

## 왕겨추출물의 쥐소장점막 $\alpha$ -glucosidase에 대한 *in vitro*에서의 저해효과

김혜영

한국식품개발연구원 이화학연구부

### *In vitro* Inhibitory Activity on Rat Intestinal Mucosa $\alpha$ -Glucosidase by Rice Hull Extract

Hye-Young Kim

Food Chemistry and Physics Division, Korea Food Research Institute

#### Abstract

In order to search for the way to utilize rice hull as a renewable resource, the inhibition on  $\alpha$ -glucosidase and the fractionation of rice hull extract was investigated. An ethanol extract of rice hull from Japonica-type rice seeds exhibited 30% inhibitory activity on rat intestinal brush border  $\alpha$ -glucosidase (1.4 mU/mL) *in vitro* at the concentration of 0.8 mg/mL using 6 mM p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside as a substrate ( $IC_{50}$  162 mg/mL). Among the fractions obtained by partitioning the ethanol extract successively with solvents, the ethyl acetate fraction at the concentration of 0.8 mg/mL was found to exhibit the most potent inhibitory activity i.e. 65% inhibition of  $\alpha$ -glucosidase ( $IC_{50}$  0.14 mg/mL). Silica gel column chromatography of the ethyl acetate fraction exhibited slightly higher (90%) inhibitory activity, and its subsequent fractionation by Sephadex LH-20 column chromatography did not improve inhibitory activity. Considering the inhibitory activity and yield, the ethyl acetate fraction obtained by the solvent-partitioning process would be a candidate for the hypoglycemic food if it has *in vivo* effectiveness.

Key words: rice hull, ethanol extract,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity

#### 서론

당뇨병으로 인한 대사 이상과 합병증을 예방하기 위하여 고혈당 상태를 교정하여 정상혈당에 가깝게 유지하는 것이 당뇨병 치료에 필수적이다<sup>(1)</sup>. 이상적인 혈당강하제는 식후 혈당(postprandial blood glucose)을 조절하며 저혈당은 일으키지 않도록 하는 것이다. 지속적인 식후 혈당의 조절은 종국에 당화 헤모글로빈 치(glycated hemoglobin)의 감소, 평균혈당의 강하, 공복시 혈당치의 감소를 가져오며 이 결과로 인슐린 저항성도 호전되어 거의 정상인과 같은 생활이 가능해지는 것이다. 그러나 현재 경구용 혈당강하제로 주로 사용되고 있는 인슐린 제제, sulfonylurea 제제, biguanide 제제 등을 투여할 경우 음식을 먹은 후 혈중 당농

도는 빨리 증가하는 반면 투여된 약물로 인한 인슐린의 혈액내 출현은 상대적으로 느리기 때문에(인슐린 제제의 경우는 피하로 주사하므로 일반적으로 흡수가 느림) 식후 고혈당(postprandial hyperglycemia) 그리고 식사와 식사 사이에 고인슐린혈증(hyperinsulinemia) 및 저혈당 증세가 일어난다. 이와 같은 혈당강하제로 인한 저혈당 현상은 피하면서 식후 고혈당을 효과적으로 조절할 수 있는 방법으로 1960년대말에 Puls 등에 의해 음식물 중의 탄수화물 소화를 지연시켜 단당류(주로 포도당)의 소장에서의 흡수를 방해하는 새로운 아이디어가 제시된 바 있다<sup>(2)</sup>. 즉 탄수화물은 소장의  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase에 의하여 포도당, fructose 등으로 분해되어 흡수되는데, 당뇨병 환자는 포도당이 한번에 많은 양 흡수되면 혈중 포도당을 제대로 이용할 수가 없어서 고혈당 상태가 악화된다. 따라서 소장의  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase를 저해함으로써 포도당의 흡수가 천천히 일어나게 하면 당뇨병 환자의 혈당 개선이 이루어질 수 있다<sup>(3)</sup>.

Corresponding author: Hye-Young Kim, Food Chemistry and Physics Division, Korea Food Research Institute, San 46-1 Baekhyun-dong, Bundang-gu, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea

전분의 소화속도를 늦춤으로써 식후 혈당상승을 억제하려는 노력은  $\alpha$ -amylase 저해제부터 연구가 시작되었으나, 대부분의  $\alpha$ -amylase 저해제들은 임상적으로 사용되는데 문제가 있었다. 반면  $\alpha$ -glucosidase 저해제는 전분과 이당류 섭취에 의한 식후 혈당상승을 억제하는데  $\alpha$ -amylase 보다 더 특이적이며 조절하기 쉽다고 하며<sup>(4-10)</sup>, 임상실험 중인 것 혹은 이미 약제로서 시판되는 것도 있다<sup>(4,5,7,8)</sup>. 포유류의 소장 점막에 존재하는 oligosaccharidases는 구조적으로 네 개의 복합체로 구성되어 있다. 즉  $\beta$ -glucosidase complex, sucrase-isomaltase complex, trehalase, glucoamylase complex의 네 개의 복합체이다. 그 중  $\beta$ -glucosidase complex는 lactase와 glycosylceramidase로 구성되어 있으며,  $\beta$ -glucosidic bond를 가수분해한다. 나머지 세 개의 복합체는  $\alpha$ -glucosidic bond를 가수분해한다. 그러나 편의상 소장 점막에 존재하는 모든 oligosaccharidases를  $\alpha$ -glucosidase라고 지칭한다.  $\alpha$ -Glucosidase는 기질 특이적으로는 maltase, sucrase, glucoamylase, isomaltase, lactase 등으로 구성된 복합체로 볼 수도 있다<sup>(11)</sup>. 혈당강화제로 사용되어온 sulfonylureas 계통의 화합물과는 달리,  $\alpha$ -glucosidase 저해제는 인슐린의 분비를 감소시켜서<sup>(2,5,7)</sup> 인슐린 비의존형 당뇨병 환자의 인슐린 분비능을 보존시키는 잇점이 있다. 또  $\alpha$ -glucosidase 저해제는 당뇨병 환자에게 동맥경화증과 고혈압을 유발시키는 고인슐린혈증(hyperinsulinemia)를 일으키지 않는다<sup>(12,13)</sup>.

현재까지  $\alpha$ -glucosidase 저해제에 대한 연구는 주로 당뇨병 치료를 위한 의약품을 개발하기 위해서 진행되었다. 그러나 약물로 개발된 저해제는 혈당상승 억제 효과는 강하지만, 그 지속적인 복용은 설사와 복통 등의 부작용이 문제되고 있다<sup>(6)</sup>. 최근에는 질병을 예방 혹은 치료할 수 있는 기능은 식품이나 식물체도 가지고 있다는 것이 보고되고 있다<sup>(14)</sup>. 본 연구에서는 벼 (*Oriza sativa* L.) 가공 공정의 부산물로서 연간 우리나라에서 약 150만톤이 생산되고 있으나 그 활용도가 미미한 왕겨(rice hull)를 혈당상승 억제 식품소재로 활용할 가능성을 검토하기 위하여, 왕겨추출물의 쥐의 소장점막  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성, 왕겨추출물로부터  $\alpha$ -glucosidase 저해성분의 분획 등에 관하여 연구하였다.

## 재료 및 방법

쥐 소장점막으로부터  $\alpha$ -glucosidase의 분리

대한실험동물센터(음성, 충북)에서 Sprague Dawley rats 수컷 4주령을 구입한 후 일반 고형 사료로 사육하

여 체중이 약 200 g일 때 Rhinehart 등<sup>(6)</sup>의 방법을 변형하여  $\alpha$ -glucosidase를 분리하였다. 즉 쥐를 16시간 절식시켜서 diethyl ether로 마취시킨 후 소장을 전부 절개하여 유리판 위에 놓고 점막을 유리로 긁어 모았다. 모아진 점막에 5배(w/v)의 0.5 M NaCl, 0.5 M KCl, 5 mM EDTA (pH 7.0) 용액을 가하여 Potter-Elvehjem homogenizer (Wheaton Co., U.S.A.)로 5분간 균질화한 후 20,000 g에서 30분간 원심분리하였다. 침전에 다시 EDTA 용액을 가하여 원심분리하는 과정을 3번 반복하여 얻은 침전에 5배의 0.9% NaCl 용액을 가하여 균질화한 후 1,000 g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 효소원으로 하였다. 이 효소원을 -70°C에 보관하면서  $\alpha$ -glucosidase 저해활성의 측정에 사용하였다.

## 분리한 $\alpha$ -glucosidase의 활성 측정

상기의 방법에 의하여 얻어진 쥐 소장점막의  $\alpha$ -glucosidase의 활성 및 기질 특이성을 다음과 같이 확인하였다. 분리된  $\alpha$ -glucosidase를 14mM의 각각의 기질 (maltose, sucrose, isomaltose, lactose, trehalose; Sigma Chemical Co., U.S.A.)과 37°C, pH 6.0에서 60분 동안 반응시킨 후 생성된 포도당은 glucose oxidase/peroxidase를 이용한 assay kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 측정하고 효소활성을 계산하였다<sup>(15)</sup>. 각 효소 활성 1 unit는 실험조건에서 1분동안 기질 1 mole을 분해하는 효소의 양으로 정의하였다. p-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (Sigma Chemical Co., U.S.A.)를 기질로 한  $\alpha$ -glucosidase 활성도 측정하였다<sup>(16)</sup>. 분리된  $\alpha$ -glucosidase의 단백질 함량은 Lowry method<sup>(17)</sup>로 분석하였다.

