

## 누룩치(*Pleurospermum kamschaticum* Hoff.)의 특산채소화를 위한 연구

### 3. 누룩치의 *in vitro* 생리활성검색

김종화\*·홍정기\*\*·방순배\*\*·한종수\*\*·최용순\*

#### Studies on the Cultivation of *Pleurospermum kamschaticum* Hoff. as a Special Vegetable Indigenous to High Land Area

#### 3. *In vitro* Screening of Biological Activities of *Pleurospermum kamschaticum*

Jong-Hwa Kim\*, Cheong-Ki Hong\*\*, Soon-Bae Bang\*\*,  
Jong-Su Han\*\* and Yong-Soon Choi\*

**ABSTRACT** : The bioactive effects of *Pleurospermum kamschaticum* Hoff. extract were *in vitro* evaluated on the digestive promotion, antioxidant activity, antimutagenicity and anticholesterogenic function. The extract enhanced the digestion rate of starch and casein, whereas it inhibited the production of TBA-reactive substances in liver homogenate. In Ames test using *S. typhimurium* TA98 and TA100, the ethylacetate fraction reduced the mutagenicity of benzo(a)pyrene with IC50 of 1.0mg/plate. At the level of 50/assay, the ethylacetate fraction decreased HMG-CoA reductase activity to 15%. The results show value and usefulness of *Pleurospermum* as a special plant having bioactive substances.

**Key words** : *Pleurospermum kamschaticum* Hoff., Wild vegetable, Digestion, Antimutagenicity, Antioxidants, HMG-CoA reductase inhibitor, *in vitro*.

### 摘 要

누룩치(*Pleurospermum kamschaticum* Hoff.)는 설악산을 중심으로 고산지대에 자생하고 있는 산형과의 야생식물로, 꿩우산풀 또는 누리대로도 불리운다(Yahoi etc., 1977). 강원도 산간지역 주민들이 최고로 꼽는 산채종의 하나로, 일반적으로 연한 줄기는 무침용으로 이용되며 시장에서는 매우 고가로 판매되기도 한다. 그러나 군락

지가 적고 자연채취자의 증가로 자생지에서 그 수는 급격히 감소하고 있다(金等, 1996).

누룩치는 소화촉진효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 일부 주민은 항암과 강장효과가 있다고하여 매우 선호하고 있다. 중국에서는(中藥大辭典, 1985) 누룩치와는 동종은 아니지만 같은 속에 속하는 '葎茴香'(*Pleurospermum giraldii* Diels.)이라는 식물이 胃寒腹痛, 腹脹(腫脹), 食慾不振, 白帶를 치료하는 것으로 알려져 있으며, 일본의 세계유용식물사전에 보면(櫻

\* 江原大學校 農畜生命科學大學(College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)  
\*\* 江原道農村振興院 平昌山菜試驗場(Pyungchang Wild Vegetable Experiment Station, Kangwon PRDA, Pyung chang 232-920, Korea)

田滿, 1989) 葯茴香의 全草를 消化不良이나 食慾不振에 사용하는 것으로 알려져 있다. 이와같은 자료를 종합해보면 이 속에 속하는 식물이 소화물 촉진하는 효능이 공통적으로 존재한다는 것을 알 수 있으나 이를 뒷받침해줄 수 있는 과학적자료는 찾아보기 어렵다(최, 1991; 中藥大辭典, 1985).

최근, 신기능의 생리활성물질의 개발은 국가의 첨단과제로 여러 가지 소재로부터 활발한 연구가 진행되어 오고 있으며(생리활성천연물검색법, 1990; 金等, 1996), 이러한 측면에서 주목치는 생리활성물질 창출의 주요한 자원의 하나가 될것으로 기대되나, 이에 대한 연구는 전무한 실정이다.

저자등(金等, 1996)은 이러한 주목치를 인공재배하기 위한 생태적특성과 재배환경, 미성숙배의 성숙과 기내 체세포배 발생에 대한 기초적연구를 수행한 바 있다. 그러나, 주목치의 생리활성특성에 대해서는 아직까지 보고된바 없으며, 中藥大辭典(1985) 소화촉진효과가 있는 것으로 알려진 은 소화촉진효과를 확인하고 몇가지 생리활성기능에 대하여 *in vitro*로 검토하여 지견을 얻었다. 이러한 연구결과는 주목치의 인공재배에 의한 생산증대와 더불어 주목치의 생리적 효과를 밝힘으로서 고냉지관광농업지역의 특산채소로 가치를 더욱 높일 것이다.

