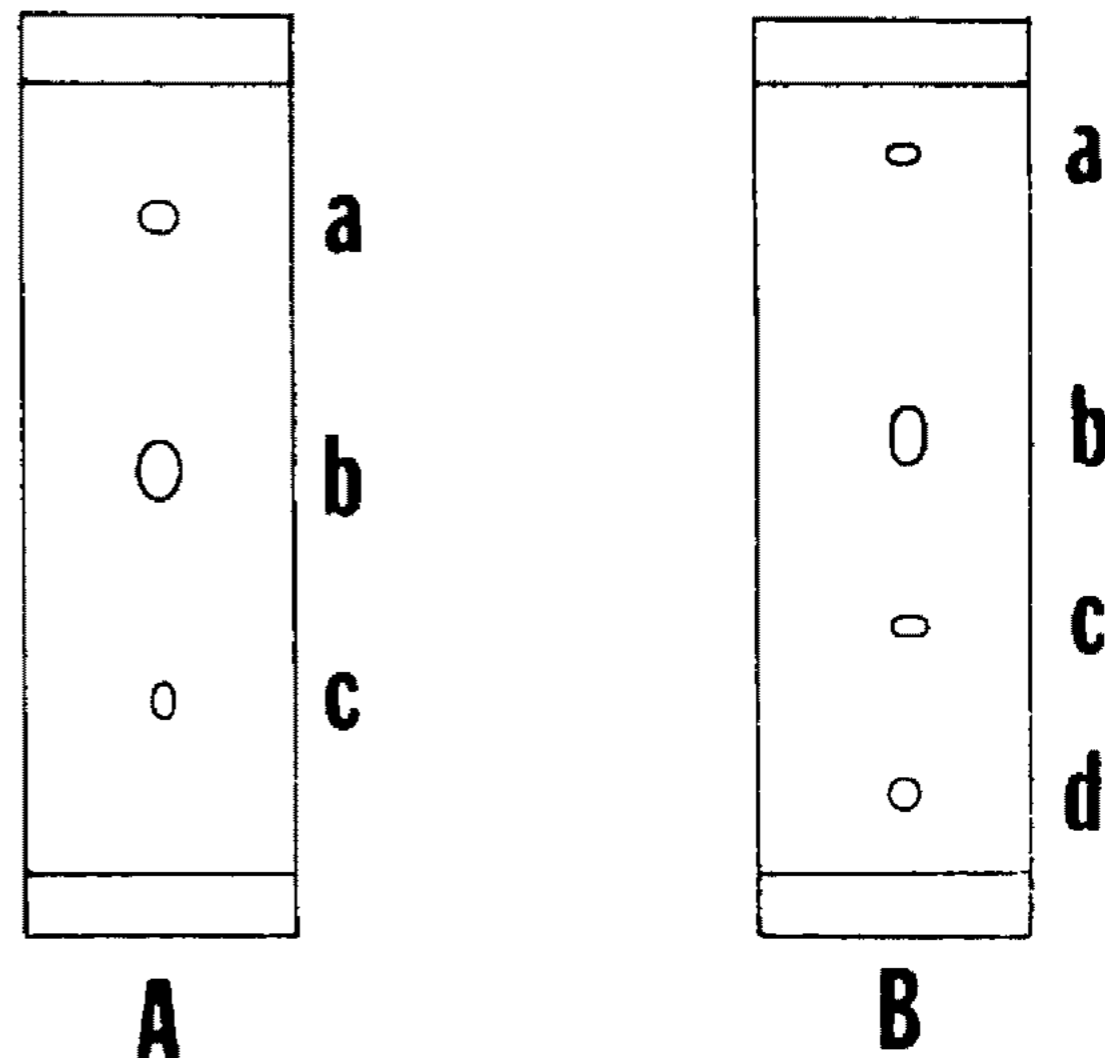


Fig. 5. The profile of spreading the diethyl ether fractions of by thin layer chromatography.

