

용매 종류와 효소 처리에 따른 쓴 메밀 추출물의 항산화 활성 및 α -Glucosidase 저해 활성의 변화

김지은^{1,2} · 주성일¹ · 서지현² · 이삼빈^{1,2*}

¹계명대학교 식품가공학과

²계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터

Antioxidant and α -Glucosidase Inhibitory Effect of Tartary Buckwheat Extract Obtained by the Treatment of Different Solvents and Enzymes

Ji-Eun Kim^{1,2}, Sung-il Joo¹, Ji-Hyun Seo², and Sam-Pin Lee^{1,2*}

¹Dept. of Food Science and Technology and

²The Center for Traditional Microorganism Resources (TMR), Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

Extract yield of tartary buckwheat treated with water, 70% ethanol or methanol were about 13.6%, 7.0% and 6.6%, respectively. Extract yield was greatly increased by the treatment of α -amylase indicating 95.1% yield. RC_{50} value of DPPH radical scavenging activity with methanol and 70% ethanol extracts were 34.0 μ g/mL, 40.5 μ g/mL, respectively. The DPPH radical scavenging activity increased when it was treated with β -glucosidase and cellulase, showing RC_{50} value of 24.7 μ g/mL and 25.0 μ g/mL, respectively. In ABTS radical scavenging activity, methanol extract (100 μ g/mL) showed 30% inhibition. In DPPH or ABTS radical scavenging activities, the treatment of β -glucanase and α -amylase shows the highest and the lowest activities, respectively. In α -glucosidase inhibitory effect, 70% ethanol extract showed RC_{50} value of 59.9 μ g/mL, but water extract was not inhibitory effective. The α -glucosidase inhibitory effect was the highest in multi enzyme treatment. Content of rutin and quercetin in methanol extract showed higher value with 4400.3 mg% and 71.9 mg%, respectively. The 70% ethanol extract of buckwheat contained rutin of 3459.8 mg% and quercetin of 56.9 mg%. In the treatment of β -glucanase, the rutin content of ethanol extract increased with 5057.4 mg% and multi-enzyme treatment resulted in the modification of rutin glycoside.

Key words: *Fagopyrum tataricum*, tartary buckwheat, antioxidant, α -glucosidase, rutin

서 론

최근 우리나라에서는 식생활이 서구화되어감에 따라 증가하는 각종 성인병의 예방과 치료를 위한 기능성 물질의 탐색과 기능성식품의 개발에 연구를 집중하고 있다(1). 새로운 기능성 건강식품으로 주목받고 있는 메밀 성분은 대부분은 탄수화물(60~70%)이 차지하고 12~15%의 조단백질을 함유하고 있으며 lysine, glutamic acid, arginine 및 leucine 과 같은 필수아미노산의 함량이 높아 우수한 아미노산 조성을 가지고 있다(2). 메밀은 식물 분류학적으로 일년생 쌍자엽 식물에 속하는데 이들의 재배종은 단 메밀(*Fagopyrum esculentum*)과 쓴 메밀(*Fagopyrum tataricum*)로 분류된다. 현재 우리나라의 재배종은 단 메밀이며, 쓴 메밀은 주로 중국, 네팔을 비롯한 히말라야 고산지대에서 재배되고 있다(3). 메밀이 새로운 기능성 건강식품으로 그 수요가 증가하

는 이유 중 하나는 생리활성 물질인 rutin을 비롯한 quercetin, quercetrin, myricetin을 다량 함유하고 있기 때문이다(4). 메밀의 기능성 성분인 rutin은 황색 또는 담황색의 polyphenol 화합물인 flavonoid의 일종으로 quercetin에 rutinose가 결합한 물질로 지질대사를 조절(5)하며 항고혈압 효과를 가진다는 보고(6)와 당뇨병의 예방과 치료에 효과적이라는 보고(7) 등 다양한 기능이 보고되고 있다. 또한 quercetin을 비롯한 각종 페놀성 물질은 천연 항산화제로서의 기능(8)이 밝혀짐으로써, 메밀의 이용이 다양해지고 이에 따른 메밀 수요도 점차적으로 늘어가는 추세이다. 특히 쓴 메밀의 rutin 함량이 단 메밀에 비해 높다는 것이 밝혀지면서 세계적으로 다양한 연구가 시도되고 있으나 국내에서는 아직 체계적인 연구가 미비한 실정이다.

