

## 100종 브라질 식물 추출물로부터 반추동물 산독증 예방치료를 위한 $\alpha$ -amylase 및 $\alpha$ -glucosidase 저해제의 선별

김미선 · 안선미 · 정인창 · 권기석<sup>1</sup> · 손호용<sup>\*</sup>  
안동대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>안동대학교 생명자원과학부

### Screening of $\alpha$ -Amylase and $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors from Brazilian Plant Extracts for Treatment of Rumen Acidosis

Mi-Sun Kim, Seon-Mi Ahn, In-Chang Jung, Gi-Seok Kwon<sup>1</sup> and Ho-Yong Sohn

Department of Food & Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

<sup>1</sup>School of Bioresource Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea

#### Abstract

To develop anti-acidosis and anti-diabetes agents from natural products, the inhibitory activities of Brazilian plant extracts against microbial  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase were evaluated. Among 100 different ethanol extracts tested, those of *Acacia jurema* Mart., *Anacardium humile* A. St-Hil., *Cedrela odorata* L., and *Guazuma ulmifolia* Lam showed good inhibitory activities toward both enzymes. In addition, an extract of *Plumeria drastica* Mart. showed specific inhibition of  $\alpha$ -amylase, whereas that of *Eugenia uniflora* L. demonstrated strong inhibition of the enzyme. IC<sub>50</sub> values of  $\alpha$ -amylase inhibition suggested that the extract of *A. humile* A. St-Hil., which has been used as an anti-diabetes medicine in Brazil, had potent inhibitory activity. The IC<sub>50</sub> for the *A. humile* A. St-Hil. extract (91.2  $\mu$ g/mL) was similar to that of acarbose (50.5  $\mu$ g/mL). This activity of *A. humile* A. St-Hil. was not reduced by heat or acid treatment. Moreover, treatment with HCl (0.01 M) for 1 h increased the inhibitory activity from 57.5% to 81.2%. Also, the extract did not cause hemolysis of human red blood cells at levels up to 1 mg/mL. The results indicate that the extract of *A. humile* A. St-Hil. is potentially useful as an anti-acidosis and anti-diabetes agent.

**Key words :** *Anacardium humile* A. St-Hil. Brazilian plant extract,  $\alpha$ -amylase inhibitor,  $\alpha$ -glucosidase inhibitor,

#### 서 론

국내 반추동물의 축산업은 다양한 cellulose계 사료급여를 통한 전통적 사육방법에 의존하여 왔으나, 현대에는 반추동물의 빠른 성장 및 건조와 같은 cellulose 사료 생산량 감소에 따라 옥수수과 같은 전분계 사료를 주로 이용하고 있다(1,6,8). 이에 따라 반추동물의 전분계 사료의 이용성 증대를 위한 곡류가공에 대한 많은 연구들이 진행되고 있으며(1,18), 반추위 대사나 소화율에 대한 연구들도 활발하게 보고되고 있다(1,12,13,18). 그러나, 전분계 사료의 급여는 종종 많은 당의 생성과 이의 혐기적 발효에 따른 유기산

생성을 야기하여 산독증(acidosis)을 나타내는 것으로 알려져 있다(6,7,8). 급성 산독증은 cellulose계 사료가 아닌 전분계 곡물 사료를 급여하는 경우, 반추위 미생물의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase에 의한 급격한 전분분해가 나타나고, 휘발성 지방산 및 젖산과 같은 유기산이 반추위와 혈액에 축적되어 반추위의 pH가 5.0 이하로 떨어지면서 결국 폐사를 유발하는 것으로 알려져 있다. 실제 전분계 고농후 사료만을 급여하는 경우 반추동물의 폐사율이 급격히 증대하는 것이 이미 보고되어 있다(1,8,16). 이러한 급성 또는 아급성 산독증을 막기 위해서는 일정량의 cellulose계 사료의 공급이 필수적이며(7,13), NaHCO<sub>3</sub>, limestone, bentonite와 같은 전통적인 buffer계의 급여도 도움이 되는 것으로 알려져 있다(6,7,16). 2009년 제안된 또 다른 방법으로는  $\alpha$ -amylase

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail : hysohn@andong.ac.kr,  
Phone : 82-54-820-5491, Fax : 82-54-820-7804