## $\alpha$ -Glucosidase에 대한 저해활성의 측정

왕겨 추출물 및 분획물의  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성은 p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside를 기질로 하여 측정하였다<sup>(16)</sup>. 즉 1.4 mU/mL  $\alpha$ -glucosidase와 왕겨 추출물 및 분획물을 pH 5, 37°C에서 10분간 preincubation 한 후 6 mM p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside를 가하여 37°C에서 30분간 반응시켜서 100°C에서 3분간 끓인 후 0.4 M Glycine buffer (pH 10.4)를 가한 후 원심 분리 후 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 왕겨 추출물 및 분획물은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 반응액에 첨가하였으며 반응시간 동안의 흡광도의 변화를 DMSO를 첨가한 대조군의 흡광도의 변화와의 비로부터 저해율을 계산하였다. 이 때  $\alpha$ -glucosidase를 먼저 끓는 물에서 3분간 가열한 후 왕겨 추출물 및 분획물과 기질을 가하여 반응시킨 것을 공시험군으로 하

었다. 쥐소장 점막으로부터 분리된  $\alpha$ -glucosidase는 반응시간 30분 후의 흡광도가 1.0 정도가 되도록 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)로 희석하여 사용하였다. 사용한 기질의 농도는 60분간  $\alpha$ -glucosidase와 반응하여 얻어지는 흡광도와 반응시간과의 관계가 일직선을 이루도록 조절하여 사용하였다. DMSO는  $\alpha$ -glucosidase의 활성에 영향을 주지 않는 농도로 반응액에 첨가하였다.

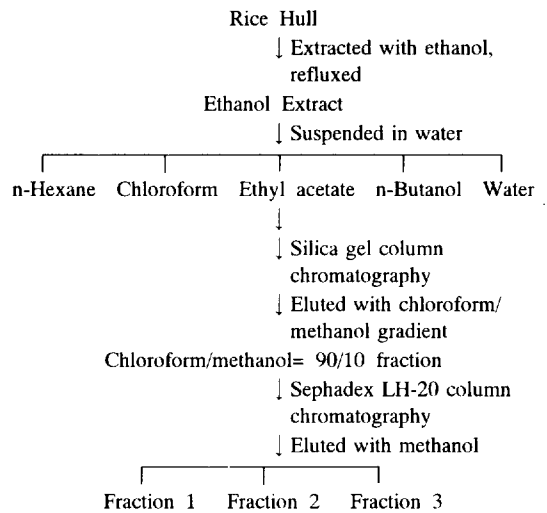
**왕겨의 ethanol 추출**

일반계 벼의 제현(dehulling)에 의하여 발생된 왕겨를 제현한 당일에 경기농산(용인, 경기도)으로부터 얻어서 -4°C 냉장실에 보관하면서 실험에 사용하였다. 일정량의 왕겨를 칭량한 후 round bottomed flask에 넣고 시료의 5배(w/v)의 ethanol을 가하고 환류냉각기를 장치하여 heating mantle로 가열하면서 3시간 동안 2회 추출한 후 여과지(Toyo No.2 & 4)로 여과하였다. 그 여과액을 합하여 진공회전농축기(Buchi RE121 Rotavapor, Switzerland)를 사용하여 감압농축시킨 후 하룻밤 감압 desiccator에서 건조하여 수율을 계산한 후 저해활성을 측정하였다.

**왕겨 ethanol 추출물로부터  $\alpha$ -glucosidase 에 대한 저해성분의 분획**

왕겨 ethanol 추출물 일정량에 20배(w/v)의 증류수를 가하여 현탁시킨 후 분액여두에 넣고 증류수와 동량의 n-hexane을 가하여 진탕하여 방치시켜 분획하였다. n-Hexane (분획시 상층부)을 따로 취한 후 수층에 다시 동량의 n-hexane을 가하여 같은 방법으로 분획하였다. 마지막 n-hexane층을 농축하였을 때 분획물의 양이 거의 없을 때까지 또는 n-hexane 층이 거의 무색일 때까지 분획하였다. Chloroform, ethyl acetate, n-butanol을 각각 순차적으로 가하여 분획하였다. 각각의 분획된 용매를 감압건조하여 활성을 측정하였다.

활성이 확인된 ethyl acetate 분획물 10 g을 methanol 30 mL에 녹여 30 g의 silica gel (70~230 mesh, Merck, Germany)과 함께 섞은 후 methanol을 완전히 휘발시켜 ethyl acetate 분획물이 silica gel에 흡착되게 하였다. 유리 column (5.5 70 cm, PTFE end plate 부착)에 silica gel 600 g을 chloroform으로 습식 충전시킨 후, 앞서 준비한 ethyl acetate 분획물을 silica gel에 흡착시킨 것을 chloroform으로 현탁하여 상층부에 spoid로 충전하였다. 용출은 chloroform/methanol=99/1, 95/5, 90/10, 80/20, 70/30, 50/50, 20/80, 0/100 (v/v)을 각각 2000 mL씩 순차적으로 흘렸다. 용출물을 5



**Fig. 1. Fractionation of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from rice hull extract.**

mL씩 분취하여 TLC plate (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Germany)에 chloroform/methanol=9/1에서 2시간 동안 전개시켜서 spot pattern을 UV lamp로 확인하였으며, 유사한 spot으로 확인되면, 합쳐서 감압농축한 후  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 검정하였다.