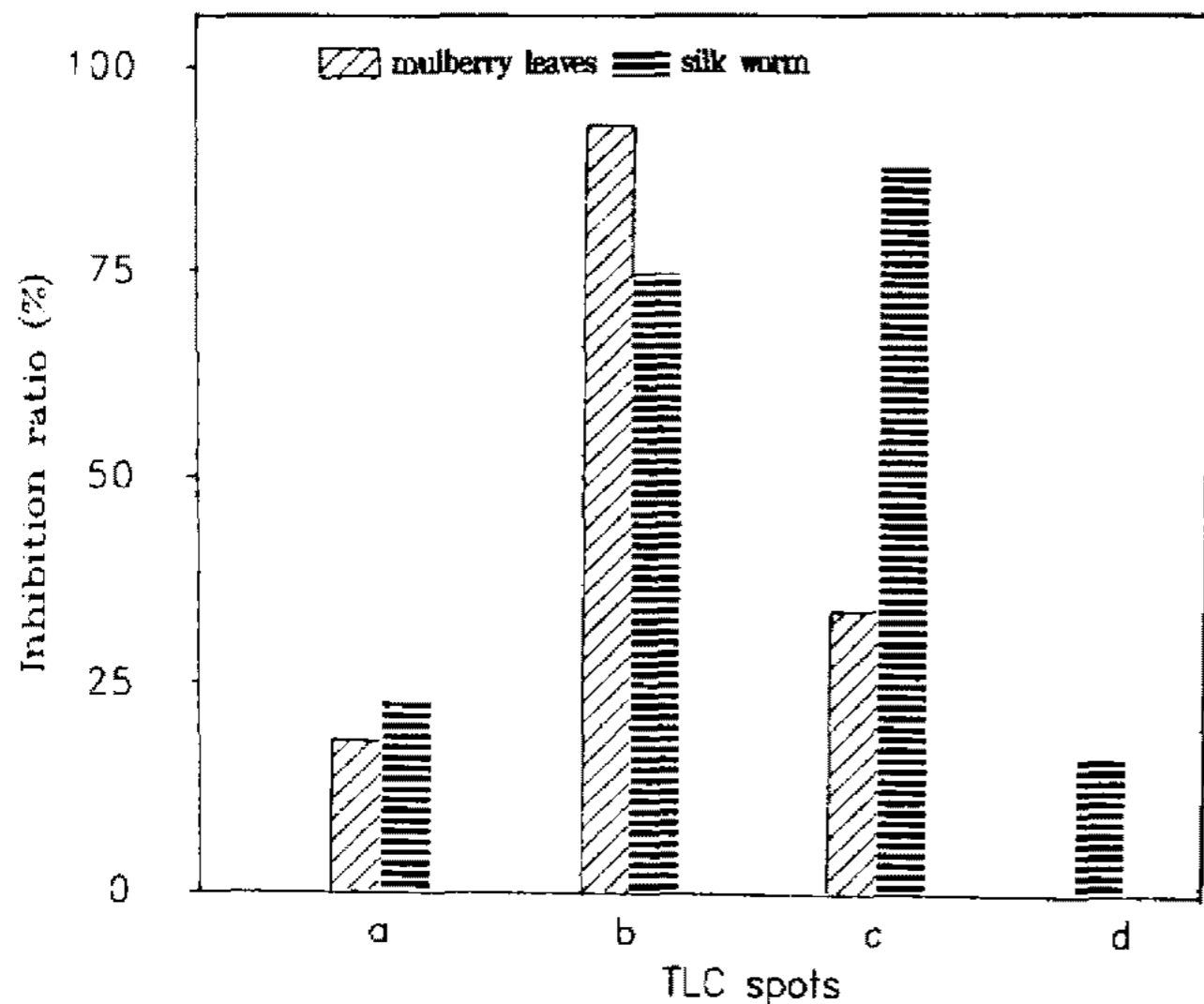


Fig. 6. The comparison of inhibition ratio of several spots in TLC from *M. folium* and silkworm extracts.

C spot)만이 유사한 크기를 갖고 있는 것으로 나타났다. 이같이 순수 분리된 spot의 활성을 비교하기 위해 각 spot 별 효소 저해도를 측정된 결과가 Fig. 6과 같았다. 상엽의 경우 3개의 spot 중 가운데 부분인 B spot이 93%로 가장 활성이 높았으며 누에의 경우는 C spot이 88%로 가장 높았다. 이외 다른 spot들의 경우는 30-50%의 낮은 활성을 보였으며 단지 누에의 B spot의 경우 75%의 상대적으로 높은 활성을 나타냈다. 이로서 상엽과 누에의 혈당 강하 성분들은 서로 같거나 혹은 유사한 구조를 갖고 있음이 유추되며, 또한 이 물질은 누에의 생합성에 의해 생성된 새로운 물질이라기 보다는 상엽에서 유래된 활성 물질일 가능성이 높은 것으로 판단된다. 이 활성 물질의 정확한 구조는 본 연구의 다음 단계로 진행 중이다.

Table 1은 앞 실험들에서 밝혀진 혈당강하 물질의 정확한 활성을 확인하기 위해 *in vivo*로 실험용 쥐의 당 부하 실험을 한 결과다. 예상한 바와 같이 상엽과 누에 분획물 두 경우다 *in vivo*에서 63% 이상 혈당 강하 효과가 있으며 특히 강원도산 상엽의 유기층 분획물이 75% 이

Table 1. The results of measuring *in vivo* glucose-lowering activities of the extracts from *Moli folium* and silkworm and commercial drug

Species	Postprandial 45 min. glucose-lowering activity (%)
<i>Moli folium</i> [*]	75.5±4.8*
Silkworm [*]	63 ±3.2
Chlorpropamide ^{**}	88.4±8.6

^{*}The treatment concentrations were 350 (mg/g).

