

잡곡당화음료 제조 최적 조건 탐색 및 항당뇨 활성 평가*

이재성¹ · 강운환² · 김경곤¹ · 윤연경¹ · 임준구² · 김태우² · 김대중² · 원상연³ · 배무환³ · 최한석⁴ · 최 먼^{1,2†}

강원대학교 생명건강공학과,¹ 강원대학교 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터,² (주)엔에스쇼핑,³ 농촌진흥청 국립농업과학원 발효식품과⁴

Exploration of optimum conditions for production of saccharogenic mixed grain beverages and assessment of anti-diabetic activity*

Lee, Jae Sung¹ · Kang, Yun Hwan² · Kim, Kyoung Kon¹ · Yun, Yeong Kyeong¹ · Lim, Jun Gu²
Kim, Tae Woo² · Kim, Dae Jung² · Won, Sang Yeon³ · Bae, Moo Hoan³ · Choi, Han Seok⁴ · Choe, Myeon^{1,2†}

¹Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

²Well-Being Bioproducts RIC, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

³NS Mall, Seongnam-si 463-400, Korea

⁴Fermented Food Science Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853, Korea

ABSTRACT

Purpose: This study was conducted to establish the production conditions through optimization of the production process of beverages using *Aspergillus oryzae* CF1001, and to analyze volatile compounds and antidiabetic activity. **Methods:** The optimum condition was selected using the response surface methodology (RSM), through a regression analysis with the following independent variables gelatinization temperature (GT, X₁), saccharogenic time (ST, X₂), and dependent variable: ΔE value (y). The condition with the lowest ΔE value occurred with combined 45 min ST and 50°C GT. The volatile compounds were analyzed quantitatively by GC-MS. **Results:** Assessment of antidiabetic activity of saccharogenic mixed grain beverage (SMGB) was determined by measurement of α-glucosidase inhibition activity, and glucose uptake activity and glucose metabolic protein expression by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot analysis. Results of volatile compounds analysis, 62 kinds of volatile compounds were detected in SMGB. Palmitic acid (9.534% ratio), benzaldehyde (8.948% ratio), benzyl ethyl ether (8.792% ratio), ethyl alcohol (8.35% ratio), and 2-amyl furan (4.826% ratio) were abundant in SMGB. We confirmed that α-glucosidase inhibition activity, glucose uptake activity, and glucose-metabolic proteins were upregulated by SMGB treatment with concentration dependent manner. **Conclusion:** Saccharogenic mixed grain beverage (SMGB) showed potential antidiabetic activity. Further studies will be needed in order to improve the taste and functionality of SMGB.

KEY WORDS: response surface methodology, volatile compounds, saccharogenic mixed grain beverage, α-glucosidase, anti-diabetic activity.

서론

경제성장과 더불어 삶의 질적 향상은 건강 및 웰빙에 대한 관심을 높이고 있다. 현재 건강 기능성 생활필수품, 식품, 화

장품 등의 다양한 제품들이 개발되고 있으며, 기존의 건강에 도움을 주던 의약품을 비롯한 의료제품들을 대체하고 있다.¹ 많은 생리활성 유효성분이 식물류에 함유되어 있다고 밝혀지고 있으며, 다양한 연구를 통해 인체에 대한 안전성과 효능이 확인되고 기능성 제품으로 개발되고 있다.^{2,3} 또한 천연추출

Received: Dec 2, 2013 / Revised: Jan 6, 2014 / Accepted: Jan 16, 2014

*This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ009129)" Rural Development Administration, Republic of Korea, Institute of Bioscience Biotechnology (Project No. 320130015) and Well-being Bioproducts Regional innovation Center project (B0009702).

†To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-33-250-8645, e-mail: mchoe@kangwon.ac.kr

© 2014 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

물로부터 유효물질을 분리하고, 이용도를 높이기 위한 공정의 개발과 함께 음료, 캡슐화, 정제 등의 건강기능성 식품으로의 개발도 증가하고 있다.⁴⁻⁷

당뇨는 췌장의 β 세포 감소에 의한 인슐린 분비저하로 나타나는 제 1형 당뇨병과 인슐린 분비저하와 인슐린 저항성에 의한 제 2형 당뇨병으로 구분 된다.⁸ 당뇨병은 다양한 만성 합병증을 유도하는 것으로 알려져 있다.⁹ 현재 당뇨를 근원적으로 치료할 수 있는 방법이 개발되어 있지 않은 실정이며, 운동 및 식사요법과 함께 약물 요법이 활용되고 있다.¹⁰ 약물 요법으로 인슐린제제, 경구용 혈당강하제 등이 활용되고 있으나 저혈당 유발, 인슐린 분비기능 상실, 위장장애 등의 다양한 부작용 문제로 최근 상대적으로 부작용이 적으며 항당뇨 효능을 가지는 천연 소재를 찾고자 하는 연구가 진행되고 있다.¹¹ 최근 연구에서는 경구 투여된 포도당의 34%를 흡수하고 공복상태에서 신체가 필요로 하는 포도당의 90%를 공급하는 간의 포도당 흡수와 그에 의한 혈당강하기전에 관한 연구의 필요성이 증가하고 있다.¹²⁻¹⁴ 그중 당뇨로 인해 활성이 저하된 간세포에 효소 활성을 증가시키거나 효소 발현을 증가시켜 항당뇨 효능을 평가하는 연구가 진행되고 있다.^{12,15} 또한 간의 포도당 흡수와 혈관으로의 방출에 주요한 역할을 하는 glucose transporter (GLUT)-2에 관한 연구결과¹⁶와 Akt의 활성화를 통한 간세포 GLUT-4의 translocalization에 대한 연구결과가 발표되었다.¹⁷ 이러한 기초연구를 바탕으로 천연물 또는 식품을 통한 혈당 조절제품의 개발은 당뇨환자의 절제된 식생활 습관에 의해 저하된 삶의 질을 개선하는 주요방법이 될 것이며, 따라서 이에 대한 연구가 최근 과학적인 연구접근법과 함께 증가하고 있는 추세다.

저자는 이전 연구에서, *Aspergillus oryzae* CF1001을 포함한 *Aspergillus acidus* KACC46420, *Rhizopus delemar* KACC46149, *Rhizopus oryzae* KACC45714 등 다양한 균주를 이용하여 당화 starter를 제조하여, 쌀과 함께 메밀, 조, 기장, 수수를 모두 혼합한 원료량의 0.2%를 첨가하여 53°C에서 20 시간 동안 당화하여 잡곡당화음료를 제조하였고, 제조된 음료들 간의 항산화 활성을 비교하였다. 잡곡당화음료에는 폴리페놀과 플라보노이드 성분이 함유되어 있었으며, 항산화 활성이 균주에 따라 달리 나타난 것을 보고하였다. 또한 제품 개발과정에서 가장 중요한 평가요소인 색, 맛, 향의 품질평가에서 *Aspergillus oryzae* CF 1001 균주를 이용하여 제조한 음료가 가장 우수한 것으로 평가되었다.¹⁸

따라서 본 연구에서는 *Aspergillus oryzae* CF1001 균주를 이용하여 제조한 잡곡당화음료의 혈당조절기능을 통한 당뇨환자들의 삶의 질 개선을 위한 기능성 식품 개발의 기초자료를 제공하고자 중심합성계획법에 의해 최적 당화조건을 설정

하고, 제조된 잡곡당화음료의 향기성분 분석 및 항당뇨 활성을 확인하고자 하였다.