및  $\alpha$ -glucosidase 저해를 통한 전분질의 분해 억제 방법이 있으며, 인간 당뇨병(Type II) 치료제로 사용되고 있는 acarbose를 소에 처리한 결과  $\text{NaHCO}_3$ 와 같은 buffer제 이용보다 더욱 효율적으로 급성 및 아급성 산독증을 예방 및 감소시킬 수 있음이 보고되었다(16,17). 그러나 acarbose를 포함한 인간의 type II 당뇨병 등에 사용되고 있는  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해제들은 전분 분해 억제효과 및 혈당상승 억제효과는 우수하지만, 지속적으로 복용, 급여시에는 설사와 복통을 동반하는 것이 알려져 있으므로(11,15), 보다 안전한 항산독제 및 항당뇨제의 개발이 필요한 실정이다. 따라서 많은 연구자들이 안전성이 확보된 다양한 천연물로부터  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해제들을 꾸준히 연구하여 온 바, Lim 등(14)은 1,400 여종의 국내 자생 목본류의  $\alpha$ -amylase 저해활성을 평가하여 최종적으로 말채나무 추출물의 유용성을 보고하였으며, Yin 등(20)은 황기의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 보고하였다. 또한 왕겨 추출물의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성(10), 산사자 추출물의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성(11), 미세조류의 혈당상승 억제 효과(9) 등이 보고되었으며, quercetine과 같은 hydroxyflavones의  $\alpha$ -glucosidase 저해효과도 알려져 있다(5,14). 최근에는 다양한 인도 자생식물체로부터  $\alpha$ -amylase 저해제 선별 결과도 보고된 바 있다(2). 이는 국내 자생 식물체에 대한  $\alpha$ -amylase 저해활성 탐색이 이미 광범위하게 진행되어 왔으며, 또한 국내의 기후조건과는 전혀 다른 남미 브라질의 경우 새로운 생리활성 소재가 다양하게 존재하는 것으로 알려지면서, 브라질 자생 식물의 생리활성 탐색이 활발하게 이루어지고 있음(3,4)을 반영한 것이다. 본 연구에서는 반추동물의 급성 산독증의 예방 및 치료제 개발을 위해 100종의 브라질 식물 추출물의 미생물 유래의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성, 인간 적혈구에 대한 용혈활성을 평가하여 우수한 산독증 예방 치료 후보물질을 선별하였기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 연구의 시료는 브라질의 자생식물 100종으로부터 조제된 methanol 추출물을 한국자생식물사업단(<http://extract.pdcrc.kr>)으로부터 구입하여 사용하였다. 추출물의 종류, 학명, 과명 및 사용부위는 Table 1에 나타내었으며, 추출물은 Dimethylsulfoximide (DMSO)에 녹인 후 원하는 농도로 조정하였다. 사용 효소는 반추동물 산독증에 관련되는 미생물 유래의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase를 구입하여 사용하였으며,  $\alpha$ -amylase는 *Bacillus amyloliquifaciens* 유래,  $\alpha$ -glucosidase는 *Aspergillus niger* 유래의 효소를 국내의 전분 가공업체(ApisBio Co. Daegu, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 Sigma Co. (USA)의 제품을 사용하였다.

**Table 1. The list of Brazilian plants used in this study.**

No.	Scientific name	Family	Used part
1	<i>Acacia jurema</i> Mart.	Fabaceae	bark
2	<i>Acacia plumosa</i> Mart. ex Colla	Fabaceae	stem
3	<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	Pteridaceae	leaf, stem
4	<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Hippocastanaceae	leaf, stem
5	<i>Ageratum coryzoides</i> L.	Asteraceae	leaf, stem
6	<i>Amburana cearensis</i> (Allemao) A.C.Sm.	Fabaceae	bark
7	<i>Anacardium humile</i> A. St-Hil.	Anacardiaceae	bark
8	<i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.)	Bignoniaceae	bark
9	<i>Annona muricata</i> L.	Annonaceae	leaf, stem
10	<i>Archangelica officinalis</i> Hoffm.	Apiaceae	root
11	<i>Arctium minus</i> (Hill) Bernh.	Asteraceae	leaf, stem
12	<i>Aristolochia cymbifera</i> Mart. & Zucc.	Aristolochiaceae	stem
13	<i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bonpl.) B. Verl.	Bignoniaceae	stem
14	<i>Artemisia absinthium</i> L.	Asteraceae	leaf, stem
15	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Asteraceae	whole
16	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	Asteraceae	leaf, stem
17	<i>Bauhinia forficata</i> Link	Fabaceae	leaf, stem
18	<i>Bidens pilosa</i> L.	Asteraceae	leaf, stem
19	<i>Bixa orellana</i> L.	Bixaceae	seed
20	<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul	Moraceae	stem
21	<i>Cactus grandiflorus</i> L.	Cactaceae	stem
22	<i>Calendula officinalis</i> L.	Asteraceae	flower
23	<i>Casearia sylvestris</i> Sw.	Flacourtiaceae	leaf
24	<i>Cassia leptocarpa</i> Benth.	Fabaceae	leaf
25	<i>Cayaponia tayuya</i> (Vell.) Cogn.	Cucurbitaceae	leaf, stem
26	<i>Cayaponia tayuya</i> (Vell.) Cogn.	Cucurbitaceae	root
27	<i>Cedrela odorata</i> L.	Meliaceae	bark
28	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Apiaceae	whole
29	<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert	Asteraceae	flower
30	<i>Chondodendron platyphyllum</i> Miers	Menispermaceae	stem
31	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl	Lauraceae	leaf, stem
32	<i>Cnicus benedictus</i> L.	Asteraceae	leaf, stem
33	<i>Copaifera Iansdorfii</i> Desf.	Fabaceae	bark
34	<i>Cordia ecalyculata</i> Vell.	Boraginaceae	leaf, stem
35	<i>Costus spicatus</i> (Jacq.) Sw.	Zingiberaceae	leaf, stem
36	<i>Cuphea carthagenensis</i> (Jacq.) J.F.Macbr.	Lythraceae	whole
37	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Poaceae	leaf, stem
38	<i>Cynara scolymus</i> L.	Asteraceae	leaf, stem
39	<i>Dorstenia asaroides</i> Hook	Moraceae	root
40	<i>Drimys winteri</i> J.R. Forst. & G. Forst.	Winteraceae	bark
41	<i>Echinacea angustifolia</i> DC.	Asteraceae	whole
42	<i>Echinodorus grandiflorus</i> Micheli	Alismataceae	leaf, stem
43	<i>Egletes viscosa</i> (L.) Less.	Asteraceae	stem, flower
44	<i>Equisetum giganteum</i> L.	Equisetaceae	stem
45	<i>Erythrina mulungu</i> Mart. ex Benth.	Fabaceae	root
46	<i>Erythrina velutina</i> Willd.	Fabaceae	bark
47	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Myrtaceae	leaf
48	<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	leaf, stem
49	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	Sterculiaceae	bark
50	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	Malvaceae	flower