Chloroform/methanol gradient를 이용한 silica gel column chromatography로 분획하였을 때 가장 활성이 강한 분획물(chloroform/methanol=90/10 분획물)을 methanol에 현탁시킨 Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) column (3.5 × 45 cm)에 loading 시킨 후 methanol로 용출시키면서 1 mL씩 취하여 TLC plate (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Germany)에 전개시켜서 유사한 pattern은 합하여 감압농축하여 저해활성을 검정하였다. 이상의 왕겨 ethanol 추출물의 분획과정은 Fig. 1에 나타내었다.

**결과 및 고찰**

쥐 소장점막으로부터 분리한  $\alpha$ -glucosidase의 활성 본 연구에서 채택한 방법에 의하여 분리된 효소원은  $\alpha$ -glucosidase가 약 80%를 차지하며, 소장 점막에 존재하는  $\alpha$ -glucosidase 이외의 효소 즉 peptidase와 phosphatase 등도 일부 포함된다<sup>(8)</sup>.  $\alpha$ -Glucosidase는 소장내에서 여러 복합체가 결합된 형태로 존재하므로 각각의 복합체를 분리하는 것보다 모든 복합체를 포함하도록 분리하여 저해활성을 측정하는 것이 생체내의 조건과 유사하다고 판단되어서 쥐 소장점막으로부터

터  $\alpha$ -glucosidase를 구성하는 복합체들을 하나씩 각각 분리하지 않고 모든 복합체들의 활성을 모두 가지도록 분리하였다. 이 효소원은  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 2개월간 활성의 저하가 없었으며, 단백질 함량은  $2.0 \text{ mg/mL}$  homogenate 이었다. 각각의 기질 (maltose, sucrose, isomaltose, lactose, trehalose, p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside)을 사용하여 활성을 측정한 결과, maltase의 비활성도가  $1.5 \text{ U/mg protein}$ 으로 sucrase 0.35, isomaltase 0.4, lactase 0.05, trehalase 0.2,  $\alpha$ -glucosidase  $0.05 \text{ U/mg protein}$ 에 비하여 높았다(Table 1).

$\alpha$ -Glucosidase에 대한 저해활성을 검색함에 있어서 각각의 기질을 사용하여 각각의 효소활성에 대한 저해를 측정할 수도 있으나, 현재까지 알려진 저해제들은 각 효소에 대한 저해정도에는 차이가 있을지라도 특정한 기질을 대상으로 한 효소반응만을 저해하는 것은 아니다<sup>(1)</sup>. p-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside를 기질로 한 효소반응을 저해할 경우 다른 기질에 의한 반응도 저해하는 것이 일반적이기 때문에 본 연구에서는 p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside를 기질로 하여  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성을 측정하였다.  $\alpha$ -Glucosidase의 활성은 pH 6.0에서 최대이지만<sup>(2)</sup>, pH가 높아지면 p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside의 nonenzymatic hydrolysis가 증가하므로, 공시험군 값을 적게 하기 위하여 pH를 5.0으로 낮추었다. pH 5.0,  $37^{\circ}\text{C}$ 에서  $\alpha$ -glucosidase의 60분간의 반응곡선이 직선이 되도록 효소원의 희석비율과 p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside의 농도를 정하였다(data 생략).

왕겨추출물 및 분획물은 비교적 소수성인 물질로서 물에 잘 녹지 않기 때문에 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 저해활성을 측정하였다. 효소 반응계에 DMSO를 첨가하면 효소의 활성이 영향을 받을 수 있기 때문에  $\alpha$ -glucosidase의 활성에 영향을 주지 않는 DMSO의 첨가농도를 측정하였다. 측정결과는 Table 2에서와 같이 1.0~4.0%의 DMSO를 첨가시 효소활성

**Table 1. Enzymatic activities of rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase**

Enzyme	Activity <sup>1)</sup>
Maltase	1.5
Sucrase	0.35
Isomaltase	0.4
Lactase	0.05
Trehalase	0.2
$\alpha$ -Glucosidase	0.05

<sup>1)</sup>One unit is defined as the amount of enzyme that hydrolyze 1 mole of substrate per minute under the experimental conditions.

에 거의 영향을 주지 않았다. 분획물의 반응계에서의 최종 농도를 가능한 한 높이기 위하여 효소활성에 영향을 주지 않는 가장 높은 농도인 4.0%로 실험하였다.

#### $\alpha$ -Glucosidase에 대한 저해활성

왕겨 ethanol 추출물의  $1.4 \text{ mU/mL}$ 의 쥐소장점막  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해효과를  $6 \text{ mM}$  p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside를 기질로 하여 측정하였을 때의 결과는 대표적인  $\alpha$ -glucosidase 저해제인 acarbose와 함께 측정하여 Table 3에 나타내었다. 왕겨 ethanol 추출물은  $0.8 \text{ mg/mL}$ 의 농도에서  $\alpha$ -glucosidase를 30% 저해하였으며 acarbose는 같은 농도에서  $\alpha$ -glucosidase를 76% 저해하였다.  $1.4 \text{ mU/mL}$ 의 쥐소장점막  $\alpha$ -glucosidase를 50% 저해하는 저해제의 농도는 왕겨 ethanol 추출물의 경우는  $162 \text{ mg/mL}$ 이었으며, acarbose는  $0.04 \text{ mg/mL}$ 이었다.