효소 처리를 통해 추출수율 향상과 특정 유용성분의 함량 증대를 위하여 홍삼(9), 황기(10), 은행잎(11) 등을 효소 처리

*Corresponding author. E-mail: splee@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5554, Fax: 82-53-580-5554

하여 이들의 성분과 생리활성 변화에 대한 연구가 진행되었다. 홍삼의 경우 최근 도입된 고온 처리법에 의한 유용 성분인 Rk₁, Rg₃, Rg₅ 등의 사포닌 전환에 의한 항암성과 항산화성을 증대시킨 제품이 출시되고 있다. 그러나 메밀의 효소 처리에 의한 특정 유용성분인 rutin과 quercetin 등의 전환에 의한 생리활성 변화에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 쓴 메밀의 생리활성 연구의 기초자료와 건강 기능성식품 소재 개발에의 이용 가능성을 알아보기 위해 쓴 메밀의 추출용매에 따른 추출물의 항산화 활성과 α -glucosidase 저해 활성을 검토하였다. 또한 다양한 가수분해 효소 처리를 통해 추출수율을 향상시키고 특정 유용성분인 rutin과 quercetin의 성분의 변화를 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 메밀 시료는 중국에서 수입된 쓴 메밀 (*Fagopyrum tataricum*)이며 가공 곡류 차 유형으로 1차 가공된 붉은 메밀을 사용하였다. 용매인 주정 prethanol, 메탄올은 Duksan 화학(Duksan, Ansan, Korea)에서 구입하였으며, 가수분해 효소인 termamyl 120 L(α -amylase), viscozyme(multi-enzyme), ultraflo L(β -glucanase), celluclast 1.5 L(cellulase) 4가지 효소는 NOVOZYME사(Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)로부터 구입하여 사용하였다. Rutin, quercetin, α -glucosidase 효소액 및 p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

시료의 추출

시료의 추출은 쓴 메밀을 건식분쇄기(Micro hammer mill, Culatti, Zurich, Switzerland)를 이용하여 0.5 mm sieve를 장착하여 분쇄한 후 100 μ m의 체를 통과한 것을 추출용 시료로 사용하였다. 분말화된 시료 1.5 g에 용매로서 물, 70% 에탄올 및 100% 메탄올을 각각 100 mL씩 가하여 70°C에서 60분간 환류냉각 추출한 뒤 ADVANTEC No.5 filter paper (ADVANTEC Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 여과하고 회전감압농축기(EYELA, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축한 후 동결 건조하여 시료로 사용하였다. 또한 시료의 무게를 측정하여 추출수율을 측정하였다.

효소 처리

쓴 메밀 분말 2.5 g에 증류수 50 mL을 가하고 70°C에서 30분간 호화시킨 후, 각각의 효소를 1% 첨가하여 α -amylase는 90°C에서 30분간 반응시키고, multi enzyme, β -glucanase, cellulase는 50°C에서 60분간 반응시켰다. 효소 처리된 쓴 메밀 추출액에 70% 에탄올을 90 mL 가하여 70°C에서 60분간 환류냉각 추출한 후 여과하고 회전감압농축기로 감압 농축한 후 동결 건조한 분말을 분석 시료로 사용하였다.

DPPH free radical 소거 활성

쓴 메밀 추출물의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼에 대한 소거 활성은 Blois의 방법(12)에 따라 측정하였다. 시료를 각각의 용매에 녹여 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000 μ g/mL의 농도로 희석한 희석액 0.8 mL과 에탄올에 녹인 0.15 mM DPPH용액 0.2 mL를 가하여 실온에서 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리라디칼 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀ 값으로 나타내었다. 이때 상대 활성의 비교를 위하여 대조군으로 butylated hydroxy toluene(BHT), butylated hydroxy anisole(BHA), vitamin C를 사용하였다.

ABTS radical-scavenging 활성 측정

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS+[·] cation decolorization assay 방법(13)에 의하여 시행하였다. 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+[·]을 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이 0.70(\pm 0.02)이 되게 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)으로 희석하였다. 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,500 μ g/mL로 희석된 용액 990 μ L에 sample 10 μ L를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다.

Hydrogen peroxide(H₂O₂) 소거 활성 측정

Hydrogen peroxide radical에 대한 소거 활성은 Müller 등(14)의 방법에 따라 96 well micro plate에 PBS 100 μ L과 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000 μ g/mL로 희석한 시료 20 μ L을 넣고 1 mM H₂O₂ 20 μ L을 가하여 실온에서 5분간 방치한 후에 1.25 mM ABTS와 PBS에 녹인 1 unit/mL peroxidase 30 μ L을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에 흡광도를 측정하였다.

α -Glucosidase 저해 활성 측정

쓴 메밀의 용매별에 따른 추출물은 10, 50, 100, 200 μ g/mL의 농도로 희석하여 0.75 unit/mL의 α -glucosidase 효소액 25 μ L를 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.5) 200 μ L에 넣고 혼합한 후 2 mM p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside를 가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 0.5 M Na₂CO₃를 가하여 반응을 정지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 반응으로 생성된 nitrophenyl의 함량을 정량하여 각 추출물을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 효소 활성을 계산하였다(15).