No.	Scientific name	Family	Used part
51	<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Fabaceae	fruit
52	<i>Jacaranda pteroides</i> Silva Manso	Bignoniaceae	leaf, stem
53	<i>Juniperus communis</i> L.	Cupressaceae	fruit
54	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Lamiaceae	fruit
55	<i>Leonotis nepetaefolia</i> Schimp. ex Benth.	Lamiaceae	leaf, stem
56	<i>Luffa operculata</i> (L.) Cogn	Cucurbitaceae	fruit
57	<i>Malva sylvestris</i> L.	Malvaceae	leaf, stem
58	<i>Maytenis ilicifolia</i> Mart.	Celastraceae	leaf, stem
59	<i>Medicago sativa</i> L.	Fabaceae	whole
60	<i>Melissa officinalis</i> L.	Lamiaceae	leaf, stem
61	<i>Mentha pulegium</i> L.	Lamiaceae	leaf, stem
62	<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	Asteraceae	leaf, stem
63	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	Myristicaceae	fruit
64	<i>Myroxylon peruiferum</i> L. f.	Fabaceae	bark
65	<i>Passiflora edulis</i> Sims	Passifloraceae	whole
66	<i>Paullinia cupana</i> H.B. & K.	Sapindaceae	aerial part
67	<i>Petiveria alliacea</i> L.	Phytolaccaceae	leaf, stem
68	<i>Pfaffia paniculata</i> (Mart.) Kuntze	Amaranthaceae	root
69	<i>Phyllanthus niruri</i> L.	Euphorbiaceae	whole
70	<i>Pilocarpus pennatifolius</i> Lem.	Rutaceae	leaf, stem
71	<i>Pimpinella anisum</i> L.	Apiaceae	fruit
72	<i>Plectranthus barbatus</i> Andrews	Lamiaceae	leaf
73	<i>Plumeria drastica</i> Mart.	Apocynaceae	bark
74	<i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq	Piperaceae	leaf, stem
75	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	leaf
76	<i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	Fabaceae	seed
77	<i>Quassia amara</i> L.	Simaroubaceae	stem
78	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	leaf, stem
79	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	leaf
80	<i>Ruta graveolens</i> L.	Rutaceae	leaf, stem
81	<i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi	Anacardiaceae	bark
82	<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link	Fabaceae	stem, root
83	<i>Smilax japicanga</i> Griseb.	Smilacaceae	root
84	<i>Solanum cernuum</i> Vell.	Solanaceae	leaf, stem
85	<i>Solidago microglossa</i> DC.	Asteraceae	leaf, stem
86	<i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich) Vahl	Verbenaceae	stem
87	<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni	Asteraceae	whole
88	<i>Symphytum officinale</i> L.	Boraginaceae	leaf
89	<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	Myrtaceae	leaf, stem
90	<i>Tabebuia avellanediae</i> Lorentz ex Griseb.	Bignoniaceae	bark
91	<i>Talisia esculenta</i> (A. St.-Hil.) Radlk.	Sapindaceae	seed
92	<i>Tanacetum vulgare</i> L.	Asteraceae	stem
93	<i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg.	Asteraceae	whole
94	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Lamiaceae	leaf, flower
95	<i>Tilia platyphyllos</i> Scop.	Tiliaceae	fruit
96	<i>Uncaria tomentosa</i> DC.	Rubiaceae	leaf
97	<i>Valeriana officinalis</i> L.	Valerianaceae	root
98	<i>Vernonia polyanthes</i> Less.	Asteraceae	leaf, stem
99	<i>Waltheria douradinha</i> Saint-Hilaire	Sterculiaceae	leaf
100	<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	Rhamnaceae	bark

### $\alpha$ -Amylase 저해 활성

$\alpha$ -Amylase 저해활성은 Lim 등(15)의 방법을 수정하여 사용하였다. 먼저 다양한 농도의 천연물 시료 2.5  $\mu$ L와 50 mM phosphate buffer (pH 6.8)로 희석한  $\alpha$ -amylase (0.25 U/ml) 25  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 10분간 preincubation 한 후, 0.5% soluble starch (Samchun Chemicals Co., Korea) 25  $\mu$ L를 가하여 37°C에서 10분간 반응하였다. 이후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰으며, 반응액에 150  $\mu$ L의 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid, Sigma Co., St. Louis, USA) 용액을 가하여 100°C에서 5분간 가열하여 발색한 후 상온에서 방냉하였다. 발색액은 96 well microplate reader (Sunrise-BAS/C, Tecan Co., USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각각의 실험은 3반복한 후 평균값을 구하여 다음의 식으로 저해율을 계산하였다. 각각의 효소활성은 unit로 환산하여 나타내었으며,  $\alpha$ -amylase 활성을 50% 저해하는 농도를 IC<sub>50</sub>으로 계산하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = [1 - (\text{시료 첨가구 효소활성} / \text{대조구 첨가구 효소활성})] \times 100.$$

