

과제구분	기본연구	수행시기		전반기	
중장기 Code		RIMS Code			
연구과제 및 세부과제		연구분야 (Code)	수행 기간	연구실	책임자
강원도산 자생식물로부터 고부가가치 기능성 소재개발		물질소재 (LS1005)	'05 ~'08	생물소재연구실	임상현
1) 항균 및 혈당강하 기능을 가진 천연소재탐색 및 이용연구		물질소재 (LS1005)	'05 ~'08	생물소재연구실	임상현
색인용어	식물추출물, 혈당강하				

ABSTRACT

This study was performed to investigate the antibacterial and the anti-diabetic activity of plant extracts. Antibacterial activity was determined in vitro by paper disc method using *C. tropicalis* and *C. albicans*. Anti-diabetic activity was determined in vitro by the inhibitory activity against α -glucosidase. Among plant extracts 10 plants extracts were selected for development of antibacterial activity and *Eleutherococcus senticosus* extracts were selected for development of anti-diabetic activity. IC₅₀ of α -glucosidase in leaf were the lowest 1.16 mg/ml in the different parts of *E. senticosus*. 80% ethanol extracts of leaf was fractioned with various solvents such as hexane, chloroform, ethylacetate, butanol and water. The inhibitory activity of ethylacetate fractions against α -glucosidase were similar the anti-diabetic activity of acarbos. Relatively n-butanol fractions showed high anti-diabetic activity and return rate.

1. 연구목표

최근 생활에 필요한 다양한 재료를 유기합성물질에 의존하던 경향이 변화하고 있다. 생활의 질에 관심을 가지면서 비교적 안전한 것으로 인식되어지는 천연물을 선호하는 경향이 두드러지게 나타나고 있다. 이러한 경향이 자연계에서 생산되는 다양한 유래의 천연물에 대한 관심을 유발하고 있고, 최근에는 천연물전쟁이라 불릴 만큼 여러 분야에서 새로운 활성물질을 찾아내려는 시도가 이루어지고 있다(김, 2006 ; 이, 2002 ; 임, 2008.).

강원도는 동해안지에서 해발 800m에 이르는 고령지까지 다양한 기후가 분포하는 지역을 포함하고 있어서 아열대성 작물인 차(*Camellia sinensis*)에서 시베리아 등지에 자생지가 분포하는 가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus*)에 이르기까지 작물의 분포와 작형도 다양하고 특히 자생식물의 분포 종이 매우 다양하여 기록된 종(a species)만도 1,722종에 이른다(박 등, 2007). 이러한 다양한 환경과 식물종 분포는 식물에서 유래하는 천연물을 연구하기에 매우 유리한 조건이다. 우리 연구팀은 이러한 조건에 착안하여 2005년부터 식물유래

천연추출물 은행을 구축한 바 있다. 또한 이미 각 분야에서 강원도의 자생식물을 활용해서 활성물질을 탐색하는 연구가 이루어지고 있으며, 여러 분야에서 연구 성과도 보고되고 있다 (고 등, 2004 ; 김 등, 2006 ; 전, 2007 ; 정 등, 2007).

유전적인 문제와 식품섭취가 영향을 주는 당뇨는 최근 영양섭취가 과도한 사회적 여건에 의해 크게 증가하는 추세이며(김 등, 2006 ; 하 등, 2005), 또한 식생활의 개선에 의해 증세가 호전될 가능성이 높은 질병이기도 하다. 따라서, 본 연구는 혈당강하 활성을 가진 자생식물 추출물을 찾아내고 활성물질을 분리하며, 활성정도에 따라 식품 또는 약품으로의 활용방안을 제시하는 것을 목표로 하고 있다.