## 材料 및 方法

본 연구에서 시료로 사용한 주목치는 강원도 화천군 화학산일대에서 6-7월중 채취한 것으로 일부는 동결건조시켰으며, 일부는 그대로 냉동저장하여 사용하였다. 실험에는 잎과 줄기를 포함한 지상부만을 사용하였다. 항들연변이원실험과 hydroxy-3-methylglutaryl(HMG)-CoA reductase활성에 미치는 효과를 검토하기 위하여 건조한 주목치의 에틸아세테이트분획물을 이용하였으며, 소화기능실험에서는 채취한 후 마쇄하여, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 사용하였다. 에틸아세테이트분획물은 먼저 주목치를 메탄올로 추출하여 클로로포름으로 염색소를 추출제거한 후 에틸아세테이트를 이용하여 추출하여 감압건조하였으며, 추출효율은 0.62%였다.

HMG-CoA, cholestyramine, NADPH, pancreatin, trypsin, dinitrosalicylic acid, thiobarbituric acid는 모두 Sigma Co(USA)의 생화학용을 사용하였으며, 기타시약은 특급을 사용하였다.

### 1. 전분소화력측정

전분소화력측정은 Frels 등의 방법에 따라 행하였다. 즉, pancreatic amylase (3units)의 효소원으로 하여 추출물(10분간 가열처리 또는 비가열)을 일정량 넣은 완충용액(sodium phosphate buffer 0.02M containing 0.05M NaCl, pH 6.9)을 30분간 37℃에서 incubation 시킨후, 기질용액(2% starch solution)을 넣어 총용량을 1.0ml로 하여 반응시켰다. 5분후 1ml의 dinitrosalicylic acid를 넣어 혼합하여 100℃에서 10분간 가열한 후, 일정량의 증류수를 넣어 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Maltose를 이용하여 동일한 실험조건하에서 표준곡선을 구하여 전분분해력을 측정하였다. 추출물을 넣지 않았을때의 소화효소를 100%로 하여 소화력을 표시하였다. 동일한 조건으로 효소원 대신 완충용액을 넣어 추출물의 색소에 의한 측정흡광도의 간섭을 보상하였다. 또한 10분간 가열한 추출물에 대하여 동일한 실험을 행하였다.

### 2. 단백질분해력측정

단백질분해능력은 인공기질인 BANA (benzoyl-DL-arginine-p-nitroaniline) 또는 casein을 기질로 하여 측정하였다. 먼저 casein 분해능력은 pancreatin을 효소원으로 하여 측정하였다. casein용액(0.25%, 0.1M acetate buffer, pH 7.5)에 추출액을 일정량 넣은 후 30℃에서 10분간 incubation 하였다. 다음 효소액을 넣어 총량 7.5ml로 한후 10분간 반응시킨 후 trichloroacetic acid 5ml를 넣어 20분간 정치하여 원심분리한 후, 상등액 2ml를 취하여 Lowry법에 따라 단백질을 측정하였다. 표준용액으로는 별도로 tyrosine을 이용하였으며, 추출물을 넣지 않았을때의 단백질분해력을 100%로 하여 나타내었다.

인공기질시험에서는 DL-BANA를 기질로 사용하였으며, 효소원으로는 trypsin (100µg/ml 0.001M HCl)을 이용하였다. 기질용액(BANA 43.5mg/ 0.05M Tris buffer containing 0.02M CaCl<sub>2</sub>, pH 8.2) 5ml에 누

독치추출액을 넣어 6ml로 하여 25℃ 에서 5분간 preincubation한 후, 효소액 0.1ml를 넣어 10분간 incubation하였다. 1ml의 acetic acid를 넣어 410nm에서 흡광도를 측정하여, p-nitroaniline의 비흡광도를 이용하여 단백질분해력을 측정하였다.

### 3. 항산화능력측정

Bruge와 Aust (1978)의 방법에 따라 행하였다. 8주령의 흰쥐로부터 얻어진 간장의 homogenate (0.9% saline)액 0.8ml를 취한후 누룩추출액을 일정량 첨가하여 1시간 37℃에서 incubation하였다. 이 액에 TBA 용액 2.0ml를 넣은후 25분간 가열하였다. 3,000rpm에서 15분간 원심분리 후 535nm에서 상등액의 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로는 1,1,3,3,-tetra hydroxypropane을 사용하였다.