### $\alpha$ -Glucosidase 저해 활성

다양한 농도의 천연물 시료 2.5  $\mu$ L와 50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.6)로 희석한  $\alpha$ -glucosidase (0.68 U/mL) 25  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 10분간 preincubation 한 후, 0.5% soluble starch 25  $\mu$ L를 가하여 60°C에서 10분간 반응하였다. 이후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰으며, 생성된 포도당을 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 용액을 가하여 동일한 방법으로 발색한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 실험은 3반복한 후 평균값을 구하여 저해율을 계산하였다. 한편 pNPG (p-nitrophenol glucoside; Sigma Co., USA)를 이용한  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 Lim 등(15)의 방법을 이용하여 평가하였다. 다양한 농도의 천연물 시료 2.5  $\mu$ L와 50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.6)로 희석한  $\alpha$ -glucosidase (0.25 U/mL) 25  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 10분간 preincubation 하고 1 mM pNPG 용액 25  $\mu$ L를 가하여 60°C에서 10분간 반응하였다. 이후 1M NaOH 25  $\mu$ L를 가하여 반응을 정지시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 계산하였다.

### 인간적혈구에 대한 용혈 활성

브라질 천연물 추출물들의 안전성 평가의 일환으로 인간 적혈구(4%)를 이용하여 용혈 활성을 평가하였다(19). 먼저 PBS로 3회 수세한 인간 적혈구 100  $\mu$ L를 96-well microplate에 가하고 시료용액 100  $\mu$ L를 가한 다음 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이후, 반응액을 10분간 원심분리(1,500 rpm)하여 상등액 100  $\mu$ L를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 용혈에 따른 헤모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하였다.

시료의 용매 대조구로는 DMSO (2%), 실험 대조구로는 triton X-100 (0.1%)을 사용하였다. 용혈활성은 다음의 수식을 이용하여 계산하였다.

$$(\%) \text{ Hemolysis} = [(Abs. S - Abs. C)/(Abs. T - Abs. C)] \times 100$$

Abs. S: 시료 첨가구의 흡광도, Abs. C: DMSO 첨가구 흡광도, Abs. T: triton X-100 첨가구의 흡광도

**선정시료의 열 및 산 안정성**

최종 선정된 *Anacardium humile* A. St.-Hil. 추출물(100 µg/mL)을 대상으로 열 안정성 및 산 안정성을 평가하였다. 열 안정성의 경우 80℃에서 60분간 열처리 후 잔존 α-amylase 저해활성을 평가하였으며, 산 안정성의 경우에는 pH 2 (0.01 N HCl)조건에서 60분 처리 후 pH 7로 조정 후 잔존 α-amylase 저해활성을 평가하였다. 대조구로는 100 µg/mL 농도의 acarbose를 동일조건에서 각각 처리 후 잔존 활성을 평가하였다.

**통계처리**

실험결과의 통계분석은 SPSS program을 이용하여 mean±SD로 나타내었으며, one-way ANOVA 분석 및 Duncan의 다중비교검정(p<0.05)을 실시하였다.

**결과 및 고찰**

**α-Amylase 저해활성**

100 종 브라질 천연물의 α-amylase 저해활성을 평가한 결과는 Table 2에 나타내었다. 대부분의 시료는 20% 미만의 매우 미미한 저해효과를 나타내었으며, *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn., *Equisetum giganteum* L. 및 *Plectranthus barbatus* Andrews 와 같은 일부 시료는 약 10%의 α-amylase 촉진활성을 나타내었다. Type II 당뇨치료제로 사용되고 있는 acarbose의 경우에는 0.125 mg/ml농도에서 63%, 0.25 mg/ml 농도에서 64.8%, 0.5 mg/mL 농도에서 68.7%의 저해를 나타내었으며(Fig. 1), 천연물 시료농도 0.5 mg/mL 농도에서 45% 이상의 저해를 나타낸 시료는 *Acacia jurema* Mart., *Anacardium humile* A. St.-Hil., *Cedrela odorata* L., *Guazuma ulmifolia* Lam. 및 *Plumeria drastica* Mart.의 5종이었다. 그러나 1 mg/mL 농도에서는 추가적으로 *Acacia plumosa* Mart. ex Colla, *Bauhinia forficata* Link, *Copaifera lansdorfii* Desf., *Myroxylon peruiferum* L. f. 및 *Schinus terebinthifolia* Raddi의 5종에서 50% 이상의 저해를 나타내어 1 mg/mL의 고농도에서는 10종 시료에서 우수한 α-amylase 저해활성을 나타내었다. 한편 현지에서 당뇨 치료제로 이용되는 천연물은 *A. humile* A. St.-Hil., *B. forficata* Link, *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, *Symphytum*

**Table 2. The inhibitory activity of Brazilian plants extract against α-amylase and α-glucosidase, and hemolytic activity against human red blood cell.**