2. 재료 및 방법

가. *Candida* sp.에 대한 추출물의 항균활성실험

천연 항균활성 소재 탐색은 145종의 천연 추출물을 재료로 하여 *candida* sp. 균주에 대한 *in vitro* 활성실험을 paper disc method로 측정하였다. YM배지에서 25°C, 48시간 배양하였으며 추출물은 농축하여 동결 건조한 추출물을 10mg/ml 농도로 희석하여 사용하였다('08). 대조 약제는 Ketoconazol 5, 10, 20µg/ml을 사용하였다. 실험에 사용한 균주는 *C. tropicalis* 와 *C. albicans*이며, 항균활성은 paper disc에서 형성된 저지원의 평균길이를 평가하였다.

나. 탄수화물 소화효소(α -glucosidase) 저해활성 조사

메탄올추출물의 α -glucosidase 저해활성은 Watanabe 등의 방법(1997)에 따라 측정하였다. 50µl yeast α -glucosidase (Sigma, USA : 0.7U/ml)와 메탄올추출물 10µl를 96-well plate에 넣고 microplate reader(Model 550, Biorad, USA)를 이용하여 파장 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 5분 후에 기질 p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside를 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시켜 5mM 농도로, 50µl를 첨가한 후 실온에서 5분간 반응시킨 뒤, 동일한 파장에서 흡광도를 측정하였고, 흡광도 변화로부터 효소 저해활성을 계산하였다. 대조구는 acarbose(혈당강하제제)를 사용하여 메탄올추출물의 저해활성을 비교하였다

다. 선발된 추출물의 분획과 활성층 탐색

가시오갈피의 수확부위별 80% ethanol 추출물 일정량에 20배(v/w)의 증류수를 가하여 현탁시킨 후 증류수와 동량의 n-Hexane층을 분리한 후 남아있는 수용액 층에 다시 동량의 n-hexane을 가하여 같은 방법으로 총 3회 분획하였다. 용매의 극성에 따라 chloroform, ethyl-acetate, n-butanol을 같은 방법으로 3회씩 각각 순차적으로 가하여 분획하고, 남아있는 부분을 aqueous분획으로 하였다(그림 1).

분획된 5개 층에 대한 활성검정은 반복되는 실험을 전제로 하기 때문에 대체로 간략한 실험법이 유리하다. 따라서 추출물을 대상으로 1차적인 스크린을 거친 α -glucosidase 저해 활성 실험법(Watanabe, 1997)을 활성층 탐색을 위한 실험법으로 활용하였으며, 실험법은 '나'와 동일하게 수행하였다.