^{**}The treatment concentration was 25 (mg/g).

*p<0.05 confidential different from the 0 day control.

상의 당 강하 효과를 보여 누에의 경우보다 높은 활성을 나타내는 것이 확인됐다. 또한 이 활성은 기존 제약 제품인 Chlorpropamide가 나타낸 88%의 강하 효과보다는 활성이 낮지만 천연 식품 소재로서 63% 이상의 높은 활성을 나타내 이 물질을 이용한 당뇨 조절을 위한 기능성 식품으로의 활용이 가능할 것으로 판단된다.

요 약

강원도산 상엽과 누에의 ethanol 추출물이 물추출의 경우보다 당뇨병의 직접적인 원인이 되는 α -glucosidase의 저해 효과가 높은 것이 입증됐다. 8.5 (mg/L) 이상의 누에 추출물을 첨가한 경우 효소의 저해 활성이 더 이상 증가하지 않는 포화 반응을 보인 반면 상엽 추출물의 경우는 투여 농도에 직선적으로 증가하는 현상을 보였다. diethyl ether로 분획물을 얻어 실험한 결과 두 경우 다 물 분획층 보다 높은 활성을 보였으며 특히 상엽 추출물의 경우 약 85% 이상의 저해효과를 나타냈다. 이는 현재 시판되는 당뇨 치료제의 하나인 Chlorpropamide의 경우 약 91%의 저해 효과를 나타내는 것과 비교해 보면 분획물의 경우 상당히 높은 활성을 갖고 있음을 알 수 있다. 누에와 상엽 두 추출물을 Sephadex를 이용한 gel 여과와 TLC 방법으로 분리한 결과 상엽의 경우 3개의 spot, 누에의 경우 4개의 spot이 관찰됐다. 이 spot들 중 유사한 Rf 값을 갖고 있는 spot만이 대상 효소에 대해 강한 활성을 보여, 두 종에 존재하는 효소 활성 저해 물질이 유사한 분자량과 구조를 갖고 있을 가능성이 시사하고 있다. 또한 분리된 물질의 당저하 활성을 *in vivo*에서 측정된 결과도 역시 상엽 추출물이 누에 추출물보다 높은 것으로 나타났으며, 이같은 당저하 활성은 시판되는 당뇨 치료약들과도 유사한 활성을 보였다.

감사의 말

본 연구는 강원도 식품산업 기술지원센터의 지원으로 수행된 결과로 이에 심심한 사의를 표합니다.

참고문헌

1. 한대석, 김석중. 1996. 건강 식품의 소재, 효능 및 제품 개발. *생물화공*. 11: 57-66.
2. Hyvonen, L. and P. Koinivostoinen. 1982. Food Technological evaluation of xylitol. *Adv. Food Res.*, 28: 373-403.
3. Singh, R. K. 1994. Research direction for food engineering. *J. Food Eng.*, 23: 491-499.
4. Tattersall, R. 1993. α -glucosidase inhibition as an adjunct to the treatment of type I diabetes. *Diabetic medicine*. 10: 668-672.

5. Levovitz, H. E. 1992. Oral antidiabetic agents. *Drugs*. **44**: 21-24.
6. 한성천. 1989. 식품 지방. 동물편, pp336-380. 행림출판
7. Toeller, M. 1992. Nutritional recommendation for diabetic patients and treatment with α -glucosidase inhibitor. *Drugs*. **44**: 13-16.
8. Junod, A., A. E. Strauffacher and A. E. Renold. 1969. Diabetogenic action of streptozotocin. *J. Clin. Invest.* **48**: 2129-2134.
9. 허 준. 1373. 한글판 동의보감. pp.662. 민중서각.
10. Ostes, J. A. and J. J. Wood. 1989. Oral hypoglycemic agents. *N. Eng. J. Med.* **321**: 1231-1239.
11. Rhinehart, B. L., KM Robinson, P. S. Lui and S. R. Wagner. 1987. Inhibition of inestinal disaccharides and suppression of blood glucose by a new alpha-glucosidase inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241**: 915-919.
12. Weaver, D. C., M. L. McDanial, S. P. Naber and P. E. Lacy. 1978. Alloxan stimulation and inhibition of insulin release from isolated rat islets. *Diabetes*. **27**: 1205-1211.

(Received 27 March 1997)