No.	α-Amylase inhibition (%)		α-Glucosidase inhibition (%)		Hemolysis against hRBC (%)		
	0.5*	1.0	DNS**	pNPG***	0.1	0.25	0.5
1	61.36	55.89	23.02	-1.83	0.00	0.00	0.00
2	30.62	50.97	21.71	2.42	18.83	63.53	87.66
3	2.70	-1.22	23.04	2.63	0.00	0.00	10.35
4	-0.12	16.09	28.16	-3.36	4.83	100.00	100.07
5	3.93	5.96	20.94	-8.27	0.00	0.00	0.00
6	-4.13	-7.60	27.32	-2.27	0.00	0.00	0.00
7	65.13	57.28	23.72	-13.86	0.00	0.00	0.00
8	12.04	34.35	20.52	-0.40	0.00	0.00	0.00
9	3.26	0.36	19.58	-0.55	0.00	0.00	2.42
10	-4.28	-28.53	19.14	-11.70	0.00	51.30	88.60
11	4.97	5.78	21.93	-1.90	0.00	0.00	0.00
12	15.96	7.04	25.76	-2.85	0.00	0.00	0.00
13	7.15	6.75	20.05	-0.80	0.00	0.00	0.00
14	-5.43	4.52	21.81	-3.26	0.00	0.00	0.00
15	4.15	12.62	20.77	-0.93	0.00	0.00	0.00
16	7.55	5.25	26.99	2.04	0.00	91.88	93.61
17	39.45	62.13	24.60	-9.45	0.00	0.00	0.00
18	23.72	7.68	13.47	8.45	0.00	0.00	0.00
19	18.91	9.67	31.41	16.82	0.00	0.00	18.47
20	8.04	1.42	24.32	0.17	0.00	0.00	0.00
21	0.00	8.07	29.40	7.84	0.00	0.00	0.00
22	1.36	3.81	24.79	-7.85	0.00	0.34	97.58
23	-8.28	7.51	19.89	-2.40	0.00	0.00	0.00
24	-10.46	9.48	27.71	-2.83	0.00	0.00	0.00
25	4.32	11.51	27.68	4.51	0.00	0.00	0.00
26	5.58	7.08	25.02	-14.35	0.00	0.00	0.00
27	46.04	55.63	23.44	-3.21	0.00	0.00	0.00
28	-7.58	1.07	21.10	2.67	0.00	0.00	0.00
29	-10.11	8.35	21.51	0.99	0.00	0.00	0.00
30	-7.64	-1.38	18.33	4.28	0.00	0.00	0.00
31	10.95	8.43	22.05	-0.10	0.00	0.00	0.00
32	9.75	9.64	20.18	-2.18	0.00	0.00	0.00
33	35.61	61.98	15.50	-4.97	0.00	0.00	0.00
34	11.11	9.39	17.77	4.12	0.00	0.00	14.25
35	2.02	3.96	19.46	1.30	0.00	0.00	22.87
36	12.79	12.66	11.56	-2.45	0.00	0.00	0.00
37	5.28	4.53	18.51	5.79	0.00	0.00	0.00
38	16.07	-1.00	19.67	3.83	0.00	0.00	0.00
39	13.61	14.42	18.08	-3.26	0.00	0.00	0.00
40	21.84	33.13	17.43	4.73	0.00	0.00	0.00
41	3.83	2.84	26.23	-1.26	0.00	0.00	0.00
42	-5.58	2.86	31.04	-21.07	0.00	0.00	0.00
43	13.99	7.03	31.45	-5.70	0.00	0.00	0.00
44	-10.70	4.06	13.12	5.70	0.00	0.00	0.00
45	4.56	-0.28	19.10	0.45	0.00	0.00	0.00
46	-10.95	8.53	19.41	7.33	0.00	0.00	0.00
47	3.21	14.29	19.68	2.62	0.00	0.00	0.00
48	-3.87	14.40	74.36	6.39	0.00	0.00	0.00
49	54.51	52.84	25.74	6.67	0.00	0.00	0.00

No.	α-amylase inhibition(%)		α-glucosidase inhibition(%)		Hemolysis against hRBC (%)		
	0.5*	1.0	DNS**		0.1	0.25	0.5
			0.5	pNPG***			
50	3.15	-6.71	35.02	12.65	0.00	5.51	0.00
51	23.63	33.33	19.32	5.54	0.79	0.00	0.00
52	5.33	1.33	19.75	1.79	0.00	0.98	0.00
53	9.53	11.03	18.22	5.54	0.69	2.59	0.00
54	5.15	7.42	17.43	2.61	0.00	3.54	2.59
55	18.96	25.42	21.53	-1.91	1.64	8.66	9.98
56	2.19	15.21	28.04	2.02	0.00	92.29	97.70
57	18.22	13.09	21.15	2.44	0.00	0.00	0.00
58	18.29	35.91	6.62	-5.36	0.00	0.00	0.00
59	19.89	18.50	20.91	12.23	0.00	0.00	5.51
60	12.66	11.23	19.78	3.73	0.00	0.00	0.00
61	3.67	-16.67	15.08	-3.32	0.00	1.41	1.61
62	13.65	25.39	18.39	-2.70	0.00	7.81	35.61
63	22.17	36.83	26.79	-3.26	0.00	70.79	82.54
64	30.06	59.54	16.69	7.26	0.00	0.00	0.00
65	7.15	16.93	19.56	17.30	0.00	0.00	2.89
66	13.45	-3.50	16.93	-1.19	0.00	0.00	0.00
67	2.25	3.07	20.28	1.71	0.00	0.00	0.00
68	0.45	1.46	29.56	-1.13	0.00	0.00	0.00
69	9.51	17.32	18.94	-3.66	0.00	0.00	6.37
70	10.60	6.48	23.80	-5.06	0.00	0.00	0.00
71	2.43	-1.90	10.98	-3.69	0.00	0.00	0.00
72	-13.71	12.03	12.72	-2.31	0.00	0.00	0.00
73	53.48	54.86	7.97	-1.16	0.00	0.00	6.17
74	3.81	0.64	18.03	4.22	0.00	1.12	68.76
75	11.80	33.48	14.33	1.26	0.00	0.00	0.00
76	-4.19	-1.91	16.19	-12.16	0.00	0.00	0.00
77	2.60	-1.56	14.54	-1.58	0.00	0.00	0.00
78	7.29	6.29	27.86	3.46	0.00	2.63	12.80
79	-7.39	11.18	13.91	-3.56	0.00	0.00	0.00
80	1.22	11.90	23.96	6.33	0.00	0.00	0.00
81	27.06	53.47	20.20	-7.95	0.00	0.00	0.00
82	12.12	12.76	22.12	-5.66	0.00	0.00	0.00
83	11.61	9.68	21.60	-5.21	0.00	56.46	86.48
84	13.21	6.16	19.40	0.59	0.00	0.00	0.00
85	3.46	14.54	20.21	-4.60	0.00	0.00	0.00
86	3.60	9.07	19.99	3.00	0.00	0.00	0.00
87	11.92	10.97	33.05	-5.23	0.00	0.00	0.00
88	7.67	8.90	16.77	0.00	0.00	0.00	0.00
89	36.48	40.93	24.32	7.51	0.00	0.00	0.00
90	4.16	5.54	18.20	-6.45	0.00	0.00	0.00
91	12.52	33.94	20.39	-36.00	0.00	0.00	0.00
92	5.37	6.36	19.72	-4.04	0.00	0.00	0.00
93	10.89	10.10	14.90	14.70	0.00	0.00	0.00
94	7.27	14.77	17.68	10.70	0.00	0.00	3.19
95	42.90	37.16	24.05	10.12	0.00	0.00	0.00
96	13.61	29.30	20.25	21.91	0.00	0.00	0.00
97	7.08	11.98	19.57	5.68	0.00	0.00	0.00
98	6.63	7.30	14.16	1.35	0.00	0.00	0.00
99	9.83	14.66	17.21	6.54	0.00	0.00	0.00
100	4.86	8.69	15.28	10.38	0.00	0.00	0.00