연구 방법

당화조건 최적화를 위한 중심합성 실험계획

본 실험에서는 잡곡당화음료의 당화 최적 조건을 설정하기 위해 반응표면분석법 (response surface methodology, RSM) 을 사용하였다. 추출조건에 대한 실험계획은 중심합성계획 (central composite design)을 사용하였으며, 반응표면분석을 위해 MiniTab 16 (Minitab inc, state college, PA, USA)을 사용하였다. 실험계획은 당화과정에서 중요한 변수로 고려되는 인자 즉, 당화온도 (40~60°C, X₁), 호화시간 (20~40 min, X₂) 를 중심합성계획에 따라 Table 1과 같이 13구간으로 설정하여 음료 개발을 실시하였다. 또한 이들 요인변수에 의해 영향을 받는 종속변수 (Y)는 가용성고형분 (Brix°)으로 하였으며, 이들은 3회 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다.⁵

최적 당화조건 예측

조건별 당화음료의 최적 당화조건 예측은 Brix°에 대한 contour map superimposing 했을 때 임의의 중심점을 최적 조건으로 예측하고, 회귀식에 대입하여 예측 값을 설정하였다.

향기성분분석

잡곡당화음료의 향기성분을 분석하기 위한 GC는 Agilent 7890A-FID (Agilent, Santa clara, CA, USA), GC-MS는 5975C (agilent)를 사용하였고, GC와 GC-MS column은 각각 DB-FFAP (60 m × 0.25 mm × 0.5 μ m film thickness,

Table 1. Central composite design for brix° on saccharogenic mixed grain beverage (SMGB) with gelatinization temperature and saccharogenic time

| Sample | X ₁ | X ₂ |
|--------|----------------|----------------|
| 1 | 50 | 40 |
| 2 | 50 | 40 |
| 3 | 50 | 40 |
| 4 | 60 | 20 |
| 5 | 64.1 | 40 |
| 6 | 50 | 40 |
| 7 | 50 | 68.3 |
| 8 | 50 | 40 |
| 9 | 35.9 | 40 |
| 10 | 50 | 11.7 |
| 11 | 60 | 60 |
| 12 | 40 | 20 |
| 13 | 40 | 60 |

X₁: Gelatinization temperature (°C), X₂: Saccharogenic time (min)

Agilent) capillary column을 사용하였으며 splitless mode로 분석하였다. GC oven 온도는 50°C에서 5분간 유지한 다음 90°C까지 분당 3°C 속도로 올려 5분간 유지한 다음 200°C까지 분당 2°C 속도로 올렸고, 5분 유지한 다음 220°C까지 분당 4분의 속도로 올린 후 70분간 유지하였다. 시료 주입구와 검출기 온도는 각각 240°C로 하였고 carrier gas는 helium을 사용하여 1.7 ml/min의 유속이 되도록 조절하였다. GC-MS의 검출기 분석조건은 ionization energy 70 eV, 시료의 이온화는 Elctron impact/mass spectrometer (EI/MS)방법으로 하였다. Source temperature는 200°C, trap current 250 uA로 하여 진행하였으며 각 시료의 peak의 total ion chromatography (TIC)를 얻은 후 National Bureau of Standards (NBS) library search (version 1,4 SRI, Thermo electron, Waltham, MA, USA)와 retention time을 비교하여 문헌상에 보고된 데이터와 비교하여 각각의 향기성분을 동정하고 GC를 이용하여 함량을 확인하였다.¹⁹

α -glucosidase 활성 측정

α -glucosidase는 Sigma Co. (Sigma-aldrich, St. louis, MO, USA)의 enzyme solution을 구입하여 사용하였다. α -glucosidase 활성억제 측정은 *in vitro*에서 기질과의 반응역학분석 (kinetic analysis) 방법으로 억제율을 측정하여 소재의 혈당 조절 기능을 규명하였다. Synthetic substrate인 2.5 mM p-nitrophenyl α -D-glucospyranoside를 phosphate buffer (pH 6.8)에 첨가한 후 α -glucosidase 활성 억제 실험을 할 시료를 넣고 그 혼합액에 enzyme solution을 첨가 후 37°C에서 20분간 반응시키고 0.1 M NaOH를 첨가하여 반응을 종결시켜 substrate인 pNPG로부터 유리되어 나오는 반응 생성물인 p-nitrophenol을 405 nm에서 측정하여 α -glucosidase 활성의 억제정도를 측정하였다.²⁰

세포주 배양

간암 세포주인 HepG2 (Hepatocellular carcinoma)는 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양받아 사용하였다. HepG2 세포는 Minimum essential medium (MEM, welgene, Daegu)배지에 10% fetal bovine serum (FBS, welgene, Daegu), 1% penicillin-streptomycin (welgene, Daegu)가 첨가된 배지를 사용하여 37°C 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

Glucose uptake

잡곡당화음료의 처리에 따른 HepG2 세포의 glucose uptake 변화는 glucose uptake colorimetric assay kit (Biovision, Milpitas, CA, USA)을 이용하여 수행하였다. 즉, HepG2 세

포를 96-well plates에 1×10^5 cells/ml로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 FBS가 포함되지 않은 배지로 교체하여 24시간 더 배양하였다. 배양된 세포는 2% BSA가 포함되어 있는 KRPH (Kres ringer phosphate HEPES)로 교체하였다. 40분 후, 1 μ M의 인슐린과 잡곡당화음료를 처리하여 20분간 동안 더 배양한 다음 10 mM 2-deoxyglucose를 20분간 처리하였다. 세포에 Assay buffer 8 μ l와 enzyme mix A 2 μ l를 처리한 후 37°C에서 1시간 동안 반응한 후 extraction buffer를 이용해 세포를 회수하였다. 85°C에서 40분간 가열한 후 차갑게 식혔으며 neutralization buffer를 첨가하였다. 500 rpm에서 10초간 원심분리하고 상층액을 취하였으며, 각각의 well에 glutathione reductase 20 μ l, DTNB (5-5'-dithiobis [2-nitrobenzoic acid]) 16 μ l, recycling mix 2 μ l를 첨가한 후 40분 동안 반응을 시켰으며 ELISA microplate reader (EL808, BioTek, Winooski, USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

HepG2 세포를 6-well plates에 1×10^6 cells/ml로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 잡곡당화음료를 각 농도별로 처리하여 24시간 동안 더 배양하였다. 잡곡당화음료가 함유된 배지를 제거한 후 QIAzol lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany)를 각 wells에 1 ml씩 분주하여 세포를 lysis한 후 -70°C에 보관하였다. 보관된 시료를 실온에서 녹인 후 chloroform 200 μ l를 분주하여 15초간 섞었다. 그 후 12,000 \times g 15분간 원심분리 하여 상층액을 isopropanol 500 μ l이 들어 있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 12,000 \times g 10분간 원심분리하였고, 그 상층액을 제거한 후 100% ethanol과 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 75 : 25로 섞어 만든 75% ethanol를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 12,000 \times g에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. Nuclease free water를 40 μ l씩 분주하여 녹인 후 RNA 5 μ l에 0.1% DEPC를 995 μ l를 첨가하여 260 nm에서 흡광 측정하여 total RNA양을 정량하였다.

First strand cDNA를 합성하기 위하여 AmfiRiert Platinum cDNA synthesis Master Mix (GenDEPOT, Barker, TX, USA)를 이용하였다. 추출한 RNA (2 μ g)와 RNase free water로 9 μ l을 맞추고 70°C에서 5분간 반응시킨 후 2 \times cDNA synthesis 완충용액 10 μ l, cDNA synthesis Enzyme Mix 1 μ l, 를 섞어 11 μ l씩 각 PCR tube에 더한 후 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

RT-PCR

항당뇨 관련 주요 효소들의 mRNA 발현량을 측정하기 위

하여 cDNA로 RT-PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequence는 Table 2와 같다. PCR tube에 Go Tag Green Master 10 μ l, forward primer (15 μ M)와 reverse primer (15 μ M)를 각각 0.5 μ l, nuclease free water 8 μ l, 합성한 first-stand cDNA 1 μ l를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR를 실행하였으며 각각의 primer의 PCR조건은 Table 3과 같다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1.2% agarose gel에 100 V에서 30분간 전기영동 후 자외선 광으로 유전자 발현 정도를 알아 보았다. 그 밴드의 강도를 imageJ (National institutes of health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다.

