



Amygdalin의 *In Vitro* 분해에 관한 연구

권훈정 · 조용진

서울대학교 생활과학대학 식품영양학과

A Study on the Decomposition of Amygdalin Using an *In Vitro* Assay

Hoonjeong Kwon and Yongjin Jo

Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Received December 9, 2006; Accepted March 5, 2007

Amygdalin is a cyanogenic glycoside which is commonly found in almonds, bamboo shoots, and apricot kernels, and peach kernels. Amygdalin was first hydrolysed into prunasin, then degraded into cyanohydrin by sequential two-stage mechanism. The objective of this study was to examine the amygdalin decomposition and cyanide formation at various *in vitro* conditions, including acid, enzyme and anaerobic microbes (AM) in human feces (HF). In acid hydrolysis mimicking gastric environment, amygdalin was degraded to cyanide up to 0.2% in specific pH. In contrast, enzyme assay showed higher cyanide generation either by β -glucosidase, or by incubation with microbe. In conclusion, we are convinced of cyanide generation are occurred mainly by microbiological activities of the gut flora up to 41.53%. After ingestion with some staff, the degree and site of degradation in an organism is a key part of regulatory decision making of that staff.

Key words: Amygdalin, β -Glucosidase, König reaction, Human feces.

서 론

시안 배당체는 대략 2000종의 식물에 포함되어 있는 물질이며 Amygdalin(D-mandelonitrile- β -D-glucoside-6- β -D-glucoside)는 죽순, 복숭아, 행인, 사과 씨 등을 포함한 약 천 여종의 식물체에서 발견이 되고 있는 물질이다. 시안 배당체는 외부 요인에 의해 가수분해 되어 시안 이온으로 바뀌게 된다. 전체적인 시안이온의 독성은 인간이나 동물에게서나 cytochrome oxidase를 무력화 시키는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 독성 때문에 근래에 많이 섭취 되는 시안 배당체 함유 식품에 대한 체내환경요소에 따른 분해와 독성작용에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

일반적으로 섭취 가능한 식품에 존재하는 시안 배당체의 종류로는 크게 Amygdalin, Prunasin, Dhurrin, Linama-

rin, Lotaustralin, Taxiphyllin 6가지 종류가 있다(JECFA, 1993). 이들 물질은 식품섭취과정까지 식품에 잔류하여 체내에서 분해 되면서 시안화물을 생성하면서 체내에서 독성작용을 일으키게 된다. 직접 독원으로 작용하는 시안산(HCN)은 시안 배당체 분해율에 의해 발생 정도가 좌우된다. 따라서 분해 정도에 따라 체내 독성을 추정할 수 있으므로 HCN 발생 정도를 측정하는 것은 중요하다. Amygdalin은 앞서 언급한 바와 같이 다수 식품에 가장 널리 함유되어 있는 시안 배당체이므로 측정하기 위한 표준물질로 선택 하였다.

시안 배당체 중 유일하게 이당류의 구조를 가진 amygdalin은 two-stage sequential mechanism을 통해서 중간체인 prunasin을 거쳐 분해 된 후 재 분해되어 시안화물을 생성한다(Rauws *et al.*, 1982). 단계별로 살펴보면, 첫 단계에서는 amygdalin에서 prunasin로 분해가 이루어지며 두 번째 단계는 prunasin에서 cyanohydrin으로 가수분해되어 시안이온을 발생시킨다(Lei *et al.*, 1999).

섭취된 Amygdalin은 대부분 장내에서 장내 점막세포 밖에 존재하며 체내 흡수된 물질은 후 대략 90% 정도로

Correspondence to: Hoonjeong Kwon, Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
E-mail: hjkwon@snu.ac.kr

사구체 여과를 통해서 제거가 되며 부가적으로는 간세포에 의해서 배설이 이루어 진다(Rauws *et al.*, 1982).