#### 왕겨의 ethanol 추출

현재까지 개발되었거나 알려진  $\alpha$ -glucosidase 저해

**Table 2. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) concentration on  $\alpha$ -glucosidase activity<sup>1)</sup>**

Concentration of DMSO % (v/v)	Volume of DMSO $\mu\text{L}$	$\Delta\text{Abs}_{\text{DMSO}}^{2)}/\Delta\text{Abs}_{\text{buffer}}^{3)}$ ( $\times 100$ )
1.0	5	98.0
2.0	10	101.0
3.0	15	100.0
4.0	20	98.5
5.0	25	93.3
6.0	30	89.5
10.0	50	74.3

<sup>1)</sup>Volume of total reaction mixture was kept constant at  $1.0 \text{ mL}$ .

<sup>2)</sup> $\Delta\text{Abs}_{\text{DMSO}}$  means the difference between absorbance in DMSO-added reaction and that in its blank.

<sup>3)</sup> $\Delta\text{Abs}_{\text{buffer}}$  means the difference between absorbance in buffer-added reaction and that in its blank.

**Table 3. Alpha-glucosidase inhibitory activities of the ethanol extract of rice hull**

Samples	Yield (%) <sup>1)</sup>	Inhibition (%)			$\text{IC}_{50}$ <sup>3)</sup>	
		Concentration (mg/mL) <sup>2)</sup>			mg/mL $\mu\text{M}$	
		0.01	0.1	0.8		
Acarbose <sup>4)</sup>	-	38	58	76	0.040	62
Ethanol extract	2	14	24	30	162	-

<sup>1)</sup>Weight of evaporated ethanol extract from  $100 \text{ g}$  rice hull.

<sup>2)</sup>The final concentration in the reaction mixture.

<sup>3)</sup>The concentration which caused 50% inhibition of rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity were calculated from regression equation.

<sup>4)</sup>Molecular weight of acarbose is 645.

제는 당유도체로서 수용성 화합물이다. 왕겨에 기존의 수용성 저해제들이 함유되어 있을 가능성을 검토하기 위하여, 왕겨를 물로 추출하였을 때 수율이 거의 0%이어서  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 측정할 수 없었다 (data 생략). 그래서 일단 왕겨로부터 가장 수율이 높은 추출물을 얻을 수 있는 용매를 선택하기로 하였다. 일반적으로 추출하여 얻을 수 있는 추출물의 양이 가장 좋은 수율을 나타내는 방법으로서, 시료를 80% 수용성 알콜 용액으로 완전히 percolation 시키는 방법으로 알려져 있다<sup>(20)</sup>. 그러나 시료를 완전히 percolation 시키기 위하여는 많은 시간이 소요되므로 많은 양의 추출물을 얻기 위하여는 추출 시간이 짧은 것이 유리하다. 따라서 본 추출법에서는 heating mantle로 3시간 씩 가열하면서 추출하는 방법을 채택하였다. 일반적으로 식물성분들은 80% methanol 용액에 그 용해도가 가장 높다. 그러나 왕겨는 80% methanol 용액과 80% ethanol 용액으로 추출한 경우를 비교하였을 때 수율에 차이가 없었다. 또 80% ethanol 용액과 100% ethanol 로 추출한 경우를 비교하였을 때도 수율에 차이가 없었다 (data 생략). 이상의 결과를 종합하여 본 실험에서는 ethanol을 사용하여 추출하는 방법을 채택하였다.

**왕겨 ethanol 추출물로부터  $\alpha$ -glucosidase 저해성분의 분획**

왕겨의 ethanol 추출물은  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성이 기존의 알려진 저해제인 acarbose에 비하여는 상당히 낮은 것으로 평가된다 (Table 3). 그러나 crude extract인 경우는 활성성분만 추출되는 것이 아니며 비활성성분도 다량 함유되어 있기에 ethanol 추출물을 분획하여 (Fig. 1) 저해활성을 조사하였다. n-Hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol을 사용하여 순차적으로 분획한 후에  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성을 조사하였을 때 n-hexane 분획물과 chloroform 분획물