Western blot analysis

HepG2 세포를 6-well plates에 1×10^6 cells/ml로 분주한

Table 2. PCR primer sequences

| Gene | Primer | Sequence (5'→3') |
|----------------|---------|---------------------------------|
| GK | Forward | ACC GCA AGC AGA TCT ACA AC |
| | Reverse | TGG GGT GCA GCT TGT ACA |
| PDH | Forward | AAT CCA ACT GGT TAC TTT TGA AGA |
| | Reverse | AAG AGC TGA GCA GCT GTG TAA |
| ACL | Forward | AAC TTG GTC TCG TTG GGG TC |
| | Reverse | CGT GGT GGA ACA GGA CGT AG |
| GLUT-2 | Forward | GAT GAA CTG CCC ACA ATC TC |
| | Reverse | CTG ATG AAA AGT GCC AAG TG |
| GLUT-4 | Forward | GTT AAT CGG CAT TCT GAT CG |
| | Reverse | GTG AAG ACT GTG TTG ACC AC |
| ACC | Forward | GAG CCT GAG AAA CGG CTA C |
| | Reverse | CCC ATT ATT CCT AGC TGC G |
| β -actin | Forward | ACA GGA AGT CCC TTG CCA TC |
| | Reverse | AGG GAG ACC AAA AGC CTT CA |

뒤 24시간 동안 배양한 후 잠곡당화음료를 처리하여 24시간 동안 더 배양한 다음 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor Cocktail)를 이용하여 4°C에서 용해시킨 후 원심분리 (14,000 rpm, 10 min, 4°C) 하여 얻은 단백질 농도를 측정하였다. 동일한 양의 단백질 (30 μ g)과 β -mercaptoethanol를 포함한 sample buffer를 1 : 1로 혼합한 후 100°C에서 3분간 가열하였다. 그 단백질은 Bio-Rad mini-gel system를 이용하여 SDS-PAGE 후 하나는 Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 염색하였고, 다른 하나는 polyvinylidene fluoride membrane (0.45 μ m, PVDF transfer membrane, Thermo, Rockford, IL, USA)으로 단백질을 전이하였다. 비특이적 단백질 결합 부분은 0.1% Tween 20과 5% 탈지분유를 함유한 Tris-buffered saline (TBS)에 1시간 동안 반응시킴으로써 blocking 하였다. 그 후 GK, PDH, GLUT-2 및 GLUT-4 1차 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)가 첨가된 buffer에서 1시간 동안 반응한 후 TBS-T (TBS containing 0.1% tween-20)로 5분간 3차례에 걸쳐 세척하였다. 그런 다음 membrane은 2차 anti-rabbit IgG conjugates horseradish peroxidase antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)가 첨가된 용액을 넣고 상온에서 1시간 동안 혼합한 후 5분 단위로 3차례에 걸쳐 세척하였다. 발색은 enhanced chemiluminescence method를 이용하여 x-ray 필름에 감광시켰다. 그 밴드의 강도는 imageJ (National institutes of health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다. 내부 표준단백질은 GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 사용하였다.

Table 3. PCR condition of each primer

| Gene | Pre-denaturation | Denaturation | Annealing | Extension | Final extension |
|----------------|------------------|--------------|---------------|-------------|-----------------|
| GK | 94°C 5 min | 94°C 30 sec | 58°C 30 sec | 72°C 30 sec | 72°C 5 min |
| | | | 38 cycle | | |
| PDH | 94°C 5 min | 94°C 30 sec | 50.8°C 30 sec | 72°C 30 sec | 72°C 5 min |
| | | | 28 cycle | | |
| ACL | 94°C 5 min | 94°C 30 sec | 55°C 30 sec | 72°C 30 sec | 72°C 5 min |
| | | | 23 cycle | | |
| GLUT-2 | 94°C 5 min | 94°C 30 sec | 59°C 30 sec | 72°C 30 sec | 72°C 5 min |
| | | | 26 cycle | | |
| GLUT-4 | 94°C 5 min | 94°C 30 sec | 59°C 30 sec | 72°C 30 sec | 72°C 5 min |
| | | | 30 cycle | | |
| ACC | 94°C 5 min | 94°C 30 sec | 47°C 30 sec | 72°C 30 sec | 72°C 5 min |
| | | | 25cycle | | |
| β -actin | 94°C 5 min | 94°C 30 sec | 55°C 30 sec | 72°C 30 sec | 72°C 5 min |
| | | | 18cycle | | |

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (IBM Corporation, Version 10.0, Armonk, NY, USA) program을 이용하여 실험군당 mean ± S.D.으로 표시하였고, 각 농도의 평균치의 통계적 유의성을 p < 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

결 과

당화최적화 실험조건 탐색

중심합성계획에 의해 당화온도 (X₁)와 호화시간 (X₂)에 따른 Brix° (Y)에 대한 회귀식과 반응표면 분석에 의해 최적당화조건을 예측하였다. 당화 결과는 Table 4에 나타내었으며, 결과를 이용한 반응표면 회귀식은 Table 5에 나타내었다. Brix°에 대한 회귀식의 R²는 0.9645이고 0.1% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 13개 구간에서의 당화조건에 따른 Brix°의 최대값은 16.7이었고, 각각의 당화조건에 따른 Brix°에 대한 반응표면 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 당화온도 45~57°C에서 최대값을 나타내었으며, 호화시간은 20~60분에서 최대값을 나타내었다. Brix°에 대해 당화조건을 고려하여 능선분석한 결과 (Fig. 2), 당화온도 50.71°C, 호화시간 45.12분 일 때 Brix° 최대값은 16.69일 것으로 예상되었으며 (Table 6), 호화시간보다는 당화온도가 더 많은 영향을 미쳤을 것으로 사료 된다 (Table 7).

Table 4. Central composite design for brix° on SMGB with gelatinization temperature and saccharogenic time

| Sample | X ₁ | X ₂ | Brix° |
|--------|----------------|----------------|-------|
| 1 | 50 | 40 | 16.6 |
| 2 | 50 | 40 | 16.6 |
| 3 | 50 | 40 | 16.6 |
| 4 | 60 | 20 | 14.6 |
| 5 | 64.1 | 40 | 14.5 |
| 6 | 50 | 40 | 16.6 |
| 7 | 50 | 68.3 | 16.6 |
| 8 | 50 | 40 | 16.7 |
| 9 | 35.9 | 40 | 13.9 |
| 10 | 50 | 11.7 | 15.7 |
| 11 | 60 | 60 | 15.2 |
| 12 | 40 | 20 | 14.1 |
| 13 | 40 | 60 | 14.8 |

Table 5. Polynomial equation calculated for Brix° by RSM program for SMGB

| Responses | Polynomial equation | R ² | p-value |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------|
| Brix° | Y = 1 6.62 + 0.2186 X ₁ + 0.3216 X ₂ - 1.3350 X ₁ ² - 0.36 X ₂ ² - 0.250 X ₁ X ₂ | 0.9646 | 0.001 |

X₁: Gelatinization temperature (°C), X₂: Saccharogenic time (min)

향기성분분석결과잡곡당화음료를 SPME법으로 추출하여 GC-MS로 분석한 결과, 총 62가지의 휘발성 향기성분이 동정되었으며, 나타난 성분을 Table 8에 나타내었다. 동정된 성분은 acid 7종, aldehyde 6종, alcohol 5종, ketone 4종, furan 3종, hydrocarbon 2종과 ester 및 ether를 포함한 기타 6종으로 총 33종이 동정되었으며 29종의 미지 성분으로 나타났다. Palmitic acid (9.534%), Benzaldehyde (8.948%), Benzyl ethyl ether (8.792%), ethyl alcohol (8.35%) 등이 주요 성분으로 검출되었다.