흡수되지 않고 장내에 남아있는 amygdalin은 시안 배당체를 섭취 소화한 생물의 장내 미생물에 의해 주되게 가수분해가 일어난다(Carter *et al.*, 1980). Amygdalin이 첫 단계에서 분해된 후 생성되는 prunasin과 같은 단당류 형태의 배당체는 장세포에서 transfer mechanism에 의해 흡수가 되며 amygdalin과 같은 이당류들은 brush border에 있는 글루코시다아제 효소의 가수분해 작용이 있을 후에 흡수가 된다고 알려져 있다(Miller *et al.*, 1963). 이당체 분해 기전 중 단당류로 brush border의 글루코시다아제에 의해 분해되는 것을 'first pass' 효과라 한다. 그러나 'first pass' 기전에 의해 생긴 prunasin은 체내에서 변화되지 않고 소변으로 배설이 된다(Rauws *et al.*, 1982). Amygdalin 자체로는 소화기관에 감지될 만한 양으로 흡수가 되지 못하며 Amygdalin이 다른 시안 배당체인 prunasin으로 분해가 되면 장내 흡수가 소량 이루어 진다. 이후 공장 상단부에서도 amygdalin이 prunasin으로의 분해가 이루어 지며(Rauws *et al.*, 1982), 회장 말기에 혐기성 세균에 의해 amygdalin에서 시안이온으로 분해가 이루어져서 체내에서 독성을 나타낼 수 있다고 할 수 있다.

현재 우리나라에서는 식용 및 약용으로 시안 배당체가 함유된 식물을 섭취하고 있어, 체내에서 시안 배당체의 분해율을 모사 분석하여, 이들의 섭취가 인체에 미치는 영향을 평가할 필요가 대두되고 있다. 본 연구는 시안 배당체의 일종인 amygdalin을 가지고 *in vitro* 상황에서 산과 효소, 체내 혐기균에 따른 분해율을 측정하기 위해 실시되었으며, 다양한 시안 배당체를 함유한 식품의 섭취에 대한 기초 독성자료를 확보하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

위액 산 범위에서 amygdalin 분해율 측정. 150 mM Amygdalin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 저장 용액과 10 N 염산용액으로 필요한 amygdalin 농도와 pH의 용액을 만들고, KCl을 이용하여 이온세기를 0.2 N로 고정하여 5시간 동안 37°C water bath에서 배양하였다. 반응 시킨 후 ice-cold 10 M NaOH로 중화 시켰으며, 이 과정에서 acetone cyanohydrin이 시안이온으로 변하도록 10분 동안 반응을 지속시켰다. 여기서 1 ml 시료를 채취해서 발색 반응을 시켰다. 채취한 1 ml에 2 ml의 0.2 M acetate buffer(pH 5.0)을 집어 넣었다. 0.4 ml chloramines-T(0.5% w/v) 용액을 첨가하고, 5분간 실온에서 반응시킨 후 증류수 40 ml에 isonicotinic acid 0.85 g

과 barbituric acid 0.90 g으로 만들어진 1.6 ml의 isonicotinic acid(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)/barbituric acid(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) reagent(이후 pH 11로 5 M NaOH로 맞추었다.)를 넣었다. 이후 60분 후에 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 1 ml 시료 + 7 ml buffer + 2 ml 물의 혼합액에서 1 ml을 채취하여 사용하였다.

HPLC 정량 시험. HP 1090series HPLC, 컬럼은 Waters C18(250*4.6 mm, 5 μ m) 컬럼을 이용하여, 유속 1.3 ml/min, 주입량 20 μ l, 용매는 acetonitrile : water (20 : 80)를 일정하게 흘리며 218 nm에서 흡광도를 측정하여 amygdalin을 분석하였다.

In vitro digestion assay. 이 시험법은 2001년 Ferruzzi *et al.*에 의해서 디자인 된 simulated gastric & small intestinal digestion 모사법을 이용하였다. 먼저 소화단계에서 위에서 소화과정을 모사하기 위해 porcine pepsin(3 mg/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)을 각각 50, 100 mM amygdalin에 첨가가 되었다. 그리고 이어서 각 시료들의 pH를 낮추어주기 위해서 0.1 M HCl(Analytical grade, sigma Chemical Co.)을 첨가하여 pH 2.0으로 조절하였다. 한 시간 shaking water bath (VWR, Cornelius, OR)에서 150 rpm으로 교반하며 37°C에서 반응시킨 후 이 후 colorimetric method에 따라 cyanide 생성량을 측정하였다.

