식품 발효중 기능성 물질의 생전환 및 기능성 변화

지 현[1], 위혜정[1], 황인경[1], 박경래[1], 최은경[1], 지근억[1,2]
[1]서울대학교 식품영양학과, [2](주)비피도 기술연구소

요 약

본 연구에서는 프로바이오틱스로 사용하는 유용 미생물과 식용으로 안전하게 사용 가능한 미생물 자원을 이용하여 배당체의 전환 연구를 실시하여 전환체의 새로운 생리활성 작용에 대하여 연구하였다. 연구에 사용한 주요 소재로는 인삼의 사포닌 배당체, 길경의 platycodin 배당체, 호로파의 사포닌 배당체, 칡과 두유의 이소플라본 배당체 등이었다. 사용 균주로는 bifidobacteria, lactobacilli, leuconostocs, yeasts, aspergilli 등이었다. 유산균 중에는 *Bifidobacterium* sp. Int-57의 전환능이 우수하였고 식용 곰팡이 중에는 *A. niger*의 전환능이 우수하였다. 다양한 미생물 또는 효소를 이용한 전환체에 대하여 아질산 소거능, 항산화능, a-glucosidase와 a-amylase 저해능 등을 조사하였을 때 일반적으로 전환 후의 활성이 증가하였다. 길경 사포닌은 전환 후에 세포 독성이 줄어들었으며 관능성이 유의적으로 개선되었다. 결론적으로, 프로바이오틱스와 식용 미생물을 이용하여 천연물 중에 존재하는 배당체의 생리활성 및 관능성을 증가시킬 수 있어 새로운 기능성 식품의 개발에 활용할 수 있을 것이다.

서 론

천연 물질 배당체는 비 배당체와 당의 결합으로 이루어져 있으며 식물, 동물, 미생물 등 다양한 생물체에 존재한다. 배당체는 다양한 호르몬, 알칼로이드, 플라보노이드 등의 구조를 이루며 다양한 약물과 기능성 물질의 개발에 이용된다. 배당체는 자연계에서 존재할 때는 수용성을 부여하여 조직과 세포내에 골고루 분포되어 있으나 인체 내로 섭취된 후에는 상대적으로 장을 통한 혈액내로의 흡수가 낮은 형태이다. 배당체는 생물 전환 또는 효소적 전환에 의하여 당이 가수분해 될 수 있다. 일반적으로 비 배당체 형태는 배당체 형태에 비하여 체내 흡수가 용이하고 생리 활성 작용도 증가하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 배당체는 인체의 장내에 있는 미생물에 의하여 비 배당체로 전환되어지면 흡수율이 증가하지만 사람마다 장 내의 미생물에 의한 전환율과 전환 경로에 차이가 날 수 있다. 그동안, 배당체를 전환하기 위하여 산, 알칼리, 효소, 미생물 등이 이용되었다. 산과 알칼리 처리는 epimerization, hydration, hydroxylation 등을 일으켜 다양한 부 반응 산물을 생성하는 단점이 있고 효소 또는 미생물을 사용하는 경우에는 안전성에 대하여 고려하여야 한다. 이와 같은 점들을 고려하여 본 연구에서는 건강 증진 작용을 갖는 프로바이오틱스 균주와 식용 가능한 균주들을 대상으로 다양한 배당체의 전환 연구를 실시하였다.

본 론

인삼 사포닌(진세노사이드)의 전환 및 전환체의 특성 연구

고려인삼 (the root of *Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오갈피나무과(family Araliaceae)에 속하는 다년생 초본으로 동양에서 수 천년 동안 각종 질병의 예방과 치료에 광범위하게 복용되어온 전통 약재이다. 인삼의 성분 중 약효