α-glucosidase 활성억제 효능

Aspergillus oryzae CF1001을 이용하여 제조한 잡곡당화

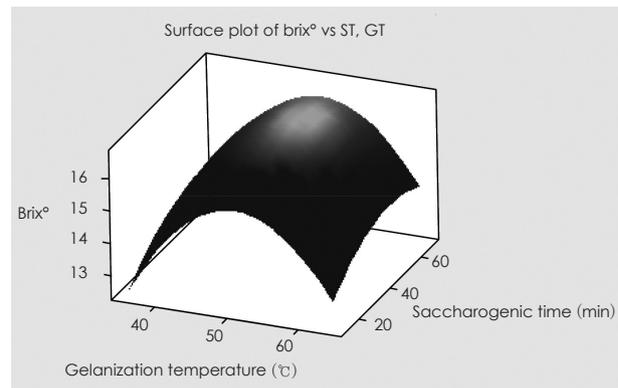


Fig. 1. Response surface plot of Brix° on the SMGB as functions of gelatinization temperature and saccharogenic times.

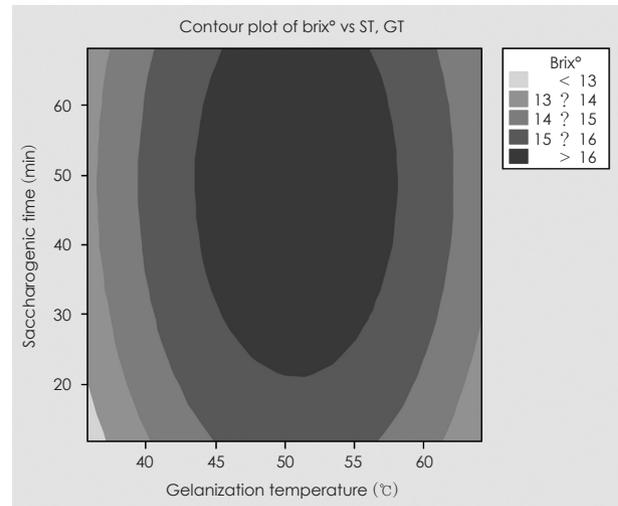


Fig. 2. Contour map of optimized conditions for the brix° of SMGB as functions of gelatinization temperature and saccharogenic times.

Table 6. Predicted levels of optimum conditions for the maximized and minimized responses of variables by the ridge analysis of their response surface

| Response | Saccharogenic condition | | | |
|----------|-------------------------|----------------|---------------------------|---------------|
| | X ₁ | X ₂ | Estimated responses (Max) | Morphology |
| Brix° | 50.71 | 45.12 | 16.6876 | Maximum point |

X₁: Gelatinization temperature (°C), X₂: Saccharogenic time (min)

Table 7. Regression analysis for regression model of Brix° in saccharogenic condition of SMGB

| Extract condition | F-ratio |
|-------------------|---------|
| X ₁ | 194.13 |
| X ₂ | 14.12 |

X₁: Gelatinization temperature (°C), X₂: Saccharogenic time (min)

Table 8. Volatile compounds of SMGB

| Compound | % peak area of flavor components in SMGBs |
|---------------------------|-------------------------------------------|
| Palmitic acid | 9.534 |
| Benzaldehyde | 8.948 |
| Benzyl ethyl ether | 8.792 |
| Ethyl alcohol | 8.350 |
| 2-Amyl furan | 4.826 |
| Aldehyde C-6 (Hexanal) | 3.243 |
| Acetoin | 3.205 |
| D-Limonene | 2.828 |
| Aldehyde C-9 (Nonanal) | 2.687 |
| Furfural | 2.309 |
| Myristic acid | 2.131 |
| Acetic acid | 1.938 |
| 4-vinyl Guaiacol | 1.506 |
| 2-Ethyl Hexanol | 0.844 |
| Germacrene-D | 0.695 |
| Salicylic aldehyde | 0.664 |
| Aldehyde C-7 (Heptanal) | 0.598 |
| Dihydro Benzofuran | 0.541 |
| Isovaleric acid | 0.540 |
| Methyl propyl ketone | 0.473 |
| 2-Heptanone | 0.473 |
| Isoamyl acetate | 0.468 |
| 2-Octanone | 0.468 |
| Hexanoic acid | 0.434 |
| 2-Butyl furan | 0.424 |
| 2-Ethyl furan | 0.419 |
| 1-Octen-3-ol | 0.372 |
| P-cymene | 0.371 |
| Ethyl caprylate | 0.358 |
| Octanoic acid | 0.326 |
| Benzyl alcohol | 0.256 |
| Linalool | 0.250 |
| Nonanoic acid | 0.216 |
| Non identified components | 30.763 |

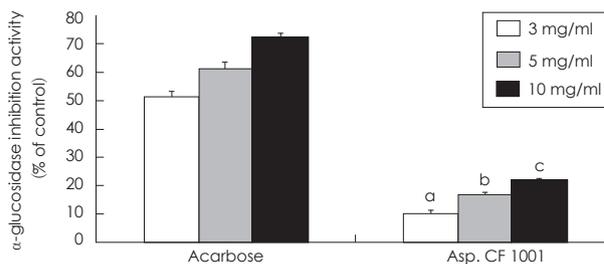


Fig. 3. Effect of SMGB on α-glucosidase inhibition activity. Values are mean ± standard deviation of triplicate determination, different letters on the bars (a–c) indicate significant differences (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

음료의 α-glucosidase 활성 억제 실험결과는 Fig. 3와 같다. 농도에 따른 α-glucosidase 활성억제능을 측정된 결과 α-glucosidase 억제제로 시판중인 acarbose의 활성은 3, 5, 10 mg/ml에서 각각 51.4 ± 1.63, 61.34 ± 2.13, 72.3 ± 1.63%의 활성을 나타내었으며, 잡곡당화음료에서는 9.99 ± 1.57, 16.67 ± 1.35, 21.94 ± 0.66%의 활성을 나타내었다. 잡곡당화음료와 acarbose 모두 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것으로 조사되었다.

Glucose uptake 및 관련 유전자 및 단백질 발현

잡곡당화음료가 HepG2 세포에 glucose uptake와 glucose uptake 관련 유전자 변화에 미치는 영향을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. Glucose uptake 실험결과 (Fig. 4A), 대조군과 비교하였을 때 139.87%증가한 것으로 나타났으며, 잡곡당화음료와 인슐린이 처리된 군은 인슐린 단독처리군에 비하여 약 143.17% 증가한 것을 관찰하였다. 간세포의 주요 glucose transporter (GLUT)인 glucose transporter-2와 -4 (GLUT-2, -4)의 mRNA 발현을 확인한 결과 (Fig. 4B), 잡곡당화음료의 처리에 의해 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, GLUT-2의 경우 10 mg/ml의 농도에서 279.57% 증가하였고, GLUT-4는 5 mg/ml에서 156.49% 증가하였다. GLUT-2와 -4의 protein 발현 증감을 조사한 결과 (Fig. 4C), GLUT-2의 경우 5 mg/ml에서 112.34% 증가하였고, GLUT-4는 5 mg/ml에서 112.81% 증가하는 것으로 관찰되었다.

Glucose metabolism 관련 유전자 및 단백질 발현

잡곡당화음료의 처리에 따른 HepG2 세포의 GK (glucokinase)와 PDH (pyruvate dehydrogenase) mRNA 증감을 조

사한 결과 (Fig. 5A), 모든 효소의 발현이 잡곡당화음료처리에 의해 증가하는 것으로 관찰되었다. GK의 경우 10 mg/ml에서 116.63% 증가하였고, PDH의 경우 10 mg/ml에서 149.72% 증가하였다. GK와 PDH protein 증감을 조사한 결과 (Fig. 5B), GK의 경우 3 mg/ml에서 108.9%, PDH의 경우 3 mg/ml에서

112.48% 증가하였다.