High performance liquid chromatography를 이용한 rutin, quercetin 정량 분석

쓴 메밀 추출물 시료는 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 rutin과 quercetin 분석 시료로 사용하였다. 사용된 시약

은 모두 HPLC용을 사용하였고, 표준물질인 rutin, quercetin은 10, 50, 100, 200 µg/mL 농도로 제조한 후 정량분석에 이용하였다. HPLC 시스템은 Waters 2487 system(Waters Co., Milford, USA)을 사용하였으며, column은 Hypersil Gold C₁₈(Thermo Co., Waltham, USA)을 사용하였다. 분석 조건은 UV detector 355 nm에서 A용매로는 2% acetic acid를 함유한 acetonitrile을, B용매로는 2% acetic acid를 함유한 water를 사용하여 A와 B 용매를 50:50으로 혼합하여 2분까지 유지하다가 점차 A용매의 농도를 증가시켜 18분까지 100%에 이르도록 하여 2분간 흘려주고, 이후 B용매를 22분까지 50%에 이르도록 하여 2분간 흘려주었으며, 용매는 분당 1 mL/min의 속도로 흘려주었다.

통계처리

모든 자료는 평균±표준편차로 나타내었으며, 유의성 검사는 SPSS™ version 17.0(SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 one-way ANOVA를 실시하였고, 대조구인 70% 에탄올 추출구와의 통계적 유의성은 Tukey's HSD test(16)로 검증하였다. p<0.05 이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

쓴 메밀 추출물의 수율

쓴 메밀에서의 물, 70% 에탄올, 메탄올 추출물의 수율은 각각 13.6%, 7.0%와 6.6%로 나타났으며 물 추출물이 70% 에탄올과 메탄올 추출물보다 2배 이상의 높은 추출수율을 보였다(Table 1). Yoo(17)는 메밀 분말의 70% 에탄올 추출시 추출수율이 6.25~7.38%로 나온다고 보고하였는데 본 실험과 유사하였다. 효소 처리하여 70% 에탄올로 추출한 경우 수율이 α-amylase(95.1%), multi-enzyme(63.5%), β-glucanase(19.0%), cellulase(16.6%)의 순으로 처리 효소 종류에 따른 추출수율은 크게 차이가 났다. 효소 처리에 의한 추출수율은 70% 에탄올 추출물과 α-amylase 처리구와 비교 시 13배 이상 증가한 것으로 나타나며 이는 메밀 자체의 세포벽의 결합 구조의 파괴 및 가수분해로 인한 가용성 성분

Table 1. Total extraction yield of tatar buckwheat extract according to the treatment of different solvents and enzymes

Sample	Total extraction yield (%)
Water extract	13.6±1.7*
70% EtOH extract	7.0±0.1
100% MeOH extract	6.6±0.2
α-Amylase	95.1±1.5**
Multi-enzyme	63.5±1.2**
β-Glucanase	19.0±0.2**
Cellulase	16.6±1.1**

Each value represents the mean±SE. *p<0.05, **p<0.01; Compared to 70% ethanol as determined by Tukey's Studentized range (HSD) test.

의 증가로 추측된다. Shin 등(18)은 다양한 효소 처리에 의한 마늘 착즙액의 수율을 최대 13.4~14.5%까지 향상시킬 수 있는 것으로 보고하고 있으며, 사과 펄프에 hemicellulase 및 cellulase 등을 함유하고 있는 복합 효소를 첨가한 경우 저장 사과의 경우 23%정도 수율이 증가하였다고 보고하였다(19). 따라서 쓴 메밀에 효소처리와 용매추출을 병행처리할 경우 추출수율 향상에 따른 유용성분의 증가로 항산화 활성이나 α-glucosidase 저해 활성에도 긍정적으로 기여할 것으로 기대된다.

DPPH free radical 소거 활성

DPPH는 ascorbic acid, tocophenol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민에 의해서 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로써 항산화 물질의 전자 공여능을 측정할 때 사용되고 있다(20). 전자공여 작용은 지질과산화의 연쇄반응에 관여하는 산화성 활성 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도가 되며, free radical은 인체 내에서 각종 질병과 세포의 노화를 일으키므로 식물 추출물 등에서 항산화제로 작용할 수 있는 물질을 확인할 필요성이 있다.

쓴 메밀 추출물과 합성항산화제인 BHT, BHA, ascorbic acid의 DPPH 소거 활성을 농도별로 측정하여 비교한 결과는 Table 2와 같다. 쓴 메밀 추출물은 사용된 범위 내에서 농도 의존적으로 radical 소거 활성 효과가 나타났으며 메탄올 추출물과 70% 에탄올 추출물에서의 RC₅₀ 값이 각각 34.0 µg/mL, 40.6 µg/mL로 우수한 소거 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 이는 Yoon 등(21)이 보고한 복분자 메탄올 추출물의 RC₅₀ 값(117 µg/mL)보다 뛰어난 소거 활성이 있음을 보여준다. 반면에 물 추출물은 RC₅₀ 값이 967.6 µg/mL로서 소거 활성이 매우 낮은 것으로 나타났다.