\*: concentration (mg/ml), \*\*: measured by DNS methods, \*\*\*: measured by pNPG methods.

*officinale* L. 및 *Syzygium cumini* (L.) Skeels의 5종으로, 이 중에서 *A. humile* A. St.-Hil.과 *B. forficata* Link는 항당뇨제의 과학적 근거가 있는 것으로 판단된다. 한편 0.5 mg/mL 농도에서 우수한 저해활성을 나타낸 5종의 시료를 대상으로 다양한 농도에서의 α-amylase 저해활성을 평가한 결과는 Fig. 1에 나타내었으며, IC<sub>50</sub>을 평가한 결과 acarbose, *A. humile* A. St.-Hil., *A. jurema* Mart., *P. drastica* Mart., *C. odorata* L. 및 *G. ulmifolia* Lam.의 순으로 50.5, 91.2, 149.0, 212.1, 356.7 및 380.9 μg/mL로 나타나, *A. humile* A. St.-Hil.이 가장 우수한 것으로 판단되었다.

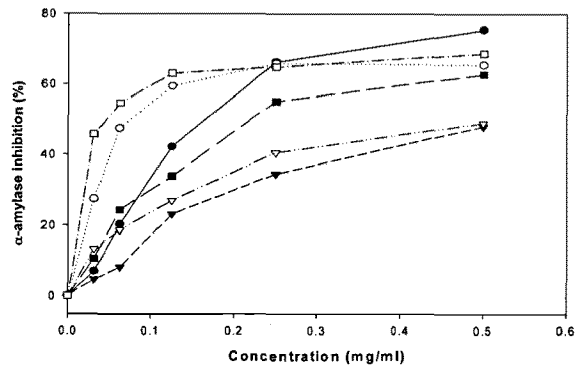


Fig. 1. Inhibition of microbial α-amylase by plant extract.

*Acacia jurema* Mart (●), *Anacardium humile* A. St.-Hil. (○), *Cedrela odorata* L. (▼), *Guazuma ulmifolia* Lam. (▽) and *Plumeria drastica* Mart (■). Acarbose (□) was used as positive control.

α-Glucosidase 저해 활성

브라질 천연물 0.5 mg/mL 농도에서 soluble starch를 이용한 α-glucosidase 저해활성을 평가한 결과, 대부분의 시료는 6.7~35.0%의 저해활성을 나타내었으며, 유일하게 브라질 체리로 알려진 *Eugenia uniflora* L.에서 74.4%의 우수한 저해를 나타내었다. *E. uniflora* L. 추출물과 acarbose의 α-glucosidase에 대한 IC<sub>50</sub>는 각각 79.5 및 0.1 μg/mL로 나타나, acarbose에 비해 브라질 천연물의 α-glucosidase 저해활성은 상대적으로 매우 약한 것으로 판단되었다. 그러나 쥐 소장점막 α-glucosidase에 대한 acarbose의 IC<sub>50</sub>가 40 μg/mL 임(10)을 고려하면 *E. uniflora* L. 추출물의 IC<sub>50</sub>는 의미가 있다고 판단된다. 특히 천연물의 경우 α-amylase 및 α-glucosidase 저해활성을 동시에 나타내는 경우가 일반적이 데 비해, *E. uniflora* L.의 경우에는 α-glucosidase에만 강력한 저해를 나타내어 향후 α-glucosidase 제어 및 작용기작 연구에 매우 중요한 시료로 사용될 수 있으리라 판단된다.