β -glucosidase를 이용한 Amygdalin 분해율 측정. Colorimetric assay가 amygdalin에 대한 β -glucosidase (Fluka, from almonds) 활성을 측정하는데 사용되었다. 먼저 효소의 3, 30 Unit 별로 buffer solution에 준비하였다. 22.87 mg Amygdalin(MW 457.43)을 100 ml 0.2 M acetate buffer solution에 녹여서 0.5 mM 농도로 Amygdalin 시료를 준비했다. 먼저 에펜도르프 tube를 준비한 후 먼저 25 μ l 효소액을 첨가했다. 이후 100 μ l 66 mM phosphate buffer(pH 6.0)이 첨가 되었다. 이후 25 μ l 0.5 mM amygdalin 용액(66 mM buffer 사용)이 첨가 되었다. 37°C에서 3, 5, 8, 12, 15분 나누어서 반응을 시켰다. 이후 찬 얼음물에 튜브를 집어 넣어서 반응을 중단 시켰다. 그리고 150 μ l 0.2 M NaOH가 첨가 되었다. 5분간 방치한 후 700 μ l phosphate buffer(pH 6.0)와 25 μ l chloramines t 시약(1% w/v)이 첨가되었다. 이후 5분 후 150 μ l 발색시약이 첨가되었고 15분 뒤 96 well에 200 μ l씩 분주한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

BL 배지 사용 장내 혐기균에 의한 amygdalin 분해를 측정. 분변의 수집 과정은 채취된 습윤분변은 50% glycerol과 2:1의 비로 혼합하여 cryogenic vial(corning, NY, USA) 1.8 ml에 담겨 곧 -4°C에서 저온 보관이 이루어 졌다. 대장내의 존재하는 혐기균을 이용하기 위해 분변을 시료로 사용하였다. 분변을 받은 즉시 0°C의 10% skim milk와 0.05% L-cystein으로 구성된 혐기성 희석 용액에 넣어 희석법(dilution method)를 이용해서 십진법으로 두 차례(100^{-1}) 희석하였다(Ji *et al.*, 1992). 여러 차례 희석한 후 400 μ l를 따서 8 ml cap-tube에 제조한 혐기균 특이적인 BL 배지를 가득 채워서 배양시켰다. 이는 사람 분변에 호기성 균과 혐기성 균이 공존 함으로 약간의 산소는 호기성 균의 대사로 금방 소멸되기 때문에 잔존한 산소에 의한 영향은 무시하였다(Ji *et al.*, 1992). 이후 발효 용기(Becton dickinson microbiology systems, Cockeysville, USA) 안에 넣어서 시간대 별로 3, 6, 9, 12, 24, 36시간 별로 amygdalin 분해 정도를 colorimetric assay를 통해서 측정하였다.

세포를 파쇄한 분획, 배양 상층액, 배양액과 세포 전체에 따른 Amygdalin 분해율을 알기 위해 아래와 같은 시험이 실시 되었다. 각 Sample을 8 ml BL 배지에 2.5% 접종을 하였다. 24시간 후 이를 1000 g에서 10분간 저속 원심분리를 실시하였으며 원심분리 후 세포를 파쇄한 분획, 배양 상층액, 배양액과 세포 전체로 분리한 후 시험을 진행하였다. 배양액과 세포 전체를 잘 혼합시킨 후 시료가 채취되었다. 원심분리 후 세포를 파쇄한 분획의 경우 원심분리 후 상등액을 전부 제한 뒤 상등액 분량의 66 Mm phosphate buffer를 넣어주고 sonicator로 얼음물 위에서 총 20분간 1초 파쇄, 1초 정지 순으로 총 균을 파쇄해 얻어졌다. 배양 상층액은 원심분리 후 채취되었다. 이와 같이 채취된 각 시료들은 β -glucosidase 효소 시험법에 따라 amygdalin 분해율이 측정되었다.

Anaerobic buffer사용하여 사람 분변(Human feces)에 따른 amygdalin 분해를 측정(Fecal slurry method). 시험 물질인 분변은 20~30세 한국인 남녀 각각 6명 7명을 대상으로 채취되었다. 본 연구에서 사용한 시험법은 inoculum size, media의 종류, anaerobic conditions, buffer의 선택, 혼합비율(mixing rate), 시료 채취 시간(sampling time)에 있어 기존 연구방법을 보완한 Edwards *et al.*에 의해 개발된 연구기법을 사용하였다. 혼합된 각 시료 250 ml에서 이물질을 제거하기 위해 mesh(대한과학, 표준망체, 38 μ m)에 통과시켰다. 통과된 5 ml의 현탁액은 유리 병에 분주 되었다. 각 bottle에는 기질(amygdalin) 100 mg과 anaerobic phosphate buffer가 320 g