효소처리를 통한 쓴 메밀 추출물의 DPPH radical 소거 활성 역시 RC₅₀ 값을 구하여 Table 2에 나타내었다. 효소 처리에 사용된 용매는 용매별 추출물 중 활성이 우수하면서 식용 가능한 추출 용매인 70% 에탄올을 선정하여 실험을

Table 2. DPPH radical scavenging effect of tartary buckwheat extract according to the treatment of different solvents and enzymes

Sample	RC ₅₀ (µg/mL)
Water extract	967.6±13.2**
70% EtOH extract	40.6±1.8
100% MeOH extract	34.0±1.3
α-Amylase	60.1±1.7**
Multi-enzyme	36.4±1.0
β-Glucanase	24.7±1.6**
Cellulase	25.0±0.2*
BHA	9.6±0.3**
BHT	2.6±0.9**
Ascorbic acid	6.3±0.5**

Each value represents the mean±SE. *p<0.05, **p<0.01; Compared to 70% ethanol as determined by Tukey's Studentized range (HSD) test.

수행하였다. α -Amylase 처리 구는 RC_{50} 값이 $60.1 \mu\text{g/mL}$ 로 대조구인 70% 에탄올 추출 구에 비해 활성이 낮았으나 multi-enzyme, β -glucanase, cellulase는 각각 RC_{50} 값이 36.4, 24.7, $26.0 \mu\text{g/mL}$ 로 나타나 대조구에 비해 유의적으로 활성이 높은 것으로 나타났다.

Kim 등(10)은 황기를 수종의 가수분해 효소를 처리하였을 때 플라보노이드 화합물의 추출수율이 무 처리 군에 비하여 증가한다고 보고한 바 있으며, Kim 등(22)도 감태 추출물의 효소 처리하여 분획한 결과 항산화 효과와 V79-4 세포주에 대한 보호효과가 증가됨을 보고하였다. 또한 Kim 등(23)은 효소처리와 열처리에 의한 인삼 추출물의 추출수율과 항산화 활성을 검토한 결과 효소 종류에 따라 수율이 큰 차이를 나타냈으며 항산화 활성이 효소 처리에 의해 증가됨을 보고하였다.

ABTS⁺ free radical 소거 활성

혈장에서 ABTS의 양이온 라디칼의 흡광도가 항산화제에 의해 억제되는 것에 기초하여 개발된 ABTS 라디칼 소거 활성법은 표준물질인 trolox, ascorbic acid와의 값과 비교하여 나타내었다. ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치하여 ABTS⁺이 생성되면 추출물의 항산화 활성에 의해 ABTS⁺이 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 값으로 나타내어 쓴 메밀 추출물의 ABTS⁺의 소거 활성을 측정할 수 있다.

쓴 메밀 추출물의 ABTS⁺의 소거 활성을 대조구인 trolox, ascorbic acid와 비교 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. ABTS⁺ 소거 활성 법에서 표준물질로 사용되는 trolox는 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 90% 정도의 소거 활성을 보여 Rice-Evans 등(24)의 결과와 거의 일치하였고, 쓴 메밀의 추출용매에 따른 소거 활성은 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 메탄

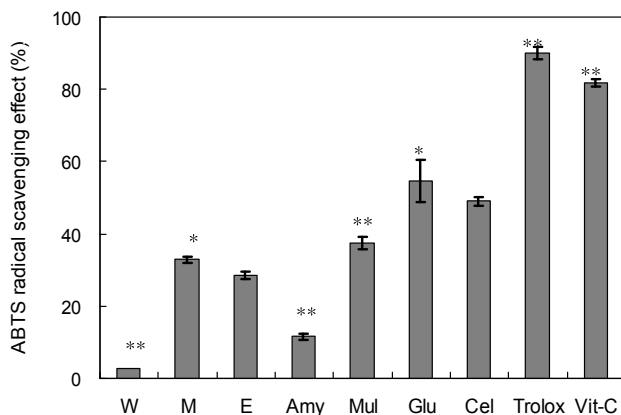


Fig. 1. ABTS radical scavenging effect of tartary buckwheat extract according to different solvent and enzyme treatments. Reaction was performed with the extract of $100 \mu\text{g/mL}$. W, water; M, 100% methanol; E, 70% ethanol; Amy, α -amylase; Mul, multi-enzyme; Glu, β -glucanase; Cel, cellulase. Each value represents the mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Compared to 70% ethanol as determined by Tukey's Studentized range (HSD) test.

올 추출물이 30% 이상의 우수한 활성을 보였으며 70% 에탄올 추출물 또한 비슷한 소거 활성을 나타내었다. 반면에 물 추출물은 70% 에탄올과 메탄올 추출물에 비해서 매우 낮은 소거 활성을 보였다. 효소 처리에 의한 쓴 메밀 추출물의 ABTS radical 소거 활성도 DPPH radical 소거 활성과 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 1). 대조구인 70% 에탄올 추출물은 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 28.5% 저해 활성을 나타냈으며 α -amylase는 7.6%, multi enzyme과 β -glucanase, cellulase는 각각 37.4%, 54.6%, 48.9%로 나타났다. 다양한 효소 처리구 중 DPPH radical 소거 활성이 우수하였던 β -glucanase 처리구가 ABTS radical 소거 활성도 가장 우수하였으며 cellulase 처리 구 역시 항산화 활성이 우수하였다.