한편 브라질 천연물 0.5 mg/mL 농도에서 pNPG를 기질로 이용한 α-glucosidase 저해활성을 평가한 결과, 50개의 시료에서 0~21.9%의 약한 저해 활성을, 나머지 50개의 시료에서는 0~36.0%의 α-glucosidase 촉진활성을 나타내었다 (Table 2). 가장 우수한 저해활성을 나타낸 시료는 *Waltheria douradinha* Saint-Hilaire이었으며, 가장 우수한 촉진활성을

나타낸 시료는 *Talisia esculenta* (A. St.-Hil.) Radlk.이었다. 이러한 결과는 사용하는 기질종류에 따라  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 달라질 수 있음을 나타내며, 실질적인 항산독증제 이용을 위해서는 전분을 기질로 사용한 경우  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해효과를 동시에 나타내는 천연물의 선택이 필요하리라 판단된다. 따라서 본 연구에서는 *A. humile* A. St.-Hil.을  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해제로 선정하였다.

**인간 적혈구 용혈 활성**

브라질 시료의 실제적 이용가능성을 검토하기 위해 인간 적혈구 용혈활성을 평가하였다(Table 2). 먼저 0.1 mg/mL 농도에서 *Acacia plumosa* Mart. ex Colla에서 18.8%의 용혈활성이 나타났으며, 나머지 시료에서는 0~5%의 용혈현상이 나타났다. 0.25 mg/mL 농도에서는 *A. plumosa* Mart. ex Colla, *Aesculus hippocastanum* L., *Archangelica officinalis* Hoffm., *Baccharis trimera* (Less.) DC., *Luffa operculata* (L.) Cogn., *Myristica fragrans* Houtt., 및 *Smilax japicanga* Griseb의 7종에서 51.3~100%의 용혈이 확인되었으며, 1 mg/mL 농도에서는 *Calendula officinalis* L. 및 *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq에서 50% 이상의 용혈현상이 나타나, 100종 시료 중에서 총 9종에서 50% 이상의 용혈활성을 나타내었다. 그러나  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해제로 선정된 *A. humile* A. St.-Hil.은 1 mg/mL 농도에서도 전혀 용혈현상을 나타내지 않았다.

**최종 선정된 *Anacardium humile* A. St.-Hil.의 열 및 산 안정성**

*A. humile* A. St.-Hil. 추출물(100  $\mu$ g/mL)을 대상으로 열 안정성 및 산 안정성을 평가한 결과는 Fig 2에 나타내었다. 대조군으로 사용된 acarbose (100  $\mu$ g/mL)는 산 및 열 처리에 안정하였으며, 선정된 추출물 역시 80 $^{\circ}$ C에서 60분간 열처

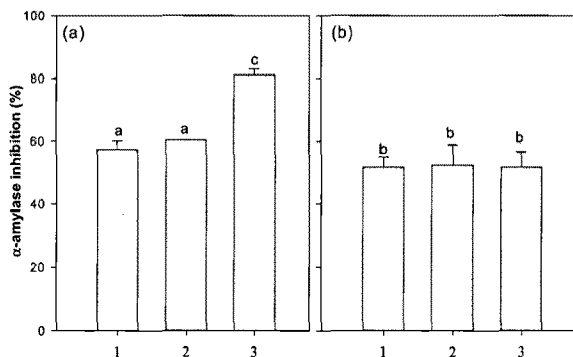
리시에 안정된  $\alpha$ -amylase 저해활성을 나타내었다. 그러나 선정된 추출물은 60분간 산 처리(0.01 N HCl)시  $\alpha$ -amylase 저해활성이 57.5% 에서 81.2%로 오히려 증가되었다. 이러한 결과는 *A. humile* A. St.-Hil. 추출물이 산 및 열 처리에 안정하며, 적절한 산처리에 의해  $\alpha$ -amylase 저해활성을 증대시킬 수 있으며, 항산독증 및 type II 항당뇨제로 개발 가능성을 암시하고 있다. 현재 *A. humile* A. St.-Hil.로부터 활성물질의 정제 및 산 처리에 의한 활성증대 기작을 연구 중에 있다.

**요 약**

반추동물의 급성 산독증의 예방 및 치료제 개발을 위해 100종의 브라질 식물 추출물을 이용하여 미생물 유래의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 평가하였다. 그 결과 *Acacia jurema* Mart., *Anacardium humile* A. St.-Hil., *Cedrela odorata* L., 및 *Guazuma ulmifolia* Lam 추출물에서 우수한  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 확인하였으며, *Plumeria drastica* Mart.에서는 우수한  $\alpha$ -amylase 특이적 저해활성을, *Eugenia uruiflora* L.에서는 강력한  $\alpha$ -glucosidase 특이적 저해 활성을 확인하였다. 6종의 추출물을 대상으로  $\alpha$ -amylase에 대한 IC<sub>50</sub> 평가 결과, 현지에서 항당뇨제로 사용되는 *A. humile* A. St.-Hil., 추출물(IC<sub>50</sub>: 91.2  $\mu$ g/ml)이 가장 강력한 저해를 나타내었으며, 항당뇨제로 이용되고 있는 acarbose (IC<sub>50</sub>: 50.5  $\mu$ g/mL)의 저해활성에 필적하였다. *A. humile* A. St.-Hil., 추출물은 80 $^{\circ}$ C, 또는 0.01N HCl 조건에서 60분간 처리에 활성의 변화가 나타나지 않았으며, 산 처리 시에는 오히려 활성의 증가가 나타났다. 또한 *A. humile* A. St.-Hil., 추출물은 인간 적혈구에 대한 용혈활성을 나타내지 않아 반추동물의 급성 산독증 및 인간 당뇨병 치료에도 이용 가능하리라 판단된다.