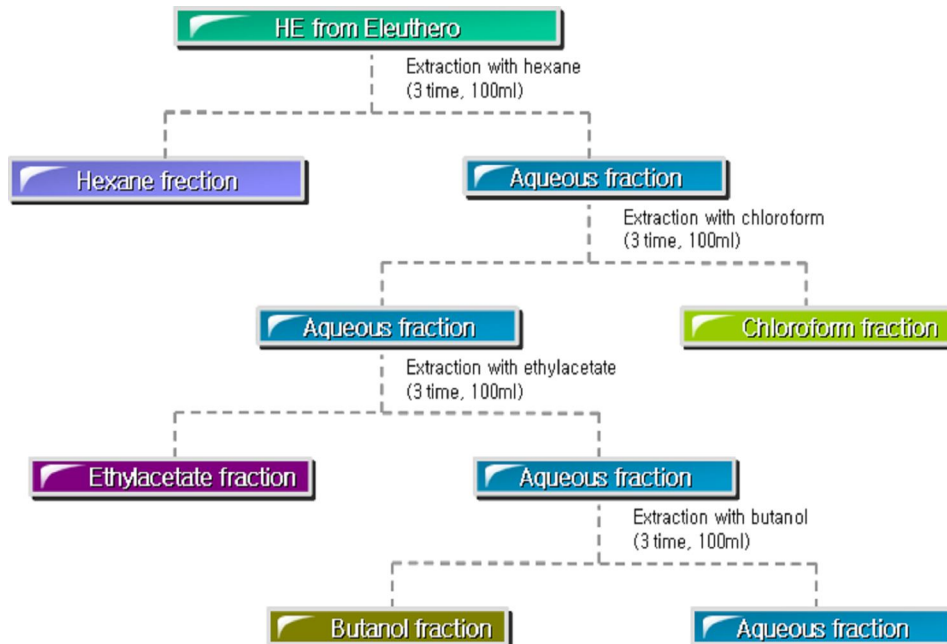


그림 1. 항당뇨 활성이 있는 천연추출물에서 활성층을 탐색하기 위한 분획 모식도

3. 결과 및 고찰

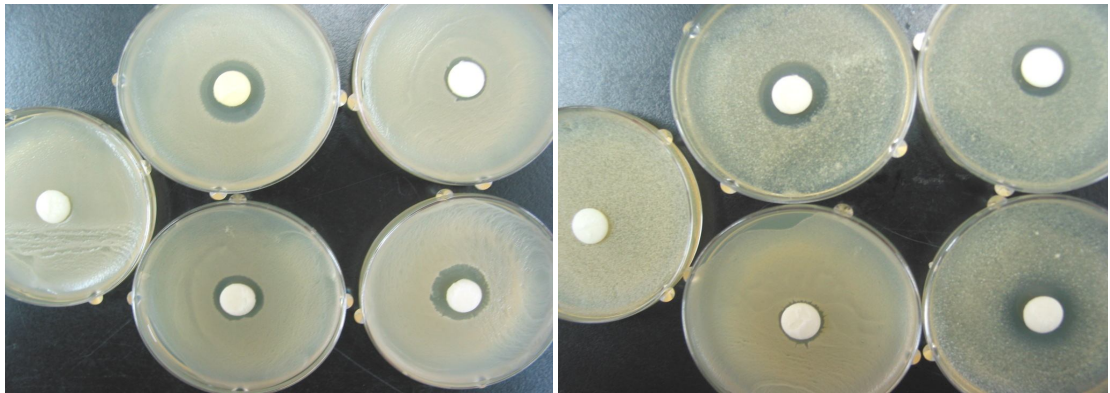
가. *Candida* sp.에 대한 식물추출물의 항균활성

강원도 농업기술원 농산물이용시험장 소재 추출물은행에서 보유하고 있는 145종의 천연추출물을 대상으로 3년간 *Candida* sp.에 대한 항균활성을 가지는 식물추출물을 탐색하였다. Paper disc법으로 측정한 결과, *Candida* sp.에 대해 10mm 이상의 저지원을 형성하는 수준의 항균활성을 가지는 식물추출물은 총 7종(그림 2)이 있었으나 10mm 정도의 수준은 활성이 그리 큰 편은 아니어서 *Candida* sp.에 대해 강력한 항균력이 있을 것으로 기대되는 추출물을 찾지는 못한 것으로 판단되었다(표 1). 또한 목적하는 *Candida tropicalis*와 *Candida albicans*(질염 원인균)에 대한 항균물질을 *in vitro* 검정을 통해 찾아낸다 하더라도 paper disc법에 의한 기내 항균검정으로 실제 인체에 있어 효과가 있다고 확신할 수 없었다. 따라서 스크린 후 인체실험에 착수하기 전단계에서 확률을 높일 수 있도록 신뢰성 높은 *in vivo* 실험이 필요하였다. 그러나 질염균에 대한 신뢰할 수 있는 정립된 *in vivo* 실험법을 찾지 못하였고, *Candida* sp.를 대상으로 하는 paper disc법을 물질분리를 위한 항균활성실험법으로 하거나, 항균활성실험결과가 인체에 감염된 질염균에 대해 직접 활성이 있을 것으로 기대하기에는 무리가 있다고 판단되었다. 따라서 본 실험에서는 *in vitro* 검정 이후 연구를 이끌어가기 위한 만족할 만한 대안이 없는 상태에서 연구비 및 인력투입이 매우 큰 것으로 예상되는 물질분리를 시도하지는 않기로 하였다.