### 4. 항돌연변이원성실험

Ames test를 개량한 preincubation법 (한 등, 1993)을 이용하였으며, Salmonella typhimurium TA98과 TA 100균주를 사용하였다. 변이원물질로는 benzo(a) pyrene을 사용하였으며, 항돌연변이원성실험을 위하여 에틸아세테이트추출물, 변이원물질 및 배양균을 접종하여 48시간 배양하여 revertant 숫자를 계속하였다. 항돌연변이원성은 변이원물질의 활성에 대한 사용한 시료농도별 억제율로 나타내었다.

### 5. 콜레스테롤합성저해활성측정

Cholestyramine을 2주간 투여한 흰쥐로부터 얻어진 간장 microsome을 HMG-CoA reductase의 효소원으로 하여 *in vitro*에서 NADPH의 소모량을 측정하였으며, 반응액에 누룩추출물을 첨가하였다 (최 등, 1994).

## 結果 및 考察

### 1. 소화증진능력

Fig. 1은 반응액에 누룩추출물 (가열 또는 비가열)을 반응액에 1-4% 수준으로 첨가시 amylase의 효소활성을 나타낸 것이다. 비가열한 누룩추출물은 1% 첨가시 효소활성은 크게 변화하지 않았으나, 첨가량이 증가함에 비례하여 124%까지 활성화 되었다.

한편, 가열한 추출물은 1% 첨가시 효소활성은 유의하게 증가하여 160%까지 상승하였으며, 4% 수준까지 비슷한 수준을 나타내었으며, 첨가량증가에 따른 효소활성의 상승은 보이지 않았다.

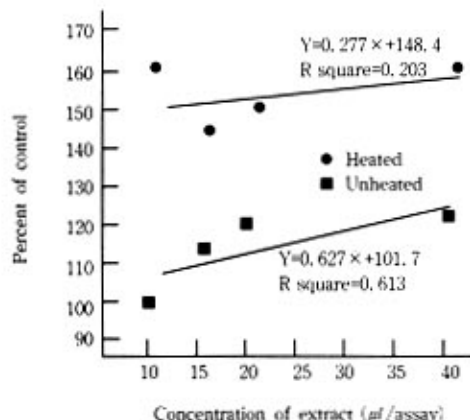


Fig. 1. Effects of *Pleurosperrum* extract on digestibility of starch by  $\alpha$ -amylase *in vitro*.

Fig. 2는 기질로서 casein을 사용했을때의 효소활성을 나타내고 있다. 반응액에 추출물을 2.7-8%까지 첨가시 효소활성은 138-190%까지 첨가량에 비례하여 단백질소화능력에 향상을 나타내고 있으며, 이러한 능력은 전분분해능력 보다 현저하였다. 그러나 기질로서 화학물질인 BANA를 효소원으로 사용시 trypsin 사용하여, 추출액농도를 반응액의 1.6-12.9% 수준으로 첨가하였을때, 효소활성은 Fig. 3에서 보는 바와 같이

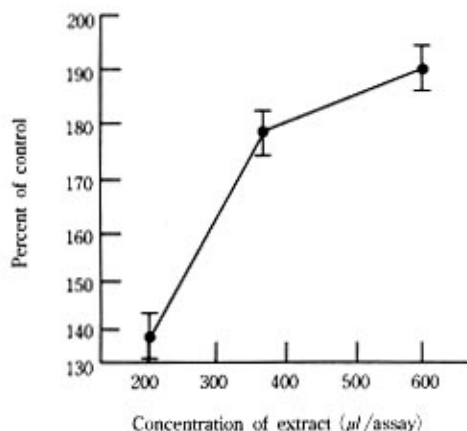


Fig. 2. Effect of *Pleurosperrum* extract on digestibility of casein by pancreatin.

오려 감소시키는 결과를 보였으며, 이때 가열한 추출물은 비가열추출물에 비하여 BANA분해능력을 더욱 저해시키고 있다. 이러한 결과는 단백질소화능력을 *in vitro*에서 검색시, 기질선택이 매우 중요한 인자임을 시사하는 것이며, 이는 아마도 추출물성분과 기질과의 상호작용이 효소반응에 영향을 주는 것으로 생각되어진다.