Fatty acid synthesis 관련 mRNA 발현

잡곡당화음료가 HepG2 세포의 ACL (ATP-citrate lyase), ACC (Acetyl-CoA carboxylase) mRNA 증감에 미치는 영향

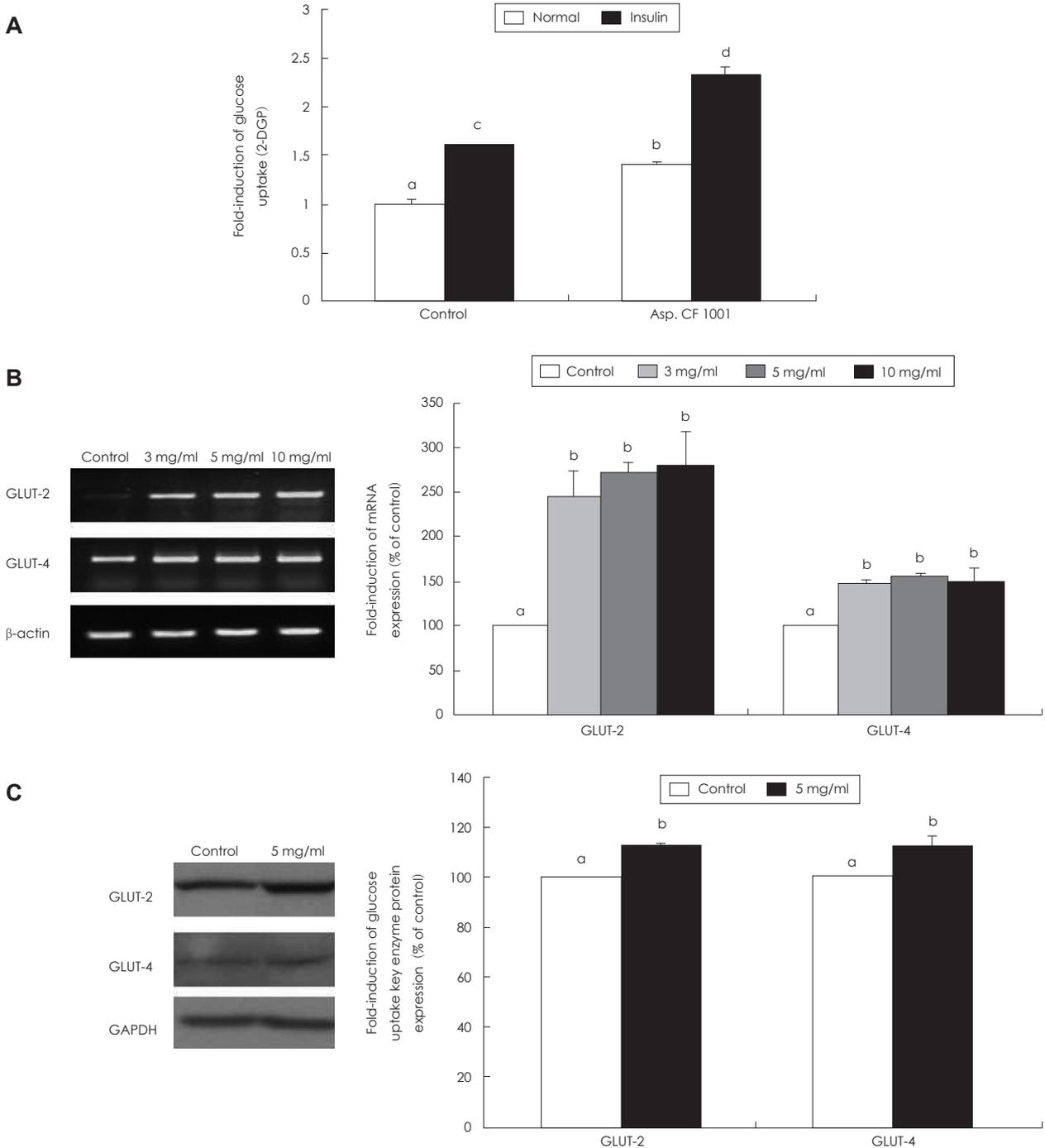


Fig. 4. Measurement of glucose uptake activity and GLUT-2, -4 expression in HepG2 cell. A: Effect of SMGB (Asp. CF1001) on glucose uptake. B: Effect of SMGB on GLUT-2, GLUT-4 mRNA expression. C: Effect of SMGB on GLUT-2, GLUT-4 protein expression. Values are mean \pm standard deviation of triplicate determination, different letters on the bars (a–d) indicate significant differences ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. GLUT: Glucose-transporter.

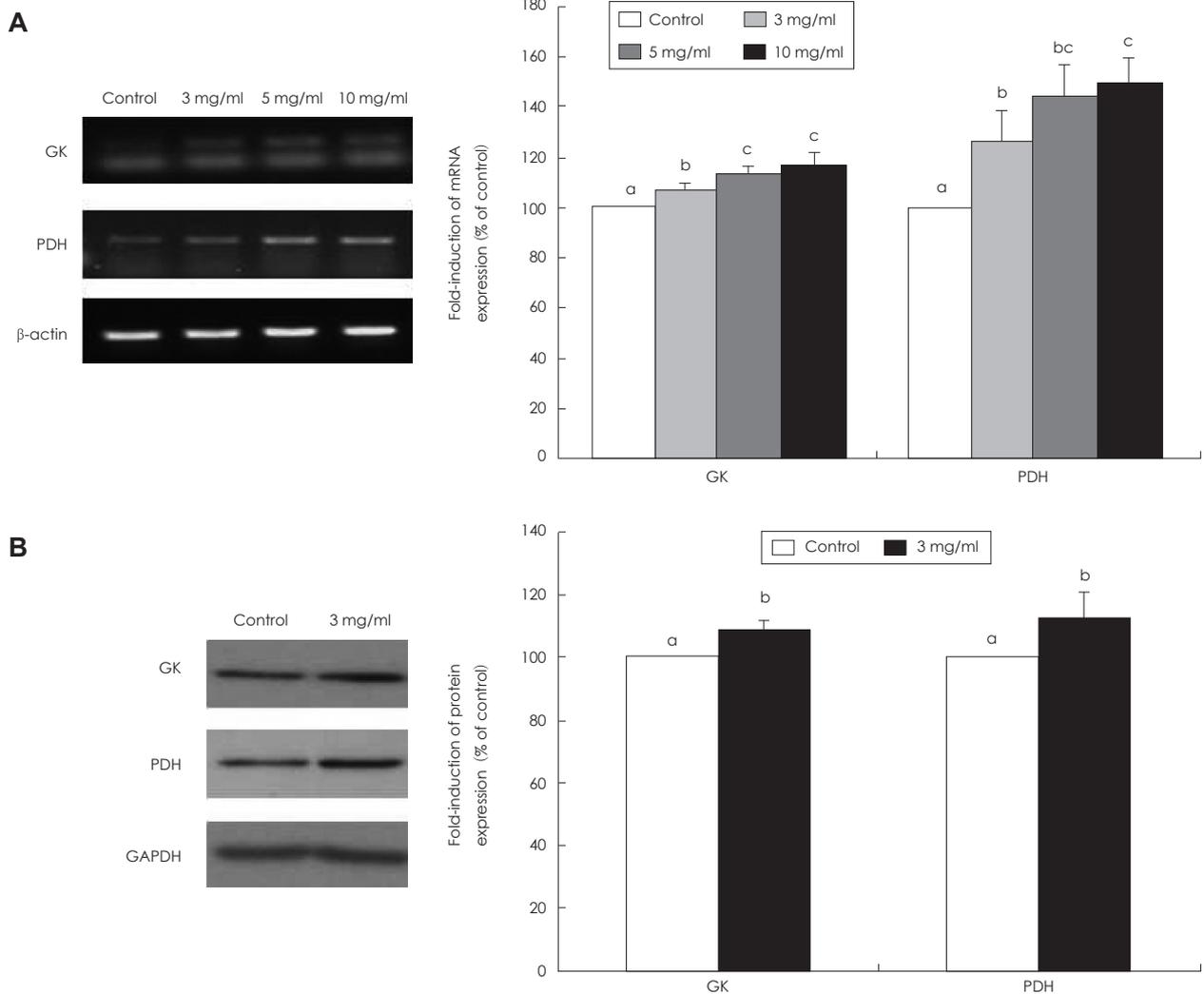


Fig. 5. Measurement of glycolytic key enzyme expression in HepG2 cell. A: Effect of SMGB on GK and PDH mRNA expression. B: Effect of SMGB on GK and PDH protein expression. Values are mean \pm standard deviation of triplicate determination, different letters on the bars (a–c) indicate significant differences ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. GK: glucokinase, PDH: pyruvate dehydrogenase.