를 나타내는 것은 ginsenoside라고 불리는 인삼 특유의 사포닌으로 담마란(dammarane) 골격을 가지고 있으며, protopanaxadiol 계 사포닌과 protopanaxatriol계 사포닌이 대부분을 차지하고 있다. 인삼 사포닌은 섭취 후 사람의 장내 미생물에 의해 대사되어 그 생물전환체가 약효를 나타내는 것으로 보고되었다. 이 연구의 목적은 ginsenosides 를 식품미생물의 효소와 반응시켜 특이적인 deglycosylated ginsenoside 를 생산하고 그 특징을 규명하며 전환경로를 확인하는 것이었다(Fig. 1). 배지에서 미생물과 함께 배양하는 방법보다는 미생물 조효소와 반응시킨 것이 더 효과적으로 사포닌을 전환시켰다. Bacteria중에서는 *Bifidobacterium* sp. Int57(Int57)가 20-*O*-D-glucopyranosyl-20(*S*)-protopanaxadiol(compound K) 생산능이 가장 높았고 그 다음으로는 *Bifidobacterium* sp. SJ32 (SJ32)가 높았다. 곰팡이에서는 *Aspergillus niger*가 *A. usamii*보다 compound K를 더 많이 생산하였다. Int57, SJ32, *A. niger*는 ginsenosides Rb1 (Rb1), Rb2 (Rb2), Rc (Rc)로부터 compound K를 생산하였다. *Bifidobacterium* sp. SH5 는 Rb1, Rb2, Rc로부터 3-*O*-b-D-glucopyranosyl-20-*O*-b-D-glucopyranosyl-20(*S*)-protopanaxadiol (ginsenoside F2)를, *Leuconostoc paramesenteroides*와 *Lactobacillus delbrueckii*는 Rb1, Rb2, Rc로부터 3-*O*-b-D-glucopyran-osyl-20(*S*)-protopanaxadiol (ginsenoside Rh2)을 생산하였다. Int57, SJ32, *A. niger*는 ginsenoside Re (Re)로부터 6-*O*-b-D-glucopyranosyl-20(*S*)-protopanaxatriol (ginsenoside Rh1)를 생산하였고 *Leu. paramesenteroides*는 Re로부터 20-*O*-b-D-glucopyranosyl-20(*S*)-protopanaxatriol (ginsenoside F1)와 6-*O*-[*a*-L-rhamnopyr anosyl-(1-2)-b-D-glucopyranosyl]-20(*S*)-protopanaxatriol (ginsenoside Rg2)를 생산하였다. *A. usamii*는 ginsenoside Re로부터 ginsenoside Rg2를, ginsenoside Rg1로부터 ginsenoside Rh1를 생산하였다. 또한 p-nitrophenyl-*β*-D-glucopyranoside 가수분해 활성은 ginsenosides 전환능과 일치하지 않았으나, *L. delbrueckii*와 *A. usamii*를 제외한 거의 모든 미생물에서 p-nitrophenyl-*a*-L-arabinopyr-anoside, p-nitrophenyl-*a*-L-arabinofuranoside, p-nitrophenyl-*a*-L-rhamnopyranoside 가수분해 활성이 ginsenosides 전환능과 거의 일치하였다. 이러한 결과로부터 적합한 ginsenosides와 특정 미생물효소를 이용하여 우리가 원하는 특정 ginsenosides 를 얻을 수 있는 특이적인 생물전환공정을 개발할 수 있을 것으로 생각한다.