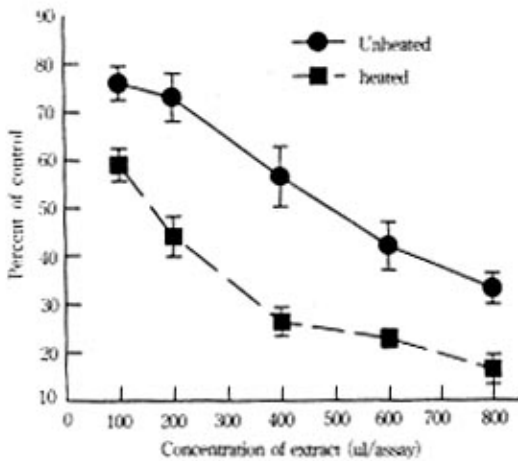


Fig. 3. Effect of *Pleurospermum* extract on hydrolysis of BANA by trypsin.

일반적으로, 소화제로 상품화되어 있는 방향성고미건위제는 소화관을 자극하여 운동을 촉진시키며, 위내의 체류 gas 를 분무부의 이완작용으로 배출시켜 위의 압박감을 경감시키는 물리적 효과와 구강 및 위점막의 자극에 의한 반사, 구토중추의 흥분 및 정신작용에 의한 조건반사에 따라 수액 및 소화액의 분비항진을 일으켜 소화작용을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(약물학, 1995). 본 실험에서 사용한 누룩지는 강한 자극을 갖고 있으므로, 누룩지의 섭취는 위의 자극뿐 아니라 효소활성을 항진시켜 소화촉진을 항진시킬 것이다. 특히, 전분의 분해활성화는 누룩지의 가열에 의해 증가하는 결과를 보여, 누룩지의 가공에 의해 그 효과는 배가될 것으로 예측되나, 이에 대한 *in vivo* 연구는 더욱 진행되어야 할 것이다.

2. 항산화 및 항돌연변이원효과

Fig. 4는 누룩지 또는 시금치추출물을 총반응용액

의 0.3-1.3% 수준으로 첨가시 흰쥐의 간장 homogenate에서의 TBA반응물질의 생성량을 나타낸 것이다. 보는 바와 같이 누룩지추출물은 추출물을 0.3% 첨가하였을 때, 44% 정도의 항산화효과를 나타내며, 1.5%첨가시 산화억제효과는 53% 로 높은 활성을 나타내었다. 한편, 동일한 농도의 시금치추출액을 반응액에 첨가하였을 때, 누룩지에 비하여 낮은 2-27%의 항산화활성을 보이고 있어, 누룩지의 항산화효과는 누룩지의 고유한 성분에 의해 발현되고 있음을 예측할 수 있었다. 한편, 가열한 추출액은 동일첨가농도에서 높은 산화억제효과를 나타내었다 (40-86%). 높은 농도의 시금치추출액을 첨가시 낮은 항산화효과를 나타내는 결과로부터, 엽록소의 가능성을 배제하기 위하여, 추출물을 클로로포름으로 추출하여 엽록소를 제거한 뒤 얻어진 에틸아세테이트분획물을 0.5-2.0mg/assay 첨가시 항산화억제효과는 40-60% 수준을 나타내었으며 첨가량에 비례하여 TBA생성물질은 억제하여, 엽록소 이외의 성분이 항산화효과를 발휘하고 있음을 확인하였다.

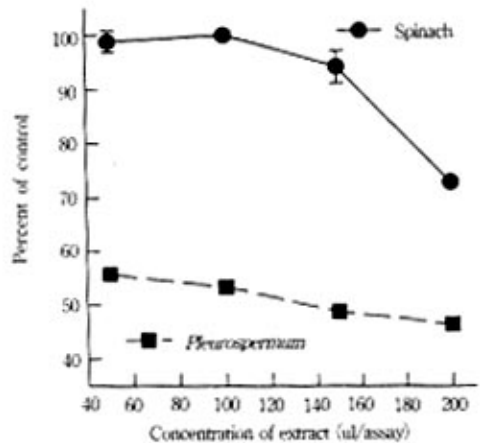


Fig. 4. Antioxidant activity of *Pleurospermum* and Spinach extracts in liver homogenates.