표 1. *Candida* sp.에 항균활성을 가지는 천연물 ('07~'08)

추출물 번호	생육저해효과 ^{a)}		
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	
'06 ~ '07	GAR301	++	+++
	GAR513	++	++
	GAR516	++	+++
	GARBH	+++	+++
	GARBR	++	+++
	GARBSH	+++	+++
'08	HM033	-	+
	HM037	-	++
	HM134	-	+
	HM137	-	+
N. Control ^{b)}		-	-

a) 항균활성 : +, inhibitory zone(~10mm); ++, inhibitory zone (10~15mm);+++,
inhibitory zone (15mm~) in diameter ; - in active
 ※ YM 배지, 25℃, 48hr, 대조약제 (KCZ, Ketoconazol)농도 : 5, 10, 20µg/ml
 ※ 조제된 추출물을 10mg/ml의 농도로 희석하여 사용('08)



4종 천연물의 *C. tropicalis* 생육억제('06~'07)
Control, GARBH, BI, BR, BSH

4종 천연물의 *C. albicans* 생육억제('06~'07)
Control, GARBH, BR, BI, BSH

그림 2. *Candida* sp.에 항균활성을 가지는 천연물에 대한 활성실험 결과비교 ('07~'08)

나. 탄수화물 소화효소(α -glucosidase) 저해활성 조사

추출물은행에서 자생식물 및 아로마 오일을 대상으로 한 '06년도와 '07년도 실험에서는 α -glucosidase 저해활성검정실험에 control이 설정되지 않아서 명확하게 가능하기 어려운 면이 있으나 브로콜리(*Brassica oleracea* var. *italica*)에서 활성이 높았으며, 총 5종의 추출물을 α -glucosidase 저해활성이 있는 종으로 선발하였다(표 2).

표 2. 탄수화물 소화효소(α -glucosidase) 저해 활성을 가지는 추출물('07)

samples	억제율(%)			
	0.01(mg/ml)	0.1	1	5
GAR506	15.2 ± 1.9	5.0 ± 2.0	10.6 ± 3.6	69.3 ± 2.7
GAR510	2.5 ± 1.9	0.9 ± 2.7	21.6 ± 3.1	45.5 ± 4.9
GAR608	1.2 ± 1.1	6.8 ± 4.1	8.2 ± 2.6	29.2 ± 1.6
GAR610	19.8 ± 1.8	10.1 ± 1.9	7.0 ± 3.4	71.0 ± 2.6
GAR612*	7.8 ± 1.8	4.8 ± 3.0	25.8 ± 2.9	48.4 ± 4.6

* 브로콜리(*Brassica oleracea* var. *italica*) 추출물

30종의 한약재 추출물을 대상으로 실험한 '08년 α -glucosidase 저해활성검정 실험결과는 가시오갈피(*E. senticosus*) 추출물에서 acarbose 대비 50% 수준의 저해활성을 보였다. 식물체의 부위별로는 잎에서 IC₅₀이 1.16mg/ml로 활성이 가장 높았으며 뿌리, 줄기, 열매의 순이었다(표 3).