은 0.8 mg/mL의 농도에서 각각 3%와 5%의 저해활성을 보였으며, ethyl acetate 분획물은 65%, n-butanol 분획물은 34%, 물 분획물은 28%의 저해활성을 보였다 (Table 4). 다섯 개의 분획물 중에서는 ethyl acetate 분획물이 저해활성이 가장 높았으며, 특히 ethyl acetate 분획물은 ethanol 추출물에 비하여 저해활성이 크게 증가하였다. 즉 6 mM p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside를 사용한  $\alpha$ -glucosidase 반응을 50% 저해하는 농도가 ethanol 추출물은 162 mg/mL인데 비하여 ethyl acetate 분획물은 0.14 mg/mL이었다. 이로부터 왕겨의 ethanol 추출물에는  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성을 나타내지 않는 성분들도 함유되어 있다는 사실과, 이러한 비활성 성분들은 용매 분획에 의하여 제거되어 질 수 있다는 것을 알 수 있다. n-Hexane에는 주로 지방, 납, 엽록소, 정유, sterol 등이 용출되며, chloroform에는 alkaloid, 배당체, 수지, 식물색소 등이 용출되며, ethyl acetate에는 flavonoids, tannin 등의 polyphenols 등이 용출되며, n-butanol에는 수용성 물질들이 일부 이행된다<sup>(21)</sup>. 본 실험의 결과에 의하면 왕겨 ethanol 추출물은 분획에 의하여 n-hexane 분획물과 chloroform 분획물로 양적으로는 대부분(63%) 이행되지만  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성은 거의 없었다. 이것은 적어도 활성 성분이 지방, 납, 정유, sterol 등은 아님을 시사한다. 또 n-butanol 분획물과 물 분획물은  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성이 매우 낮은 것과, 현재까지 알려진  $\alpha$ -glucosidase 저해제인 당유도체가 매우 수용성이 높은 것을 감안하면 왕겨의  $\alpha$ -glucosidase 저해성분은 이와 같은 당유도체는 아닌 것으로 추정된다.

용매에 의한 분획으로  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성이 가장 높은 ethyl acetate 분획물을 더 정제하기 위하여 먼저 stepwise gradient에 의한 silica gel column chromatography를 시행하였다. 그 결과는 Table 5에 나타낸 바와 같이 chloroform/methanol=90/10 분획물

**Table 4. Alpha-glucosidase inhibitory activities of solvent-partitioned fractions of rice hull ethanol-extract**

Fractions	Yield (%)		Inhibition (%)			IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> mg/mL
	From ethanol extract	From rice hull	Concentration (mg/mL) <sup>1)</sup>			
			0.01	0.1	0.8	
n-Hexane	42	0.8	-	-	3	
Chloroform	21	0.4	-	-	5	
Ethyl acetate	31	0.6	27	48	65	0.14
n-Butanol	5	0.09	17	28	34	40.7
Water	1	0.02	16	23	28	2187

<sup>1)</sup>The final concentration in the reaction mixture.

<sup>2)</sup>The concentration which caused 50% inhibition of rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity were calculated from regression equation.

**Table 5. Alpha-glucosidase inhibitory activities of silica gel column-separated fractions of the ethyl acetate fraction**

Fractions <sup>1)</sup>	Yield(%)		Inhibition (%)
	From ethyl acetate fraction	From rice hull	
Chloroform/methanol (v/v)			
99/1	0	0	0
95/5	0	0	0
90/10	70	0.4	90
80/20	10	0.06	39
70/30	5	0.03	5
50/50	3	0.02	4
20/80	2	0.01	0
0/100	10	0.06	0

<sup>1)</sup>The final concentration in the reaction mixture was 0.8 mg/mL.

이 0.8 mg/mL의 농도에서 저해활성이 90%로서 나머지 분획물들에 비하여 저해활성이 높았으며 이 저해 정도는 같은 농도의 ethyl acetate 분획물이 나타낸 65% 보다 증가된 것이다. 저해활성과 더불어 ethyl acetate 분획물로부터의 수율도 70%로서 대부분의 ethyl acetate 분획물이 이행되었다.

Sephadex LH-20 (exclusion limit about 5000)은 시료로부터 고분자 및 고중합 물질의 제거에 특히 유용하다<sup>(22)</sup>. Sephadex LH-20 column chromatography로 fraction 90/10을 fraction 1, 2, 3로 분획하였을 때 0.8 mg/mL의 농도에서 fraction 1은 25%, fraction 2는 88%, fraction 3는 20%의 저해활성을 보였다(Table 6). 이로부터 왕겨의  $\alpha$ -glucosidase 저해성분은 일단 분자량이 5000 이하이며, 분자량 1000~2000 이하의 저분자 물질은 아닌 것으로 추정된다.

이상의 결과로부터 왕겨 ethanol 추출물은 쥐소장 점막  $\alpha$ -glucosidase를 *in vitro*에서 저해하였다. 아울러 왕겨 ethanol 추출물의 정제 과정에 따른  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성을 살펴보면, 먼저 저해성분은 소수성 화합물이며 저분자의 당유도체는 아닌 것으로 추정되며, 정제 과정 중 용매분획에 의하여 저해활성이 크게 증가하며 수율을 고려할 때 ethyl acetate 분획물을 생체내 혈당상승억제 시험에 이용하는 것이 좋으며 나아가 산업적 응용을 고려할 만하다고 판단된다.