을 조사한 결과 (Fig. 6), 두 효소 모두 10 mg/ml에서 가장 큰 발현 양을 나타내었다. ACL의 경우 10 mg/ml에서 215.9% 증가하였고, ACC의 경우 10 mg/ml에서 119.96% 증가하였다.

고 찰

Aspergillus oryzae CF1001균주를 이용하여 잡곡당화음료 제조시 Brix[°]는 당화온도가 높아질수록 증가하다가 55[°]C 이상 온도에서 감소를 보였으며, 추출시간에 따라 증가하다가 50분 이후로 서서히 감소하였다. 이는 당화 효소의 활성 최적 온도에 의한 것으로 판단된다. Choi 등²¹은 글루코오스 수율은 효소 사용량, 기질 농도, pH, 온도 등에 매우 민감하며, 최대 글루코오스 수율을 얻기 위해서는 최적 온도 및 pH

조건에서 효소 사용량을 높여야 한다고 하였으나, 효소 사용량의 증가는 비용 증가로 이어지기 때문에 적절한 최대 글루코오스 수율 내에서 효소 사용량을 최소화하는 공정을 만드는 것이 중요하다고 하였다. 이에 본 실험결과는 일정량의 당화효소를 이용한 최대 당화효율을 당화온도와 추출시간을 이용하여 최적화함으로써 생산 공정의 기초자료를 확보할 수 있었다.

휘발성 향기성분의 추출방법에는 SDE 및 SPME 법 등이 있으며,²² SDE 법은 소량의 용매로 추출하며 향기의 손실이 적지만 추출하는 동안 고온을 유지하므로 주요 성분이 분해될 수 있다. SPME 분석법은 휘발성분을 흡착제에 흡착시킨 후 추출 및 농축단계를 거치지 않고 바로 GC에 투입함으로써 비점이 낮은 향기성분 분석에 주로 이용되고 있다.²³ SPME

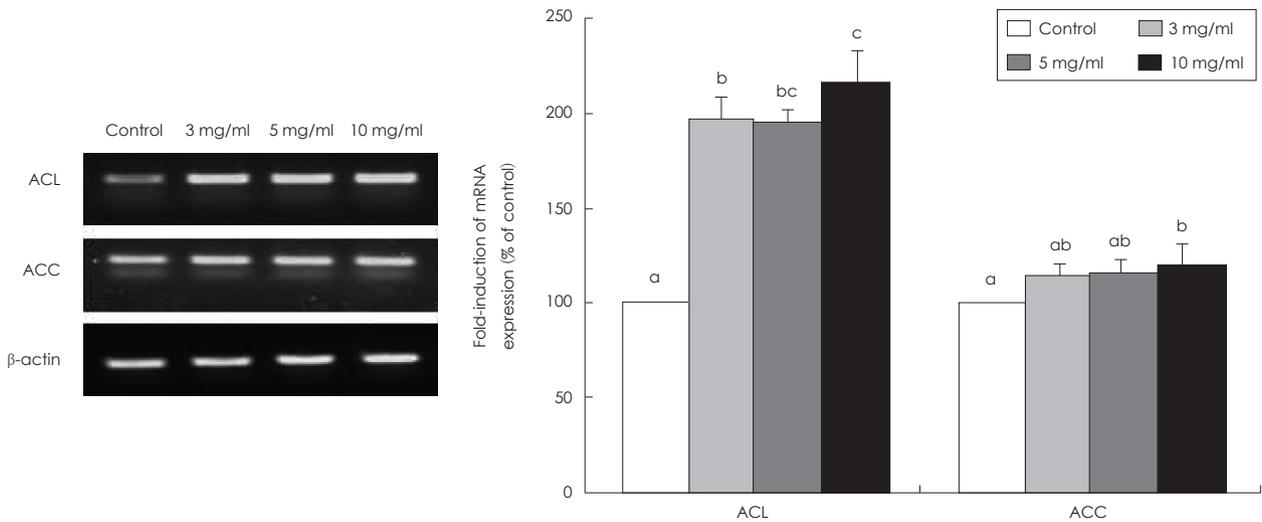


Fig. 6. Effect of SMGB on ACL and ACC mRNA expression in HepG2 cell. Values are mean \pm standard deviation of triplicate determination, different letters on the bars (a–c) indicate significant differences ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ACL: ATP-citrate lyase, ACC: Acetyl-CoA carboxylase.

분석법은 시료를 건조할 필요 없이 분석할 수 있으므로 건조로 인한 향기성분의 심한 손실을 가질 수 있는 시료의 경우 생체로 분석할 수 있다는 장점을 지니고 있다.²⁴

Lee와 Han²⁵은 *Aspergillus oryzae* 누룩으로 담금한 탁주 술덧의 발효과정 중 휘발성 향기성분을 분석한 결과, ester 24종, alcohol 21종, aldehyde 9종, acid 10종, 기타 4종 등 68종의 휘발성 향기성분이 동정하였으며, 휘발성 향기성분의 면적 비율을 확인한 결과 85.39~95.38%가 alcohol류로 나타났다. 본 실험에서는 *Aspergillus oryzae* 균을 발효가 아닌 당화 과정에 사용하여 음료를 개발하였기 때문에 휘발성 향기성분을 분석한 결과 alcohol류는 5종으로 종류와 함량이 Lee와 Han²⁵의 연구결과와 비교하여 낮았으며 면적 비율을 확인한 결과 palmitic acid (9.534%), benzaldehyde (8.948%), benzyl ethyl ether (8.792%), ethyl alcohol (8.35%) 등이 주요 성분으로 검출되었다. 향은 색깔 및 질감과 함께 주요한 관능적 요소 중 하나로 식품의 상품가치를 평가 및 향상시킬 수 있는 요소이다.²⁶ Choi 등²⁷은 식혜 제조 공정에서 엿기름을 첨가하면, 엿기름으로부터 추출되어 나오는 amylase에 의해 당화작용이 일어나고, 쌀 전분과 찹쌀 전분 등이 당화되어 maltose, glucose 등으로 전환되며 식혜 특유의 감미와 풍미가 생성되는 것으로 보고하였다. 본 실험 결과, *Aspergillus oryzae* CF1001을 이용하여 잡곡을 당화 시키는 과정에서 잡곡당화음료의 고유 향이 생성된 것을 확인할 수 있었으며 향후 관능평가결과를 개선하여 제품화에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

당뇨는 고혈당이 특징인 질환으로서, 췌장 Langerhan's islet의 β 세포의 인슐린 분비부족 혹은, 인슐린 수용체 이상으로 인한 인슐린 저항성에 의해 발병하게 된다.⁸ β 세포의 기능

저하는 당대사와 관련된 효소 활성을 정상적으로 유도하지 못하게 되며, 에너지원으로 사용되는 당이 세포 속으로 유입되지 못해 고혈당 상태가 지속 된다.¹¹ HepG2 세포는 증식율이 빠르고 hepatocyte의 기능을 모두 가지고 있어 대사 관련 연구에 선호되는 세포로 최근 당뇨, 비만과 같은 대사증후군에 관한 연구가 보고되고 있다. Isabel 등²⁸은 코코아로부터 추출한 flavonoid와 epicatechin이 HepG2 세포 내 AMP-activated protein kinase (AMPK)를 인산화시켜 glucose uptake를 증가시켰다고 보고하였으며, Nakamaru 등²⁹은 당뇨치료제인 AICAR의 처리가 HepG2 세포의 AMPK 활성을 증가시켰다고 보고하였다. 본 연구에서도 HepG2를 이용하여 잡곡당화음료의 항당뇨 활성을 평가하고자 하였다.