누룩지의 항돌연변이원효과를 검토하기 위하여, Ames test를 행하였다. 본 실험에서는 누룩지추출물을 사용하지 않고 에틸아세테이트분획물을 실험의 재료로 하였다. 예비실험으로 에틸아세테이트분획물을 plate당 5.0mg 의 농도에서 cytotoxic 효과는 유의하지

않아, plate당 5.0mg까지 분획물을 첨가하며 실험을 행하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이, benzo(a) pyrene을 돌연변이원으로 사용하였을 때 *S. typhimurium* TA98, TA100균주에서 현저한 항돌연변이활성을 나타내었다. IC50은 약 1.0mg 으로 나타내었으며, 농도에 의존하여 효과를 발휘하였다. 그러나 1.65 mg 이상 첨가시 부가적인 항돌연변이효과는 관찰되지 않았다. 따라서 누룩치 추출물은 항산화활성과 함께 항돌연변이원활성을 나타내 항암효과가 있는 성분이 함유되어 있을 것으로 생각된다. 누룩치의 잎에는 peucedanin을 포함한 여러 가지 coumarin 화합물이 함유되고 있는 것으로 알려지고 있으며, 이 성분은 항암제로서 이용되고 있다는 보고(최, 1991)는 본 실험결과를 분명히 지지하는 결과로 생각된다.

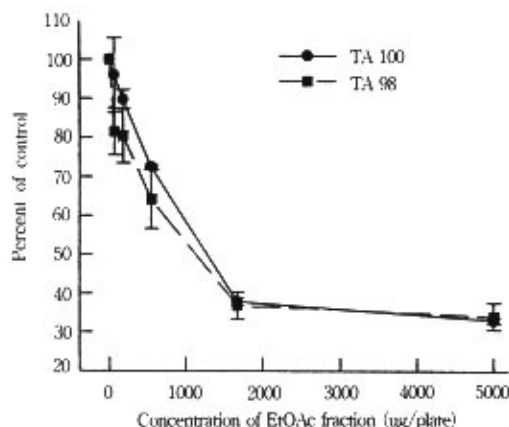


Fig. 5. Antimutagenicity of EtOAc fraction of *Pleurospermum* in *S. typhimurium* TA 98 and TA 100.

체내에서의 과산화물의 증가는 노화, 암, 당뇨병성인병 발생의 주요한 원인 물질로 알려져 왔다 (Free, 1994; Yahagi etc., 1997). 누룩치 추출물은 결과에서 보는 바와 같이 *in vitro*에서 현저한 산화억제 및 항돌연변이원활성을 나타내어 항산화제 나아가 암 예방이나 치료에도 그 효과를 기대하여 볼 수 있을 것이다. 특히, 육류는 가열처리를 통해 조리되고 있는 점을 감안할 때, 육류와 병행하여 누룩치를 섭취시 소화를 촉진함은 물론, 과산화물질의 scavenger로서 역할을 기대할 수 있을 뿐 아니라, 탄화된 고기의 돌연변이원성을 억제할 수 있는 기능성식품으로 개발할

수 있는 유용한 자원식물로 생각된다(최, 1994). 그러나, 실제로 *in vivo*에서 어떠한 효과를 발휘할 수 있는지는 더 많은 연구가 요구되어진다.

### 3. HMG-CoA reductase 효소활성저해효과

HMG-CoA reductase는 생체내에서 콜레스테롤 합성을 조절하는 율속효소로 고콜레스테롤혈증치료를 위한 목적으로 이 효소의 활성저해제가 개발되고 있다(Endo, 1988). 본 실험의 system에서 추출물 그대로의 반응액첨가는 흡광도의 간섭으로 행할 수 없었으며, 에틸아세테이트 추출물경우도 50ug/assay 이상에서는 측정할 수 없었다. 본 실험에서 추출물을 첨가하지 않았을 때 NADPH 생성율은 1,390 pmol/min/100ul microsomal protein이었으며, 반응액 1ml에 추출물 50ug 첨가시 1,179 pmol/min/100ul microsomal protein로 15%의 억제효과를 나타내어 약한 저해도를 나타내었다.

Table 1. *In vitro* inhibitory effect of EtOAc fraction of *Pleurospermum* on the HMG-CoA reductase activity *in vitro*.

Sample	Specific activity	Percent of Control
Control	1,390	100.0
EtOAc (50ug)	1,190	85.6

Specific activity was expressed as pmol NADPH oxidized/min/100 ul microsomal protein.