본 연구에서는 왕겨의 추출물 및 분획물이  $\alpha$ -glucosidase를 특이적으로 저해하는 것인지 혹은 다른 효소도 저해하는것인지를 알아내려는 실험은 하지 않았다. 왕겨의  $\alpha$ -glucosidase 저해 성분은 극성과 대략적인 분자량을 고려할 때 당유도체보다는 polyphenols일

**Table 6. Alpha-glucosidase inhibitory activities of Sephadex LH-20-separated fractions of the fraction chloroform/methanol=90/10**

Fractions <sup>1)</sup>	Yield (%)		Inhibition (%)
	From fraction 90/10	From rice hull	
1	21	0.06	25
2	63	0.19	88
3	16	0.05	20

<sup>1)</sup>The final concentration in the reaction mixture was 0.8 mg/mL.

가능성이 높은데, 일반적으로 식물의 polyphenols은 단백질과 반응하며, 단백질 중 특정 효소와 특이적으로 반응하느냐 혹은 모든 단백질과 비특이적으로 반응하느냐의 문제는 polyphenols에 따라 다르다. 녹차의 구성 성분중 esterified polyphenols 즉 theaflavin digallate, theaflavin monogallate B, theaflavin monogallate A, (-) epicatechin gallate, (-) epgalocatechin gallate 등이  $\alpha$ -glucosidase를 저해하였다<sup>(23)</sup>. 한편 녹차의 esterified polyphenols은 각각의 polyphenol에 따라 저해 정도가 일치하는 것은 아니지만  $\alpha$ -amylase, trypsin, angiotensin I-converting enzyme 등도 저해하였다<sup>(24)</sup>. 따라서 polyphenols에 의한 효소 저해는 그 효소만을 특이적으로 저해하는 것은 아닐 가능성을 배제할 수는 없다.

현재까지 당뇨병 치료제로서 연구되어진  $\alpha$ -glucosidase 저해제는 저분자의 당유도체이며, 그 구조에 substituted cyclohexene ring과 4,6-di-deoxy-4-amino-D-glucose를 가진다. 이 구조의 secondary amino group이 기질인 이당류의 oxygen bond를 가수분해하는  $\alpha$ -glucosidase의 carboxyl group을 방해함으로써  $\alpha$ -glucosidase를 저해한다<sup>(11)</sup>. 최근에 당유도체 이외의 성분으로서  $\alpha$ -glucosidase 저해제로 알려진 것에는 녹차의 esterified polyphenols<sup>(23)</sup>, tochu-cha (*Eucommia ulmoides*)의 polyphenols 즉 quercetin, catechin-(7,8-b,c)-4 $\alpha$ -(3,4-dihydroxyphenyl)-2(3H)-pyranone, catechin-(7,8-b,c)-4 $\beta$ -(3,4-dihydroxyphenyl)-2(3H)-pyranone, kaempferol-3-O- $\beta$ -glucoside, eucommiol 등이 있다<sup>(25)</sup>. 이러한 polyphenols이 어떠한 기전에 의하여  $\alpha$ -glucosidase를 저해하는지에 대하여는 현재까지 명확하게 밝혀진 바가 없으며, 이에 대한 연구가 있어야 할 것이다.

## 요 약

벼 가공공정의 부산물인 왕겨를 당뇨병 환자의 혈당상승을 억제하는 식품소재로 응용할 가능성을 검토하기 위하여, 왕겨 ethanol 추출물의 쥐 소장 점막의

$\alpha$ -glucosidase에 대한 저해효과와, 저해성분의 정제에 관하여 연구하였다. 왕겨 ethanol 추출물은 0.8 mg/mL의 농도에서 6 mM p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside를 기질로 한 쥐소장 점막 1.4 mU/mL  $\alpha$ -glucosidase에 의한 효소반응을 30% 저해하였다. Ethanol 추출물을 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, 물로 분획하였을 때 ethyl acetate 분획물의  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성은 ethanol 추출물의 경우와 같은 조건에서 65%로서, 다른 네 분획물보다 높았다. Ethanol 추출물이  $\alpha$ -glucosidase 반응을 50% 저해하는 농도(IC<sub>50</sub>)는 162 mg/mL 인데 비하여, ethyl acetate 분획물의 IC<sub>50</sub>은 0.14 mg/mL 이었다. Ethyl acetate 분획물을 silica gel column chromatography에 의하여 분획하였을 때 chloroform:methanol=90:10 분획물의  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해율은 90%이었으며, 이는 ethyl acetate 분획물의 저해율 65%에 비하여 증가한 것이다. Chloroform:methanol=90:10 분획물을 Sephadex LH-20 column chromatography에 의하여 분획하였을 때 중간 정도의 시간에서 용출된 분획물의 저해율은 ethanol 추출물과 같은 조건에서 88%이었다.

### 감사의 글

본 연구는 과학기술처 선도기술개발사업(과제번호: 8-4-28)에 의하여 수행된 내용의 일부로서 이에 감사드립니다. 또한 본 연구의 수행에 도움을 주신 한국식품개발연구원 이 현우 박사님과 류 미라 박사님, 서울대학교 식품공학과 박 관화 교수님과 서 진호 교수님, 서울대학교 응용생물화학부 안 용준 교수님, 두산기술원 서 병철 박사님께 깊은 감사를 드립니다.