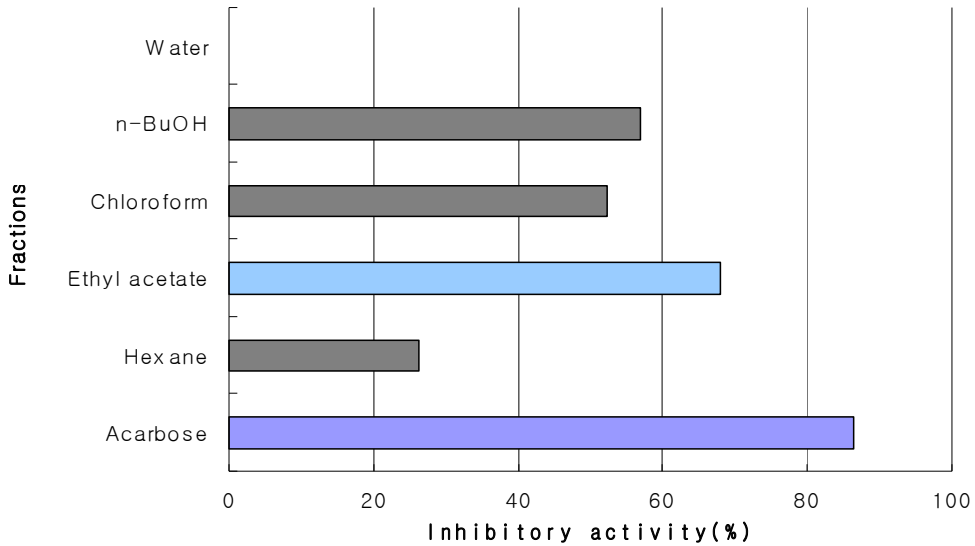
표 3. 가시오갈피 부위별 α -glucosidase 저해 활성

Samples	IC ₅₀ *(mg/ml)	
<i>E. senticosus</i>	Root	2.62
	Stem	3.72
	Leaf	1.16
	Fruit	7.50
Acarbose	0.51	

* 50% inhibition of concentration

다. 선발된 추출물의 분획과 활성층 탐색

가시오갈피의 부위별 추출물 중에 활성이 가장 높았던 가시오갈피 잎을 재료로 하고 α -glucosidase 저해 활성실험을 물질분리를 위한 활성실험법으로 하여 시료의 분획과 분획층별 생리활성 검정을 시도하였다. 실험법에 따라 극성이 다른 5개 용매로 추출물을 분획하고 각각의 분획층에 대하여 활성실험을 수행한 결과, ethylacetate 분획층에서 acarbose의 87%에 근접하는 68% 수준의 α -glucosidase저해활성을 보였고, n-BuOH과 chloroform 분획층의 α -glucosidase 저해활성도 각각 58, 52%로 비교적 높았다(그림 3). 활성은 ethylacetate 분획층이 높았으나 회수율이 5.7%로 낮은 편이어서 물질분리시 여러 단계의 분리과정을 반복할 경우 분리에 실패할 가능성이 있었고, 활성이 전혀 없는 물 분획층을 제외한 분획층별 회수율은 n-BuOH층에서 28.8%로 가장 높아서 ethylacetate 분획층과 n-BuOH 분획층 중에서 분리 대상층을 확정하기 어려웠다(표 4).



※ 80% EtOH 추출, 농축, 동결 건조한 시료를 10mg/ml로 희석하여 처리

그림 3. 가시오갈피 잎 추출물의 분획물에 대한 α -glucosidase 저해활성 비교

표 4. 가시오갈피 잎 추출물의 분획종별 회수율 비교

solvent	회수율(%)				
	Hexane	Ethyl-acetate	Chloroform	n-BuOH	H ₂ O
EtOH 80%	11.5	5.7	6.6	28.8	47.4

이후 활성이 가장 높았던 ethylacetate 층을 대상으로 물질분리를 추진하였으나 과제 추진과정에서 타과제와 물질분리 대상이 중복되어 2009년부터는 '북부지역약용작물 표준화 및 명품화 연구'와 연계하여 후속 연구를 계속 추진할 예정이다.

4. 적 요

본 연구는 2005년부터 4년간 농산물이용시험장에서 구축한 식물추출물은행 보유 자원을 대상으로 질염원인균에 대한 항균활성과 항당뇨활성 소재선발을 목적으로 수행되었으며 그 결과는 다음과 같다.

가. *Candida* sp.에 대한 항균활성물질은 4년간 10mm 이상의 활성을 보이는 물질을 총 7종 탐색하였으나 활성도가 높지 않은 정도여서 상품개발이나 물질분리를 시도할 필요가 없는 것으로 판단되었다. 또한 물질분리를 시도하기 위한 실험법도 확립되어 있지 않아서 더 이상 진행하기에 적합하지 않은 것으로 판단되어 in vitro 실험만으로 *Candida* sp.에 대한 항균활성물질 선발을 종료하였다.