세포내 당 흡수는 glucose transporters (GLUTs)에 의해 조절되며, GLUTs는 발현 위치, 기질 등에 따라 15종으로 구분된다.³⁰ 사람 간조직과 HepG2 세포에서 발현되는 GLUTs 중에는 간에서 가장 많은 발현 양을 보이며 포도당의 항상성유지 역할을 하는 GLUT-2와 인슐린 신호기전에 의해 포도당 흡수기능을 수행하는 GLUT-4가 있다.³¹ Glucose transporter-2 (GLUT-2)는 인슐린 작용과 무관하게 혈중 포도당을 세포 내로 유입시키고, glucose transporter-4 (GLUT-4)는 증가되어 혈중 포도당을 인슐린 신호에 의해 세포 내로 유입시키는 역할을 한다. 이러한 GLUTs의 발현이 증가된다면 혈중 당 유입량이 증가되어 혈당은 저하될 수 있다.³² 또한 GLUT-2와 -4의 발현에 영향을 미치는 소재의 개발은 향후 소장, 근육 및 지방조직에서 포도당 흡수 및 대사에 미치는 영향을 연구할 기초자료가 될 수 있다. 본 연구결과 잡곡당화음료를 이용하여 glucose uptake 증감과 GLUT-2, -4 mRNA 및 protein 발

현을 확인한 결과, 인슐린 유무에 관계없이 glucose uptake가 증가하고 GLUT-2의 mRNA가 급격히 증가하는 것으로 나타났다. GLUT-4의 mRNA는 GLUT-2 보다는 낮았지만 유의한 증가를 보였다. GLUT-2 및 -4의 단백질 발현은 mRNA와 같이 잡곡당화음료에 의하여 유의한 증가효과를 나타내었다. 이는 잡곡당화음료의 처리가 HepG2 세포의 GLUT-2, -4 mRNA와 protein 발현을 증가시켜 세포외부에 존재하는 glucose를 세포 내로 유입시킬 수 있음을 의미한다.

Glucokinase (GK)는 간과 췌장 베타세포에 존재하며 glucose를 glucose-6-phosphate로 인산화 시키는 효소로, 간에서 glycogen 합성에 관여하여 혈중에 존재하는 과잉의 glucose를 소모하고, 당대사와 인슐린 분비를 조절하는 인자이다.³³⁻³⁵ Pyruvate dehydrogenase (PDH)는 pyruvate가 미토콘드리아 막을 통과하여 들어오면 호기성 물질대사의 중심 경로인 citric acid cycle로 들어가 에너지 대사에 사용 될 수 있도록 acetyl-CoA로 산화시키는 효소이다.^{35,36} Kim 등³⁷과 Choe 등³⁸은 동충하초에서 추출한 유효성분이 glucokinase, pyruvate dehydrogenase, acetyl CoA carboxylase 활성을 유의적으로 증가시켰다고 보고하였으며 당뇨병자에게 동충하초 인진쑥 메밀쌀 열수추출물의 혼합물섭취가 혈당강하 효능이 있다고 보고하였다. 본 실험에서는 잡곡당화음료가 HepG2 내의 GK, PDH의 mRNA와 protein의 발현을 증가 시키는 것을 확인하였으며, 이는 잡곡당화음료가 세포내로 흡수된 glucose를 소모시킬 수 있으며 잠재적으로 혈당강하 효능이 있음을 의미한다.

ACL와 ACC는 pyruvate가 TCA cycle을 통해 에너지를 생성하고 잉여의 glucose를 지방으로 전환 저장하는데 관여하는 효소이다.⁸ 잡곡당화음료의 처리가 HepG2 내 ACL와 ACC의 mRNA 또한 증가시키는 것으로 나타났다. Roman-Ropez와 Allred³⁹의 연구에서는 당뇨유발흰쥐에서 ACC의 감소가 관찰되었으며, Park 등⁴⁰은 당뇨가 유발된 흰쥐의 저하된 ACC 효소의 활성 회복을 통해 항당뇨 효능을 이끌 수 있다는 연구결과를 발표하였다. 이는 ACL 및 ACC의 활성화를 통해 항당뇨 효능이 사람에서도 유도될 수 있음을 의미한다. 그러나 지속적인 ACL 및 ACC의 활성화는 간조직내의 지방 축적을 통한 또 다른 대사적 문제를 유발 시킬 수 있으므로 일정부분의 당 섭취량 조절이 필요할 것이다.

상기 결과들을 토대로 잡곡당화음료는 α -glucosidase 활성 억제작용을 통해 소장 내 당수화물 분해를 억제하여 급격한 혈당상승을 억제하고, 간세포의 glucose 흡수를 증가시키고, 흡수된 glucose는 대사에 이용하도록 유도하며, 과잉된 glucose는 지방으로 전환 저장하여 잠재적인 혈당강하를 유도할 수 있음을 예측할 수 있다.

본 실험 결과 잡곡당화음료 개발조건 최적화 및 향기성분 분석을 통한 관능평가부분 개선방향 제시를 위한 기초자료를 확보하였으며, 항당뇨 활성을 검증함으로써 기능성음료 개발의 가능성을 확인할 수 있었다. 차후 잡곡당화음료의 맛 및 품질 개선에 대한 연구와 함께 다양한 기능성 평가에 대한 연구가 더 진행되면 당뇨병환자의 삶의 질 개선에 도움을 줄 수 있는 식품의 개발이 가능해질 것이다.

요 약

본 연구에서는 *Aspergillus oryzae* CF1001 균주를 이용하여 잡곡당화음료 개발조건 최적화와 향기성분을 분석하고 항당뇨 활성을 확인하고자 하였다. 중심합성실험계획법에 의해 당화온도 50.71°C, 호화시간 45.12분이 최적 당화조건으로 선정되었으며, 당화온도가 호화시간에 비하여 Brix° 증가에 더 많은 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 잡곡당화음료의 휘발성 향기성분은 33가지 동정성분과 29가지의 미지 성분이 분석되었다. 소장 내 당흡수와 관련된 α -glucosidase 활성억제는 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. HepG2 세포의 glucose uptake 활성을 확인한 결과, 인슐린에 관계없이 glucose uptake가 증가하였으며, 관련 단백질인 GLUT-2, -4의 발현 또한 증가하는 것으로 나타났다. 세포 내 당소모대사 관련 효소인 GK와 PDH도 증가하는 것으로 나타났으며, 잉여로 남은 glucose를 지방으로 전환 저장하는 ACL, ACC 유전자도 증가하는 것으로 나타났다. 이를 통해 잡곡당화음료가 glucose uptake와 세포 내 당소모대사 증가를 도우며, 남은 glucose를 지방으로 전환 저장시키는데 도움을 줄 것으로 사료된다.