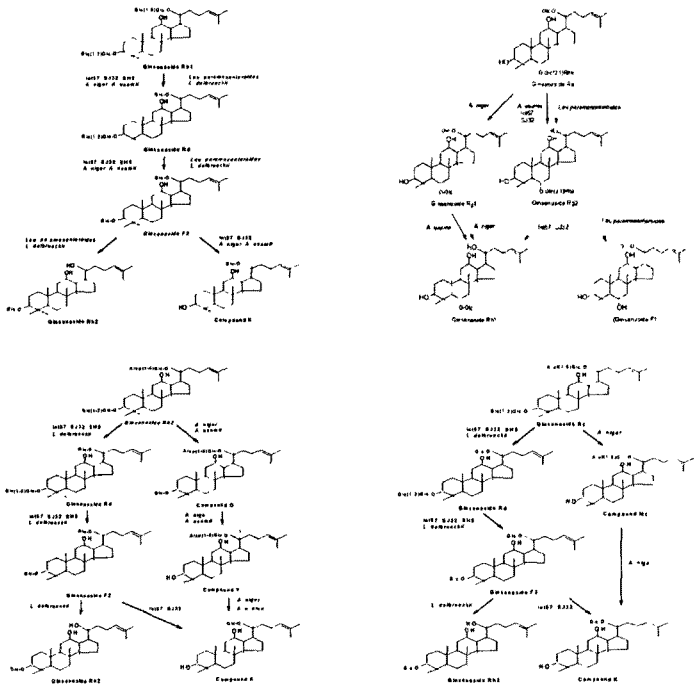

Fig. 1. Proposed transformation pathways of Rb1, Rb2, Rc, and Re by cell-extracts from various food microorganisms.

길경 사포닌(플라티코딘)의 전환 및 전환체의 특성 연구

길경은 도라지(*Platycodon grandiflorum* A. DC, 초롱꽃과(Campanulaceae))의 뿌리 부분이며 호흡기계 질환에 사용되어 온 생약재로, 현대과학에서 보고된 주요 약리활성 성분은 terpenoid계 사포닌으로서 동물실험에서 진해, 거담작용, 급만성염증, 항궤양 및 위액분비 억제작용, 혈당강하작용, 콜레스테롤 대사 개선작용 등이 있는 것으로 밝혀져 있다.

길경의 주요 약효 성분은 triterpenoid saponin인 platycodin A, C, D 등이며 이 외에 inulin, betulin, stigmasterol 등이 주요 성분으로 함유되어 있다. 그 중에서도 platycodin D는 길경의 가장 대표적인 활성 성분으로 식약청에서 1997년 한약재 표준화 사업의 규격기준설정을 위한 성분분석법 개발연구에서 이를 길경의 지표물질로 설정한 바 있다. 길경의 사포닌은 20가지 이상이며 그 중 주요 약효성분인 platycodin D는 기본 aglycone 골격의 3번 탄소에 β-D-glucopyranoside와 28번 탄소에 β-D-apiofuranosyl (1→3)-β-D-xylopyranosyl (1→4)-α-L-rhamnopyranosyl (1→2)-α-L-arabinopyranoside가 에스테르 결합을 하고 있는 형태이다. 사포닌은 이러한 당의 결합여부와 수에 따른 구조의 차이에 의해 여러 효능과 성질도 달라질 수 있다.

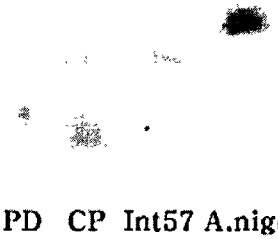

Fig. 2. TLC profiles of platycodin D transformed by crude intracellular enzyme from Int 57 and extracellular enzyme from *A. niger* (PD : platycodin D, CP : crude platycodin, A. niger : PD transformed by the enzyme from *Aspergillus niger*, Int57 : PD transformed by the enzyme from *Bifidobacterium* sp. Int57)

이 연구에서는 다양한 프로바이오틱스 미생물과 식용 곰팡이를 이용하여 길경의 주요 사포닌인 platycodin 배당체를 전환할 수 있는 가능성을 모색해 보았다. Bifidobacteria, lactobacilli, leuconostocs, yeasts, 그리고 aspergilli와 같은 다양한 실험용 균주들에서 세포 안팎의 미정제효소를 얻어내어 platycodin에 대한 분해능을 알아보았다(Fig. 2). 대부분의 균주들은 platycodin을 전환하는 능력이 약하였으나 *Aspergillus niger*의 분비효소는 platycodin에 대한 양호한 가수분해능을 나타내었다. 반면에, *Bifidobacterium* sp. Int57의 세포 파쇄액은 다양한 미생물의 세포 내 분비효소 가운데 platycodin에 대한 가장 큰 가수 분해능을 나타내었다. Platycodin에서 28번 탄소 당 사슬의 부분적 가수분해의 주요한 위치는 rhamnose와 xylose의 사이에 위치해있다는 것을 LC/MS를 통해 추정하였다. Chinese hamster의 lung fibroblast인 V79-4 세포에 대한 세포독성을 조사한 결과 전환 후에 독성이 유의적으로 감소하여 90%정도의 정상 세포 생존율을 보였고(Fig. 3), 적혈구에 대한 용혈 독성이 사라졌으며, 아린 맛, 쓴 맛과 뒤에 남는 맛에 대한 관능치도 모두 유의적으로 감소하였다(Table 1). 또한, crude platycodin에 대해 기포 시험을 한 결과 전환 후에도 사포닌의 기포성은 그대로 남아있었으며, 아질산염 소거능은 pH 1.2와 pH 3에서 전환 후에 유의적으로 증가하여 두 배 정도의 소거능을 보였다(Fig. 3).