Hydrogen peroxide(H_2O_2) 소거 활성

Hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$)는 생체 내에서 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비 선택적, 비가역적인 파괴 작용을 일으키는 물질로 각종 질병을 야기하는 것으로 알려져 있다. 따라서 $\cdot\text{OH}$ 를 제거하는 것은 생체 내 시스템 보호를 위해서 매우 중요하다(25).

Hydrogen peroxide 소거 활성을 측정한 결과 DPPH radical, ABTS radical 소거 활성과 같은 결과를 보였다(Table 3). 쓴 메밀 추출물의 hydrogen peroxide 소거 활성은 메탄올 추출물에서 RC_{50} 값이 $32.3 \mu\text{g/mL}$ 로 강한 항산화 활성을 갖는 것으로 나타났으며, 70% 에탄올 추출물에서도 RC_{50} 값이 $35.9 \mu\text{g/mL}$ 로 나타나 메탄올 추출물과 대등한 소거 활성을 가지는 것으로 나타났다. 물 추출물은 RC_{50} 값이 $569.7 \mu\text{g/mL}$ 로 매우 낮은 소거 활성을 보였다. 대조군으로 사용한 trolox와 ascorbic acid는 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 90%가 넘는 소거 활성을 보였다. Park 등(26)이 보고한 바에 따르면 flavonoid 화합물의 항산화 활성은 β ring의 hydroxylation의 위치와 수에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 특히 3',4'-dihydroxyl group을 가질 때 항산화 활성이 높은 것으로 알려져 있어 쓴 메밀에 함유된 flavonoid 화합물 중 특히 rutin에 의한 높은 소거 활성능이 나타난 것이라

Table 3. Hydrogen peroxide scavenging effect of tartary buckwheat extract according to the treatment of different solvents and enzymes

Sample	RC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Water extract	$569.8 \pm 82.7^{**}$
70% EtOH extract	35.9 ± 5.7
100% MeOH extract	32.3 ± 2.4
α -Amylase	37.4 ± 0.6
Multi-enzyme	31.7 ± 1.5
β -Glucanase	26.4 ± 3.0
Cellulase	28.8 ± 0.4
Trolox	$7.6 \pm 0.6^{**}$
Ascorbic acid	$7.9 \pm 0.1^{**}$

Each value represents the mean \pm SE.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Compared to 70% ethanol as determined by Tukey's Studentized range (HSD) test.

추출된다. 또한 Rutin은 ·OH를 농도 의존적으로 소거시키는 능력을 가지고 있다고 보고된 바 있다(27). 효소 처리에 따른 H₂O₂ 소거 활성 측정 결과 α-amylase를 제외한 모든 효소 처리구가 대조구인 70% 에탄올 추출구보다 활성이 우수하였으나 효소 종류에 따른 유의적인 차이는 없었다.

α-Glucosidase 저해 활성

당뇨병은 암 및 순환기 질환과 더불어 3대 질병의 하나로 지목되고 있다. α-Glucosidase는 소장의 brush-border membrane에 존재하는 소화효소로서 이당류나 다당류 형태의 탄수화물이 소화 흡수되기 위한 상태인 단당류로 가수분해하는 역할을 한다. α-Glucosidase 저해제는 탄수화물식이 후 혈당상승을 억제할 수 있다. 쓴 메밀 추출물의 α-glucosidase 활성을 측정한 결과 70% 에탄올, 메탄올 추출물에서는 농도 의존적으로 저해 활성이 높아지는 경향을 보였으며 물 추출물에서는 저해능이 나타나지 않았다. 각 추출물의 RC₅₀ 값을 측정해본 결과 70% 에탄올 추출물이 59.9 µg/mL으로 저해 활성이 가장 우수하였다(Table 4). Cho 등(28)은 오미자 추출물에서 α-glucosidase 저해 활성을 측정한 결과 200 µg/mL의 농도에서 물 추출물이 97.4%, 60% 에탄올 추출물이 84.5%의 활성을 나타낸다고 보고한 바 있다.

쓴 메밀의 70% 에탄올, 메탄올 추출물은 α-glucosidase를 효과적으로 저해하며 이러한 저해 활성에 관여하는 물질은 rutin과 quercetin 등의 플라보노이드 성분이라 추측된다. Lee 등(29)이 보고한 바에 따르면 quercetin은 α-glucosidase를 가역적으로 느리게 결합하며, 비경쟁적인 저해를 하는 것으로 나타나 quercetin은 당뇨병 질환을 치료할 수 있다는 잠재성을 보여주고 있다고 하였다.

효소 처리에 의한 α-glucosidase 저해 활성은 multi enzyme 처리구가 RC₅₀값이 34.7 µg/mL으로 활성이 가장 높았고 그 다음은 β-glucanase(41.4 µg/mL), α-amylase(41.7 µg/mL), cellulase(60.8 µg/mL) 순이었다. 항산화 활성이 우수하였던 cellulase 처리구는 대조구인 70% 에탄올 추출구보다 활성이 좋지 않은 것으로 나타났다.