- 나. α -Glucosidase 저해 활성으로 측정한 항당뇨활성은 브로콜리와 가시오갈피에서 기대할 만한 활성을 보여서 가시오갈피를 대상으로 물질 분리를 시도하였다. 가시오갈피의 부위별 α -glucosidase 저해 활성은 잎에서 acarbose의 절반정도의 활성을 보였고, 분획층별 활성에서는 ethylacetate 분획층에서 시판약재인 acarbose에 근접하는 수준의 활성을 보였고, n-BuOH 분획층은 비교적 높은 활성과 활성이 높은 층(ethylacetate, chloroform, n-BuOH분획층) 중에서 회수율이 가장 높아서 물질분리 대상 분획층을 판단하기에 어려움이 있었다. 분리대상층을 회수율은 떨어지나 활성이 높고 분리순서가 빨라서 실험진행속도 면에서 유리한 ethylacetate 분획층으로 결정하고 물질분리를 시도하였다.
- 다. 본 과제는 현재 추진중인 타 과제와 중복되어 가능성이 높은 추출물의 선발로 과제를 종결하고 2009년부터는 ‘북부지역 주요약용작물 품질표준화 및 명품화 연구’에서 연계하여 추진할 계획이다.

5. 인용문헌

- 고병섭, 박성규 외. 2004. 오미자 추출물의 혈당강하효과에 관한 연구. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47(2), 258-264.
- 김성문. 2006. 국내 자생 살초활성물질의 탐색. 한국잡초학회지 26(3) : 225-245
- 김정인, 김요정 외. 2006. 마름으로부터 항당뇨 및 항암 기능성 식품 소재 개발, 농림개발 과제 연구보고서, 농림부.
- 박동식, 이용진 외. 2007. 안전식품 공급을 위한 푸드시스템의 새로운 방향천연 생리활성물질 함유 강원도 자생식물. 흥천메디칼 허브자원 산업화 연구소.
- 이철희. 2002. 생물산업발전을 위한 자생식물의 활용방향. pp 22 - 67. In 기능성자생식물을 이용한 고부가가치 상품화 방안. 농촌진흥청 고령지농업시험장.
- 임상현. 2008. 삼지구엽초 유래 methyl-p-hydroxybenzoate의 살초활성기작. 강원대학교 박사학위논문.
- 전영중. 2007. 대두에서 분리한 피니톨의 혈당강하효과, 식품저장과 가공산업. p23~30.
- 정미정, 허성일 외. 2007. (-)-Catechin 및 배당체의 환원력 및 α -glucosidase 저해활성, Kor. J. Pharmacogn 38(4) : 358~362
- 하영래, 박철우 외. 2005. 버섯균사체 액체배양추출물로부터 혈당강하 소재 개발, 농림개발 과제 연구보고서, 농림부.
- Watanabe, J., Kawabata, J., and Kurihara, H. 1997. Isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from Tochu-cha. Biosci. Biotech. Biochim. 61:177-178

6. 연구결과 활용

연도 (연차)	활용구분	제 목
2008	기초자료	항당뇨 활성을 가지는 식물유래 물질분리 ('09 과제 연계)

7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도			
					05	06	07	08
과제책임자	강원도농업기술원 농산물이용시험장	농업연구사	임상현	과제 총괄 수행				○
과제책임자	특화작물시험장	농업연구사	권순배	과제 총괄 수행	○	○	○	
공동연구자	농산물이용시험장	농업연구사	정햇님	가시오갈피 항당뇨활성				○
공동연구자	농산물이용시험장	농업연구사	이광재	생리활성 스크린				○
공동연구자	농산물이용시험장	농업연구사	김희연	활성물질 분리				○
공동연구자	북부농업시험장	농업연구사	허수정	연구협력	○	○	○	
연구보조원	농산물이용시험장	연구원	박유화	시료조제				○
연구보조원	농산물이용시험장	연구원	권영선	생리활성 스크린	○	○		
연구보조원	농산물이용시험장	연구원	이경아	생리활성 스크린	○	○	○	
연구보조원	농산물이용시험장	연구원	배선화	시료조제		○	○	