이러한 결과는 식품 미생물과 발효 조건의 적절한 조합이 platycodin의 가수분해를 증가시키고 그 결과물은 증가된 아질산염 소거능과 감소된 세포독성, 개선된 관능치를 지닌다는 것을 나타낸다.

Table 1. The sensory scores of the crude platycodin and the transformed metabolites on 15 cm line scale.

Flavor(n=21)	before conversion	after conversion	p value
pungency	10.3 ± 1.5	7.4 ± 2.2	< 0.001
bitterness	10.4 ± 2.1	8.8 ± 1.7	0.021
after taste	11.0 ± 1.2	6.9 ± 2.6	< 0.001

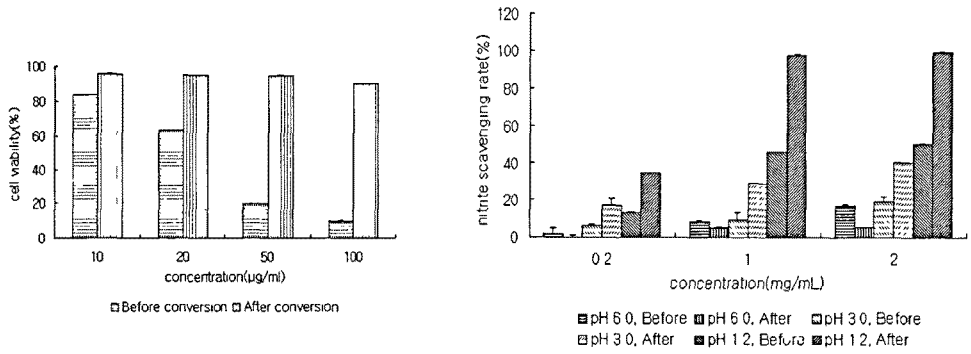

Fig. 3. The cell viability and nitrite-scavenging activity of crude platycodins and the transformed metabolites.

칡과 콩의 이소플라본 배당체 전환 및 전환체의 특성 연구

칡(Puerariae Radix)은 한국, 일본, 중국 등에 분포된 야생식물로 *Pueraria thunbergiana, P. thomasanii, P. omeinsis, P. phaseoloides, P. mirifica*로 분류되며 우리나라에는 주로 *Pueraria thunbergiana*가 존재한다. 칡에는 phytoestrogen인 이소플라본이 다량 함유되어 있다. 칡에 함유된 이소플라본에는 daidzin, daidzein, puerarin, genistein, formononetin 등이 있다. 이런 이소플라본이 체내로 흡수되고, 생리적 활성을 갖기 위해서는 화학적 형태가 중요한데, 콩과식물에는 천연적으로 배당체 형태의 이소플라본이 존재한다. 이것은 장내 미생물의 β-glucosidase 등에 의해 비배당체 형태의 이소플라본으로 전환되어 흡수된 후 활성을 갖는다. 다양한 프로바이오틱스 미생물과 식용 곰팡이로 발효하였을 때, *Bifidobacterium* sp. Int-57과 *Leu. paramesenteroides* PR은 daidzin을 활발히 가수분해하였다. 칡 이소플라본의 가수분해능을 높이기 위해서 50% 칡즙에 당원, 질소원, 비타민, 탈지우유, 우유를 첨가하였으며, daidzin의 가수분해 정도는 HPLC를 통해서 측정되었다. 다양한 영양 공급원들 중 2.5% yeast extract가 첨가된 50% 칡즙에서 daidzin이 모두 가수분해되었다. 그 외 탈지우유와 우유가 첨가된 50% 칡즙에서도 높은 활성이 관찰되었다. C-glucoside인 puerarin은 *Pleurotus populinus*에 의하여 분해되었다.