### 문 헌

1. Stowig, S. and Raskin, P.: Glycemic control and diabetic complications. *Diabetes Care*, **15**, 1126 (1992)
2. Puls, W. and Keup, U.: Influence of an  $\alpha$ -amylase inhibitor (Bay d7791) on blood glucose, serum insulin and NEFF in starch loading tests in rats, dogs and man. *Diabetologia*, **9**, 97 (1973)
3. Puls, H.P., Krause, L., Muller, H., Schutt, R. and Thomas, G.: Inhibitors of the rate of carbohydrate and lipid absorption by the intestine. *Int. J. Obesity*, **8** (Suppl 1), 181 (1984)
4. Krause, H.P., Keup, U. and Puls, W.: Inhibition of disaccharide digestion in rat intestine by the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose (Bay g 5421). *Digestion*, **23**, 232 (1982)
5. Cauderay, M., Tappy, L., Temier, E., Jequier, E., Hillebrand, I. and Felber, J.P.: Effect of alpha-glycosidase inhibitors (Bay m1099 and Bay o1248) on

- sucrose metabolism in normal men. *Metabolism*, **35**, 472 (1985)
6. Rhinehart, B.L., Robinson, K.M., Liu, P.S., Payne, A.J., Wheatley, M.E. and Wagner, S.R.: Inhibition of intestinal disaccharidases and suppression of blood glucose by a new  $\alpha$ -glucohydrolase inhibitor-MDL 25,637. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **241**, 915 (1987)
7. Rhinehart, B.L., Robinson, K.M., Payne, A.J., Wheatley, M.E., Fisher, J.L., Liu, P.S. and Cheng, W.: Castanospermine blocks the hyperglycemic responses to carbohydrates *in vivo*: a result of intestinal disaccharidase inhibition. *Life Sci.*, **41**, 2325 (1987)
8. Fujioka, S., Tobatake, T., Kawamoto, T., Tokunaga, K., Matsuzawa, Y. and Tarui, S.: Effect of AO-128, a new  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, on carbohydrate metabolism in obese subjects(abstract). *Int. J. Obes.*, **11** (Suppl 2), 98 (1987)
9. Yoshikuni, Y.: Inhibition of intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia by moranoline and its N-alkyl derivatives. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 121 (1988)
10. Robinson, K.M., Rhinehart, B.L., Begovic, M.E., King, C.R. and Liu, P.S.: Castanospermine-glucosides are potent, selective, long-lasting sucrase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **251**, 224 (1989)
11. William-Olsson, T.:  $\alpha$ -Glucosidase inhibition in obesity. *Acta Med. Scand. Suppl.* **706**, 5 (1985)
12. Steiner, G.: Diabetes and atherosclerosis metabolic links. *Drugs*, **36**, 22 (1988)
13. Buhler, F. R., Julius, S. and Reaven, G. M.: A new dimension in hypertension: role of insulin resistance. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **15** (Suppl 5), S1 (1990)
14. Robert, I.L.: Phytochemicals and antioxidants. In *Functional Foods*, Goldberg, I. (Ed.) Chapman & Hall, New York, p.393 (1994)
15. Dahlqvist, A.: Disaccharidases. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergman, H.U. (Ed.) Vol.4, p.916 (1974)
16. Pan, Y.T., Ghidon, J. and Elbein, A.D.: The effects of castanospermine and swainsonine on the activity and synthesis of intestinal sucrase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **303**(1), 134 (1993)
17. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J. and Farr, A.L.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
18. Holmes, R. and Lobley, R.W.: Intestinal brush border revisited. *Gut* **30**, 1667 (1989)
19. Heiker, F.R., Boshagen, H., Junge, B., Muller, L. and Stoltefuss, J.: Studies designed localize the essential structural unit of glycoside-hydrolase inhibitors of the a-carbose type. In *First International Symposium on A-carbose*, Creutzfeldt, W. (Ed.), Excerpta Medica, Amsterdam, p.137 (1982)
20. Vanden Berghe, D.A., Vlietinck, A.J. and Van Hoof, L.: Plant products as potential antiviral agents. *Bull. Inst. Pasteur.*, **84**, 101 (1984)
21. Suffness, M., Newman, D.J. and Snader, K.: Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Biorganic. Marine Chem.*, **3**, 131 (1989)
22. Colgate, S.M. and Molyneux, R.J.: *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination.*

CRC Press, Boca Raton p.35 (1993)

23. Honda, M. and Hara, Y.: Inhibition of rat small intestinal sucrase and  $\alpha$ -glucosidase activities by tea polyphenols. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**(1), 123 (1993)
24. Hara, Y. and Honda, M.: The inhibition of  $\alpha$ -amylase by tea polyphenols. *Agric. Biol. Chem.* **54**(8), 1939 (1990)
25. Watanabe, J., Kawabata, J., Kurihara, H. and Niki, R.: Isolation and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from tochu-cha. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**(1), 177 (1997)

---

(1997년 3월 11일 접수)