References

1. Lee SE, Seong NS, Bang JK, Park CG, Sung JS, Song J. Antioxidative activities of Korean medicinal plants. Korean J Med Crop Sci 2003; 11(2): 127-134.
2. Kang JR, Lee SJ, Kwon HJ, Kwon MH, Sung NJ. Establishment of extraction conditions for the optimization of the black garlic antioxidant activity using the response surface methodology. Korean J Food Preserv 2012; 19(4): 577-585.
3. Hwang EY, Kim DH, Kim HJ, Hwang JY, Park TS, Lee IS, Son JH. Antioxidant activities and nitric oxide production of medicine plants in Gyeongsangbukdo (*Carthamus tinctorius* seed, *Cyperus rotundus*, *Schizonepeta tenuifolia*, *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*, *Paeonia lactiflora*). J Korean Soc Appl Biol Chem 2011; 54(3): 171-177.
4. Kim DI, Hong JH. Optimization of ethanol extraction conditions for functional components from *Lespedeza cuneata* using response surface methodology. Korean J Food Cookery Sci 2012; 28(3): 275-283.

5. Jeong JE, Shim SP, Jeong YS, Jung HK, Kim YC, Hong JH. Optimization of extraction conditions for ethanol extracts from Citrus unshiu peel by response surface methodology. *Korean J Food Preserv* 2011; 18(5): 755-763.
6. Joo N, Kim B, Kim AJ. The Optimization of jelly with blueberry juice using response surface methodology. *Korean J Food Nutr* 2012; 25(1): 17-25.
7. Jung KI, Cho EK. Adding germinated brown rice soaked in a mycelial culture broth of *Phellinus linteus* to muffins: an assessment using the response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2011; 40(6): 892-902.
8. Nepom GT. A unified hypothesis for the complex genetics of HLA associations with IDDM. *Diabetes* 1990; 39(10): 1153-1157
9. Kim DJ, Kim JM, Kim TH, Baik JM, Kim HS, Choe M. Effects of mixed extract from *Lycium chinense*, *Cordyceps militaris* and *Acanthopanax senticosus* on glucose-regulating enzymes of HepG2 in hyperglycemic conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2010; 39(9): 1257-1262.
10. Kim HS, Kim TW, Kim DJ, Kim KK, Choe M. Effects of medicinal plant water extracts on expression of anti-diabetic enzymes mRNA. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2013; 42(7): 1008-1014.
11. Kim HS, Kim TW, Kim DJ, Lee JS, Choe M. Effects of medicinal herb water extracts on expression of hepatic glucokinase, pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA carboxylase mRNA. *Korean J Nutr* 2013; 46(2): 119-125.
12. Zhang YL, Tan XH, Xiao MF, Li H, Mao YQ, Yang X, Tan HR. Establishment of liver specific glucokinase gene knockout mice: a new animal model for screening anti-diabetic drugs. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25(12): 1659-1665.
13. Moore MC, Coate KC, Winnick JJ, An Z, Cherrington AD. Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo. *Adv Nutr* 2012; 3(3): 286-294.
14. Cherrington AD. Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* 1999; 48(5): 1198-1214
15. Kim DJ, Kim JM, Kim TH, Baik JM, Kim HS, Choe M. Anti-diabetic effects of mixed extracts from *Lycium chinense*, *Cordyceps militaris*, and *Acanthopanax senticosus*. *Korean J Plant Resour* 2010; 23(5): 423-429.
16. Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ. Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 379-406.
17. Jang EH, Ko JH, Ahn CW, Lee HH, Shin JK, Chang SJ, Park CS, Kang JH. In vivo and in vitro application of black soybean peptides in the amelioration of endoplasmic reticulum stress and improvement of insulin resistance. *Life Sci* 2010; 86(7-8): 267-274.
18. Lee JS, Kang YH, Kim KK, Lim JG, Kim TW, Choe M. Characteristics and antioxidative activity of fermented mixed grain beverages produced by different microbial species. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2013; 42(8): 1175-1182.
19. Hwang SH, Choi SJ, Hwang YS, Lim SS. Comparison analysis of essential oils composition in difference parts from *Lindera obtusiloba* BL. according to the season by gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). *Korean J Pharmacogn* 2013; 44(1): 30-40.
20. Kim HS, Kim TW, Kim DJ, Lee JS, Kim KK, Choe M. Antioxidant activities and α -glucosidase inhibitory effect of water extracts from medicinal plants. *Korean J Med Crop Sci* 2013; 21(3): 197-203.
21. Choi GW, Han M, Kim Y. Development of glucoamylase & simultaneous saccharification and fermentation process for high-yield bioethanol. *Korean J Biotechnol Bioeng* 2008; 23(6): 499-503.
22. Parliment TH. Solvent extraction and distillation techniques. In: Marsili R, editor. *Techniques for Analyzing Food Aroma*. New York (NY): Marcel Dekker, Inc.; 1997. p.1-26.
23. Wells MJ. Chapter 2: principles of extraction and the extraction of semivolatiles from liquids. 2.1. Principles of extraction. In: Somenath M, editor. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, Inc; 2003. p.37-43.
24. Cho MG, Kim H, Chae YA. Analysis of volatile compounds in leaves and fruits of *Zanthoxylum schinifolium* Siebold et Zucc. & *Zanthoxylum piperitum* DC. by headspace SPME. *Korean J Med Crop Sci* 2003; 11(1): 40-45.
25. Lee TS, Han EH. Volatile flavor components in mash of Takju prepared by using *Aspergillus oryzae* Nuruks. *Korean J Food Sci Technol* 2001; 33(3): 366-372.
26. Oh HS, Kim JH, Choi MY. The volatile flavor components of fresh *Codonopsis lanceolata* cultivated on a wild hill. *Korean J Food Cookery Sci* 2006; 22(6): 774-782.
27. Choi YH, Kim KH, Kang MY. Varietal difference in processing and sensory characteristics of "Sikhe" in rice. *Korean J Breed* 2001; 33(2): 65-72.
28. Cordero-Herrera I, Martín MÁ, Goya L, Ramos S. Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells. *Food Chem Toxicol* 2014; 64: 10-19.
29. Nakamaru K, Matsumoto K, Taguchi T, Suefuji M, Murata Y, Igata M, Kawashima J, Kondo T, Motoshima H, Tsuruzoe K, Miyamura N, Toyonaga T, Araki E. AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase, down-regulates the insulin receptor expression in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328(2): 449-454.
30. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med* 2013; 34(2-3): 121-138.
31. McGowan KM, Long SD, Pekala PH. Glucose transporter gene expression: regulation of transcription and mRNA stability. *Pharmacol Ther* 1995; 66(3): 465-505.
32. Jung CY, Lee W. Glucose transporters and insulin action: some insights into diabetes management. *Arch Pharm Res* 1999; 22(4): 329-334.
33. Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(7): 1134-1145.
34. Park SA, Choi MS, Kim MJ, Jung UJ, Kim HJ, Park KK, Noh HJ, Park HM, Park YB, Lee JS, Lee MK. Hypoglycemic and hypolipidemic action of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaves water extract in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Ethnopharmacol* 2006; 107(3): 412-417.
35. Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic β -cells and hepatocytes. *Diabetes* 1990; 39(6): 647-652.
36. Shimizu T, Parker JC, Najafi H, Matschinsky FM. Control of glucose metabolism in pancreatic β -cells by glucokinase, hexokinase, and phosphofructokinase. Model study with cell lines derived from β -cells. *Diabetes* 1988; 37(11): 1524-1530.
37. Kim HS, Ro YJ, Choe M. Effects of *Cordyceps militaris* on key enzymes of carbohydrate metabolism. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2005; 34(10): 1531-1535.
38. Kim HS, Kim DJ, Hwang HJ, Lee HJ, Choe M. Hypoglycemic effect of nutraceuticals extract supplementations on NIDDM patients. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2007; 50(1): 68-71.
39. Roman-Lopez CR, Allred JB. Acute alloxan diabetes alters the activity but not the total quantity of acetyl CoA carboxylase in rat liver. *J Nutr* 1987; 117(11): 1976-1981.
40. Park MJ, Kang SJ, Kim AJ. Hypoglycemic effect of *Angelica gigas* naki extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food Nutr* 2009; 22(2): 246-251.