콩에 존재하는 daidzin, genistin 등의 이소플라본은 약한 에스트로겐 활성을 갖는 것으로 보고되었다. 콩의 다양한 형태 중 유산균을 이용하여 두유 요쿠르트를 제조할 수 있다. 본 연구에서는 다양한 균주를 이용하여 두유 요쿠르트를 제조하였을 때 *Bifidobacterium* sp. Int-57 균주가 두유 내의 이소플라본 배당체를 비 배당체로 변환시키는 능력이 가장 좋았다. 두유에 존재하는 이소플라본 배당체인 daidzin과 genistin은 *Bifidobacterium* sp. Int-57으로 발효시켰을 때 18시간만에 완전히 가수 분해되어 daidzein과 genistein으로 변환되었다. *Bifidobacterium*으로 발효하였을 때 발효 전에 비하여 항산화력이 증가되었다. 콩의 종류에 따른 발효 후의 관능성을 비교하였을 때 lipxygenase가 결핍된 진품콩 1 호와 진품콩 2 호로 제조한 두유 발효유의 선호도가 가장 높았다.

호로파 사포닌의 전환 및 전환체의 특성 연구

호로파(*Trignoella foenum-graecum* Fenugreek)는 약용식물과 식재료로서 사용되어 왔으며, diosgenin과 같은 사포닌이 풍부하다. 호로파 씨는 혈당과 혈중 콜레스테롤을 낮추는 물질이라 알려졌으며, 조미료와 식욕 증진제로 사용된다. 호로파 사포닌을 다양한 식용 미생물로 발효시켰을 때는 생물 전환이 일어나지 않았지만, 미생물 조효소로 반응시켰을 때는 당쇄가 가수분해되었다(Fig. 4). 사용된 미생물 중에서 *Bifodobacterium* sp. Int57 (Int57)이 활성이 가장 높았다. Int57에 의한 호로파 사포닌 전환체의 a-glucosidase와 a-amylase 저해능을 측정한 결과 사포닌은 전환체는 0.1 mg/ml 농도에서 a-glucosidase와 a-amylase 저해 능력이 전환 전의 사포닌보다 높았다(Fig. 5). 이러한 결과로부터 미생물에 의해 전환된 호로파 사포닌은 혈당을 낮추는 능력이 증가할 것으로 생각된다.

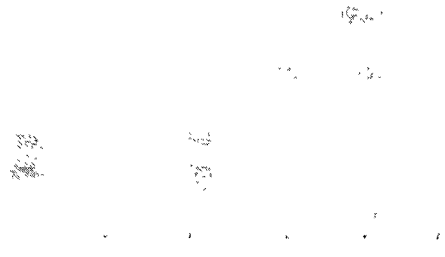

Fig. 4. TLC profiles of TFG saponins transformed by bacterial enzymes. TFG extract was incubated with crude bacterial enzyme at 37 ℃ for 24 h.

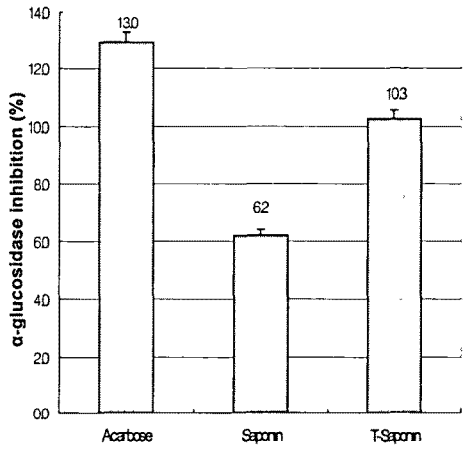

Fig. 5. Inhibition activities of TFG saponins and transformed saponins by *Bifidobacterium* sp. Int57 at the concentration of 0.1 mg/ml on a-gludosidase. Acarbose was used as positive control.