Table 4. α-Glucosidase inhibitory activity of tartary buckwheat extract according to the treatment of different solvents and enzymes

Sample	RC ₅₀ (µg/mL)
Water extract	ND
70% EtOH extract	59.9±4.1
100% MeOH extract	126.8±0.4**
α-Amylase	41.7±2.8*
Multi-enzyme	34.7±2.6**
β-Glucanase	41.4±1.0**
Cellulase	60.8±4.8

ND: not detected.

Each value represents the mean ± SE.

*p<0.05, **p<0.01; Compared to 70% ethanol as determined by Tukey's Studentized range (HSD) test.

용매와 효소처리에 따른 쓴 메밀 추출물의 플라보노이드 함량

쓴 메밀 70% 에탄올 추출물의 rutin과 quercetin 분석 결과는 Fig. 2와 같으며 표준물질인 rutin과 quercetin의 retention time은 각각 4.2분과 10.3분대로 나타났다.

추출용매 및 효소처리에 따른 쓴 메밀 추출물의 rutin과 quercetin의 함량은 Table 5와 같다. 메탄올 추출물의 rutin 함량은 4,400 mg/100 g, quercetin 함량은 71 mg/100 g으로 시료 중 가장 높은 함량을 나타내었으며, 70% 에탄올 추출물 역시 메탄올 추출물과 비슷한 함량을 가지는 것으로 나타났으나 물 추출물에서의 rutin 함량은 2,489.7 mg/100 g, quercetin 함량은 13.6 mg/100 g으로 메탄올 추출물과 에탄올 추출물에 비하여 20배 정도 적은 함량을 가지는 것으로 나타났다. Park 등(30)이 보고한 바에 따르면 쓴 메밀 종자를 메탄올로 추출하였을 때 rutin의 함량이 100 g당 2,042.1 mg 정도를 함유하고 있다는 결과와 비교하였을 때 본 연구 결과

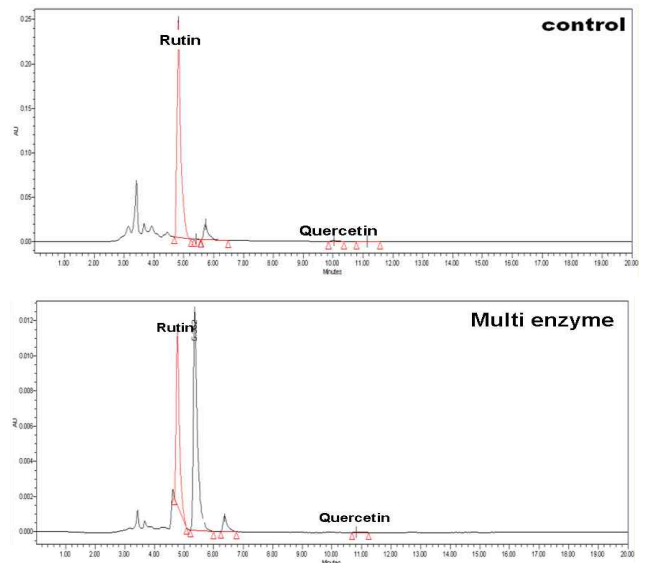


Fig. 2. HPLC chromatograms showing effect of multi enzyme treatment on tartary buckwheat.

Table 5. Rutin and quercetin contents of tartary buckwheat extract according to extraction solvent and enzyme treatments

Sample	Rutin content (mg/100 g)	Quercetin content (mg/100 g)
Water extract	2489.7±22.6**	13.6±1.8**
70% EtOH extract	3459.8±34.2	56.9±1.4
100% MeOH extract	4400.3±44.1**	71.9±3.9
α-Amylase	1066.8±26.4**	88.2±5.4*
Multi enzyme	278.3±20.9**	83.5±3.2*
β-Glucanase	5057.4±42.7**	64.2±5.8
Cellulase	4266.0±35.2**	48.8±2.9

Each value represents the mean ± SE.

*p<0.05, **p<0.01; Compared to 70% ethanol as determined by Tukey's Studentized range (HSD) test.

가 rutin 함량이 높은 것으로 나타났다. 이 결과로 보아 추출 조건에 따라서 flavonoid 함량에 큰 차이가 있음을 알 수 있었다.

효소 처리 후 70% 에탄올 추출물의 rutin의 함량은 β -glucanase 처리 시 5,057.4 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며 cellulase는 4,266.0 mg/100 g으로 메탄올 추출물과 비슷한 함량을 나타내었다. 반면에 α -amylase와 multi enzyme 처리 시에는 rutin의 함량이 물 추출물보다 작았으나 multi enzyme 처리 시에는 rutin 바로 뒤의 retention time이 5.5분대의 peak가 상당히 증가하는 것으로 나타나 rutin 유도체 성분의 변화가 관찰되었다(Fig. 2).

Quercetin의 함량은 rutin 함량에 비해 매우 적었으며 효소처리에 의해 큰 변화가 없었으며 이는 효소 처리에 의한 rutin 성분의 quercetin으로 전환은 거의 이루어지지 않은 결과로 생각된다.