**참고문헌**

1. Bae, G.S., Bae, J.H., Yun, S.J., Chang, M.B., Ko, J.Y. and Ha, J.K. (2002) Effect of whole or steam-flaked corn based diet on ruminal fermentation characteristics in vitro and ruminal metabolism in Korean native goat *in vivo*. *J. Anim. Sci. Technol.*, 44, 757-768
2. Baht, M., Zinjarde, S. S., Bhargava, S.Y., Kumar, A.R. and Joshi, B.N. (2008) Antidiabetic Indian plants: a good source of potent amylase inhibitors. *eCAM*, Jun 27. 1-6
3. Costa, E.S., Hiruma-Lima, C.A., Lima, E.O., Sucupira, G.C., Bertolin, A.O., Lolis, S.F., Andrade, F.D.P., Vilegas, W. and Souza-Brito, A.R.M. (2008) Antimicrobial



**Fig. 2. Changes of  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of (a) *Anacardium humile* A. St.-Hil. and (b) acarbose against heat and acid treatment.**

1: without treatment 2: heat treatment (80 $^{\circ}$ C for 1 h), 3: acid treatment (pH 2 for 1 h). Error bar indicate the standard error of each mean value (n=3). Means with different superscripts are significantly different (P<0.05).

- activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. *Phytother. Res.*, 22, 705-707
4. Endringer, D.C., Valadares, Y.M., Campana, P.R., Campose, J.J., Guimaraes, K.G., Pezzuto, J.M. and Braga, F.C. (2009) Evaluation of Brazilian plants on cancer chemoprevention targets in vitro. *Phytother. Res.*, 10.1002/ptr.3050 (Early view)
  5. Gao, H. and Kawabata, J. (2005)  $\alpha$ -Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. Part 3: synthesis and evaluation of 2,3,4-trihydroxybenzoyl-containing flavonoid analogs and 6-aminoflavones as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 1661-1671
  6. Ha, J.K. and Emerick, R.J. (1984) Effect of dietary buffers on rumen and blood parameters of rumen-cannulated. *Kor. J. Anim. Sci.*, 26, 682-688
  7. Ha, J.K., Emerick, R.J. and Embry, L.B. (1985) Effect of buffers and alfalfa hay on ruminal and systemic parameters of sheep fed high concentrate diets. *Korean. J. Anim. Sci.*, 27, 80-96
  8. Ha, J.K., Emerick, R.J. and Embry, L.B. (1985) Effect of hay sources in reducing ovine rumen acidosis. *Korean. J. Anim. Sci.*, 27, 20-23
  9. Heo, S.J., Hwang, J.Y., Choi, J.I., Han, J.S., Kim, H.J. and Jeon, Y.J. (2009) Diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 615, 252-256
  10. Kim, H.Y. (1997) In vitro inhibitory activity on rat intestinal mucosa  $\alpha$ -glucosidase by rice hull extract. *Korean. J. Food Sci. Technol.*, 29, 601-608
  11. Kim, J.H., Kim, M.U. and Cho, Y.J. (2007) Isolation and identification of inhibitory compound from *Crataegi fructus* on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *J. Korean. Soc. Appl. Biol. Chem.*, 50, 204-209
  12. Krause, K.M. and Combs, D.K. (2003) Effects of forage particle size, forage source, and grain fermentability on performance and ruminal pH in midlactation cows. *J. Dairy Sci.*, 86, 1382-1397
  13. Krause, K.M., Combs, D.K. and Beauchemin, K.A. (2003) Effects of increasing levels of refined cornstarch in the diet of lactating dairy cows on performance and ruminal pH. *J. Dairy Sci.*, 86, 1341-1353
  14. Lee, D.S., Kim, J.K. and Lee, S.H. (2006) Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity by quercetin. *Korean. J. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 368-372
  15. Lim, C.S., Li, C.Y., Kim, Y.M., Lee, W. Y. and Rhee, H. I. (2005) The inhibitory effect of *Corus walteri* extract against  $\alpha$ -amylase. *J. Korean. Soc. Appl. Biol. Chem.*, 48, 103-108
  16. McLaughlin, C.L., Thompson, A., Greenwood, K., Sherington, J. and Bruce, C. (2009) Effect of acarbose on acute acidosis. *J. Dairy Sci.*, 92, 2758-2766
  17. McLaughlin, C.L., Thompson, A., Greenwood, K., Sherington, J. and Bruce, C. (2009) Effect of acarbose on milk yield and composition in early lactation dairy cattle fed a ration to induce subacute ruminal acidosis. *J. Dairy Sci.*, 92, 4481-4488
  18. Rustomo, B., Alzahal, O., Odongo, N.E., Duffield, T.F. and McBride, B.W. (2006) Effect of rumen acid load from feed and forage particle size on ruminal pH and dry matter intake in the lactating dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 89, 4758-4768
  19. Woo, S.S., Park, Y.K., Choi, C.H., Hahm, K.S. and Lee, D.G. (2007) Mode of antibacterial action of a signal peptide, Pep<sup>27</sup> from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363, 806-810
  20. Yin, Y., Heo, S.I., Jung, M.J. and Wang, M.H. (2009) Antioxidant and antidiabetic effects of various sections of *Astragalus membranaceus*. *Korean. J. Pharmacogn.*, 40, 1-5

---

(접수 2010년 12월 4일, 채택 2010년 3월 19일)