이러한 결과로부터 누룩치 추출물은 콜레스테롤합성계의 율속효소인 HMG-CoA reductase를 저하시킴으로서, 고콜레스테롤혈증예방에도 효과가 있을 것으로 예상되나, *in vivo*에서의 실험연구가 뒷받침되어야 할것으로 사료된다(최와 이, 1992; 이 등, 1991).

### 감사의말씀

항돌연변이원성실험을 캐히 도와주신 한림대학교 한림과학원 이병훈교수님께 감사드립니다.

### 摘 要

누룩치의 소화기능성, 항산화활성, 콜레스테롤합성저해도및 항돌연변이원활성에 대하여 *in vitro*로 검

토하였다. 누룩치 추출물은  $\alpha$ -amylase의 전분분해능력을 4% 첨가시 124% 상승시켰으며, 가열처리에 의해 그 활성은 증가되었다. Casein의 분해능력은 추출물을 8% 첨가시 189%까지 상승하였다. 항산화억제도는 5% 추출물 첨가시 40%정도의 억제효과를 나타내었으나, 시금치추출물은 2%의 효과를 나타내었다. Ames test에서 plate 당 1.6mg의 에틸아세테이트 분획물의 첨가는 50%의 항돌연변이활성을 나타내었다. *In vitro*에서 HMG-CoA reductase의 활성저해는 15%를 나타내었다. 이러한 결과는 누룩치의 높은 항산화활성 및 항돌연변이효과를 나타낸 것으로 이를 목적으로한 유용한 자원임을 시사한다.

引用 文 獻

Briggs J. A. and S. D. Aust. 1978. *Methods in Enzymol.* 52 : 302-310.  
 최홍식. 1994. 지방질의 과산화와 영양. *한국영양식량학회지* 23 : 867-878.  
 최육자. 1991. 약초의 성분과 이용, 일월서각, p. 449  
 최용순, 이상영. 1992. 혈청콜레스테롤농도와 HMG-CoA reductase. *한국영양식량학회지* 21 : 580-593.  
 최용순, 김천호, 함승시, 이상영. 1994. 편취에 있어서의 메일체소의 투여가 지질대사에 미치는 효과. *한국영양식량학회지* 23 : 212-218.  
 Endo A. 1988. *Chemistry, biochemistry and pharmacology of HMG-CoA reductase inhibitors.* *Klin Wochenschr* 66 : 421-427.  
 Eranger B. F., N. Kokowsky and W. Cohen. 1961. The pre-

paration and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95 : 271-278.  
 Frei B. 1994. *Natural antioxidants in human health and disease.* Academic Press, San Diego. p. 1.  
 Frels J. M. and J. H. Rupnow. 1984. Purification and partial characterization of two  $\alpha$ -amylase inhibitors from black bean. *J. Food Biochem.* 8 : 281-301.  
 한국생화학회. 1990. 생리활성천연물검색법. 한국생화학회.  
 한국약학대학 약물학분과회. 1995. 약물학. 문성사. p. 489-494.  
 한규석, 정의호, 함승시. 1993. 2-AF에 의해 유발된 미생물 변이 원성에 미치는 들미나리즙의 돌연변이억제작용. *한국위생학회지* 8 : 225-230.  
 原田正敏. 1989. 醫藥品の開發. 廣川書店. p. 3-14.  
 堀田 滿. 1989. 世界有用植物事典, 平凡社(日本), p. 627.  
 金鐘和, 洪正基, 洪大基, 方順培, 柳基德. 1996. 누룩치의 특산재 소화를 위한 연구 1. 재배화를 위한 生態的 特性과 栽培環境. *農業論文集(96農業產學協同)* 38 : 31-41.  
 金鐘和, 洪正基, 洪大基, 方順培, 韓鍾洙. 1996. 누룩치의 특산재 소화論文集(96農業產學協同) 38 : 43-49.  
 국립보건원. 1990. 소화효국립보건원. p. 21-22.  
 李昌編. 1979. 大韓植物圖鑑. 향문사, p. 583.  
 이윤형, 신용목, 이재은, 최용순, 이상영. 199추출물로부터 HMG-CoA reductase의 활성 저해제 탐색. *한국생물공학학회지* 6 : 55-61.  
 Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.  
 上海科學技術出版社 1985 中藥大辭典 第4卷 日語翻譯版(小學館). p. 2548.  
 Yahagi T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada. 1977. Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. *mutation Res.* 48 : 121-130.