연구 보고로 citrus flavonoids의 총 항산화성을 DPPH radical을 사용하여 측정한 결과 rutin과 quercetin은 vitamin C나 BHT와 비슷한 free radical 소거 활성능을 보여주었다는 보고가 있었다(31). Moon 등(32)은 flavonoid 화합물의 DPPH radical 소거 활성(RC_{50})을 측정한 결과 quercetin이 4.5 μ g/mL로 kaempferol(12.0 μ g/mL), luteolin(15.6 μ g/mL)보다 강한 항산화 활성을 갖는 것으로 보고한 바 있다. 또한 quercetin은 항산화 활성 이외에도 항암(33), 항 돌연변이 활성(34), 항바이러스 작용(35), 그리고 지질산화반응 억제(36) 등의 효과를 가지고 있는 것으로도 알려져 있다.

요 약

쓴 메밀의 용매에 따른 추출수율은 물 추출물이 39.0%, 70% 에탄올 추출물이 7.0%, 100% 메탄올 추출물이 6.6%로 물 추출 시 수율이 가장 높았으며 효소처리에 의해 추출수율이 크게 향상되어 α -amylase 처리 시 95.1%로 가장 높아 가용성 고형분의 함량이 증가하였다. DPPH radical 소거 활성 측정 결과 메탄올과 에탄올 추출물의 RC_{50} 값이 각각 34.0 μ g/mL, 40.5 μ g/mL로 높은 활성을 지닌 것으로 나타났으며, 효소 처리에 의해 활성이 증가되어 β -glucosidase 처리구와 cellulase 처리구의 RC_{50} 값이 각각 32.3 μ g/mL, 33.0 μ g/mL로 나타났다. ABTS radical 소거 활성 측정 결과 100 μ g/mL의 농도에서 메탄올, 70% 에탄올 추출물이 30%가 넘는 활성을 보였으며, 물 추출물의 소거 활성은 낮았고 효소 처리에 의해 활성이 증가하여 α -amylase 처리구를 제외한 모든 효소 처리구의 활성이 대조구인 70% 에탄올 추출구보다 활성이 우수하였다. Hydrogen peroxide 소거 활성 측정 결과 RC_{50} 값이 메탄올 추출물이 32.3 μ g/mL, 70% 에탄올 추출물이 35.9 μ g/mL로 높은 소거 활성을 가지는 것으로 나타났으며 효소처리에 의해 소거 활성이 증가하는 것으로 나타났으나 효소 종류에 따른 유의적인 차이는 없었다. 쓴 메밀

추출물의 α -glucosidase 저해 활성은 에탄올 추출물의 RC_{50} 값이 59.9 μ g/mL로 가장 높은 저해 활성을 보였으며 α -amylase 처리구가 저해 활성이 가장 높았다. HPLC 분석 결과 메탄올 추출물의 rutin 함량이 4,400.3 mg/100 g, quercetin 함량이 71.9 mg/100 g으로 가장 많은 양의 rutin과 quercetin을 함유하고 있는 것으로 나타났으며, 에탄올 추출물 또한 rutin과 quercetin의 함량이 각각 3,459.8 mg/100 g과 56.9 mg/100 g으로 메탄올 추출물과 비슷한 양을 함유하고 있었으며 물 추출물은 상대적으로 적은 양을 함유하고 있었다. 가수분해 효소 처리 시 β -glucanase 처리구의 rutin의 함량이 5,057.4 mg/100 g으로 가장 높았다. 결과적으로 쓴 메밀의 메탄올과 에탄올 추출물은 항산화 활성이 뛰어나며 항 당뇨에도 효과가 있으며, 효소 처리에 의해 쓴 메밀에서의 수용성 고형분 함량이 크게 증가하며 항산화 활성과 α -glucosidase 저해 활성이 증가하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지정 계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

1. Maeng YS, Park HK, Kwon TB. 1990. Analysis of rutin contents in buckwheat and buckwheat foods. *Korean J Food Sci Technol* 22: 732-737.
2. Lee MS, Sohn KH. 1992. Studies on electrophoretic pattern and amino acid of buckwheat protein. *Korean J Soc Food Sci* 8: 379-385.
3. Park JI, Chang KJ, Kang YK, Park BJ, Park CH. 2007. Local adaptability of tatar buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) in Korea. *Korean J Intl Agric* 19: 191-195.
4. Choi M, Kim JD, Park KS, Oh SY, Lee SY. 1991. Effect of buckwheat supplementation on blood glucose levels and blood pressure in rat. *J Korean Soc Food Nutr* 20: 300-305.
5. Choi YS, Ahn C, Shim HH, Choe M, Oh SY, Lee SY. 1992. Effect of instant buckwheat noodle on digestibility and lipids profiles of liver and serum in rats. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 478-483.
6. Lee JS, Park SJ, Sung KS, Han CK, Lee MH, Jung CW, Kwon TB. 2000. Effect of germinated buckwheat on blood pressure plasma glucose and lipid levels of spontaneously hypertensive rats. *Korean J Food Sci Technol* 32: 206-211.
7. Lee JS, Maeng YS, Chang YK, Ju JS. 1994. Effects of buckwheat on organ weight, glucose and lipid metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 27: 819-827.
8. Kim SK, Ban SY, Kim JS, Chung SK. 2005. Change of anti-oxidant activity and antioxidant compounds in *Saururus chinensis* by extraction conditions. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 89-92.
9. Kim NM, Lee JS, Lee BH. 1999. Effects of β -amylase and trans glucosidase on the qualities of red ginseng extract. *J Ginseng Res* 23: 93-98.
10. Kim MJ, Lim KR, Jung TK, Yoon KS. 2007. Anti-aging