감사의 글

본 연구는 과학기술부(grant no. M1-0302-00-0098)와 중소기업청(grant no. S1003983)의 지원에 의하여 이루어져 감사드립니다.

참고문헌

Akao T, Kanaoka M, Kobashi K. Appearance of compound K, a major metabolite of ginsenoside Rb1 by intestinal bacteria, in rat plasma after oral administration measurement of compound K by enzyme immunoassay. *Biol Pharm Bull* 1998, 21:245-249.

Basch E, Ulbricht C, Kuo G, Szapary P, Smith M. Therapeutic applications of Fenugreek. *Alternative Medicine Review* 2003, 8:20-27.

Choi EK, Ji GE. Food microorganims that effectively hydrolyze O-glycoside but not C-glycoside isoflavones in *Puerariae radix*. *J Food Sci* 2005, 70:C25-C28.

Chi H, Ji GE. Transformation of ginsenosides Rb1 and Re from *Panax ginseng* by food microorganisms. *Biotechnol Lett* 2005, 27:765-771.

Ishii H, Tori K, Tozyo T, and Yishimura Y. Structures of polygalacin-D and D_2, platycodi-D and D_2 and their monoacetates, saponins isolated from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle determined by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Pharm Bull* 1978, 26:674

Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* 2000, 130:1695-1699.

Joint FAO/WHO. Expert Consultation on "Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria". 2001.

Kanaoda M, Akao T, Kobashi K. Metabolism of ginseng saponins, ginsenosides, by human intestinal bacteria. *J Trad Med* 1994, 11:241-245.

Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Taniyama T, Takino Y. Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VII. Comparison ofthe decomposition modes of ginsenoside-Rb1 and -Rb2 in the digestive tract of rats. *Chem Pharm Bull* 1991, 39:2357-2361.

Kim HY, Kwack KB, Kim DY, Ji GE. Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumin-induced allergy mouse model. *FEMS Immunol Med Mic* 2005, 45.259-267.

Lee EB. Pharmacological studies on *Platycodon grandiflorum*A. DC: IV. A comparison of experimental pharmacological effects of crude platycodin with clinical indications of platycodi radix. *Yakugaku Zasshi* 1973, 93:1188-1194.

Murakami T, Kishi A, Matsuda H, Matsuda H, Yoshikawa M. Medicinal foodstuffs. XVII. Fenugreek Seed. (3): Structures of new furostanol-type steroid saponin, Trigoneosides Xa, Xb, XIb, XIIa, XIIb and XIIIa, from the seeds of Egyptian *Trigonella foenum-graecum* L. *Chem Pharm Bull* 2000, 48. 994-1000.

Park MS, Seo JM, Kim JY, Ji GE. Heterologous gene expression and secretion in the genus *Bifidobacterium*. *Lait* 2005, 85: 1-8.

Park SY, Ji GE, Ko YT, Jung HK, Ustunol Z, Pestka JJ. Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide, and cytokine production in RAW 264.7 macrophage cells exposed to human and commercial isolates of *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol* 1999, 46:231-241.

Sharma RD, Sarkar A, Hazra DK, Mishra B, Singh JB, Sharma SK, Maheshwari B. Maheshwari PK. Use of fenugreek seed powder in the management of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Nutr Res* 1996, 16: 1331-1339.

Tawab MA, Bahr U, Karas M, Wurglics M, Schubert-Zsilavecz M. Degradation of ginsenosides in humans after oral administration. *Drug Metab Dispos* 2003, 31: 1065-1071.

You HJ, Oh DK, Ji GE. Anticancerogenic effect of a novel chiro-inositol containing polysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* BGN4. *FEMS Microbiol Lett* 2004, 240: 131-136.

Xu X, Harris KS, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J Nutr* 1995, 125: 2307-2315

Zhao HL. The effects and mechanisms of platycodin saponins on obesity and lipid metabolism, Graduate School, Seoul National University, 2005.