- effects of *Astragalus membranaceus* root extract. *J Soc Cosmet Korea* 33: 33-40.
11. Kim BY, Lee CG, Whang WK, Huh JD. 1989. Studies on the extraction of active components in *Ginkgo biloba* leaves by enzyme treatments. *Korean J Pharmacogn* 20: 43-47.
 12. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1200.
 13. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannalà A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
 14. Müller HE. 1985. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 259: 151-154.
 15. Kim BN, Park HK, Kwon TB, Maeng YS. 1991. Analysis of rutin contents in buckwheat noodles. *Korean J Soc Food Sci* 7: 61-66.
 16. Sreel RGD, Torrie JH. 1990. *Principles and procedures of statistics*. McGraw Hill, New York, USA.
 17. Yoo KH. 2008. Studies on development of buckwheat noodles and biological activities for the quality standardization. *PhD Dissertation*. Kangwon National University, Gangwon.
 18. Shin DM, Hawer WD, Lee YC. 2007. Effects of enzyme treatments on yield and flavor compounds of garlic extracts. *Korean J Food Sci Technol* 39: 276-282.
 19. Grassin C. 1993. Enzymatic liquefaction of apples. *Fruit Process* 7: 1-6.
 20. Nieva MM, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-savenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
 21. Yoon I, Wee JH, Moon JH, Ahn TH, Park KH. 2003. Isolation and identification of quercetin with antioxidative activity from fruits of *Rubus coreanum* Miquel. *Korean J Food Sci Technol* 35: 499-502.
 22. Kim KN, Heo SJ, Song CB, Lee JH, Heo MS, Yeo IK, Kang KA, Hyun JW, Jeon YJ. 2006. Protective effect of *Ecklonia cava* enzymatic extracts on hydrogen peroxide-induced cell damage. *Process Biochem* 41: 2393-2401.
 23. Kim YC, Cho CW, Rhee YK, Yoo KM, Rho JH. 2007. Antioxidant activity of ginseng extracts prepared by enzyme and heat treatment. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1482-1485.
 24. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1993. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20: 933-956.
 25. Casa CL, Villegas I, Alarcon de la Lasta, C Motilva V, Martin Calero MJ. 2000. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacology* 71: 45-53.
 26. Park SS, Yu KH, Min TJ. 1988. Antioxidant activities of extract from fruiting bodies of mushrooms. *Korean J Mycology* 26: 69-77.
 27. Yang J, Guo J, Yuan J. 2008. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Sci Technol* 41: 1060-1066.
 28. Cho YJ, Ju IS, Kim BC, Lee WS, Kim MJ, Lee BG, An BJ, Kim JH, Kwon OJ. 2007. Biological activity of *Omiija* (*Schizandra chinensis* Baillon) extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 50: 198-203.
 29. Lee DS, Kim JG, Lee SH. 2006. Inhibition of α -glucosidase activity by quercetin. *Korea J Microbiol Biotechnol* 34: 368-372.
 30. Park BJ, Kwon SM, Park JI, Chang KJ, Park CH. 2005. Phenolic compounds in common and tartary buckwheat. *Korean J Crop Sci* 50: 175-180.
 31. Back DM. 2000. Studies on optimal extraction condition for flavonoids from citrus junos and free radical scavenging activities of citrus flavonoids. *MS Thesis*. Yonsei University, Seoul.
 32. Moon HI, Ahn KT, Lee KR, Zee OP. 2000. Flavonoids compounds and biological activities on the aerial parts of *Angelica gigas*. *Yakhak Hoeji* 44: 119-127.
 33. Markaverich BM, Roberts RR, Alejandro MA, Johnan GA, Middleditch BS, Clark JM. 1998. Bioflavonoid interaction with rat uterine type II binding sites growth inhibition. *J Steroid Biochem* 30: 71-78.
 34. Edenhader R, Tang X. 1996. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorence, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. *Food Chem Toxicol* 35: 357-372.
 35. Veckenstedt A, Beladi I, Musci I. 1978. Effect of treatment with certain flavonoids mingo virus-induced encephalitis in mice. *Arch Virol* 57: 255-260.
 36. Younes M, Siegers CP. 1981. Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion. *Planta Med* 43: 240-244.

(2009년 5월 18일 접수; 2009년 7월 28일 채택)