liter¹의 비율로 넣어졌으며, Blank로 쓰기 위한 bottle에도 5 ml의 anaerobic sodium phosphate buffer가 넣어 졌다. 각 bottle은 37°C, 수평인 상태로 분당 50회의 흔들림으로 water bath에서 2, 5, 8, 12, 15, 24 각 시간대 별로 배양 되었다. 최종적으로 각 시간별로 꺼내져서 2 ml은 pH측정을 위해 사용하였고 나머지는 시안이온 정량시험에 사용하였다. 시안이온 정량 실험은 König reaction에 기반을 둔 비색법이 사용되었다.

통계처리. 실험결과는 평균 \pm 표준편차 나타내었고 SAS/STAT(SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) 통계처리용 프로그램으로 계산 하였고 유의성 검증은 Student's *t*-test로 실시하였으며 유의도는 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

본 연구에서는 시안 배당체의 분해를 산, 효소, 장내 혐기균을 이용해 살펴보고 그 결과는 다음과 같다.

위액범위 pH에 따른 amygdalin 분해. 위액 범위인 pH 1~3 범위로 온도는 인체 온도인 37°C에서 3, 5, 24 시간 동안 반응시켰을 때 5시간이 지나면 더 이상의 분해율의 커다란 변화가 나타나지 않았으므로 이후 산도에 의한 분해율 실험은 반응시간을 5시간으로 고정하여 실시하였다. 위액(pH 1~3)의 산도 범위에서 실험하였을 때 amygdalin 으로부터 시안이온 생성률은 pH 1.06에서 최대 0.196 \pm 0.0017%로 매우 낮게 관찰되었다(Table 1). pH 0.8에서는 분해율이 매우 낮아 측정 범위 이하 였으며 amygdalin이 안정한 상태로 존재하는 것을 알 수 있다.

이와 같은 결과는 HPLC 시험에 의해 다시금 재확인 되어, pH 1.06 범위의 산에서 동일한 조건으로 반응시킨 amygdalin의 잔존률은 99.96%로 유사한 결과를 보여주고 있다.

인체 섭취 후 대사과정을 모사한 실험인 *in vitro* digestion assay 중 위(stomach)에 해당하는 부분만을 실시하였다. 산의 농도를 pH 2로 고정시킨 *in vitro* digestion assay에서 amygdalin 농도별로 분해율은 0.04 \pm 0.001%로 농도와 관계없이 동일한 분해율 수치가 나왔으며 앞서 진행한 위액의 산 범위에서 실시한 시험과 유사한 결과를 보여주고 있다.

β -Glucosidase에 의한 Amygdalin 분해. 아몬드 β -glucosidase를 이용했을 때 당이 떨어져 나가는 반응은 최대 15분 안에 종료가 됨을 볼 수 있으며, 단 시간에 효소에 의해 amygdalin에서 당이 제거 되어 시안이 발생하는 것이 관찰되었다.

Table 1. Amount of cyanide generated from amygdalin in various concentration and pH

Conc. of amygdalin	pH								
	0.8	1.06	1.37	1.76	2.17	2.59	2.87	3.19	
10 mM	N.D. ^a	0.151 ^b ± 0.0030	0.042 ± 0.0005	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
20 mM	N.D.	0.180 ± 0.0027	0.042 ± 0.0028	0.037 ± 0.0005	0.012 ± 0.0007	0.011 ± 0.0012	0.011 ± 0.0015	N.D.	
50 mM	N.D.	0.194 ± 0.0019	0.036 ± 0.0010	0.044 ± 0.0018	0.020 ± 0.0002	0.016 ± 0.0002	0.014 ± 0.0005	0.014 ± 0.0006	
80 mM	N.D.	0.196 ± 0.0017	0.048 ± 0.0009	0.043 ± 0.0006	0.015 ± 0.0002	0.019 ± 0.0005	0.018 ± 0.0011	0.021 ± 0.0006	
100 mM	N.D.	0.179 ± 0.0028	0.057 ± 0.0006	0.047 ± 0.0015	0.016 ± 0.0002	0.015 ± 0.0006	0.016 ± 0.0005	0.017 ± 0.0011	
150 mM	N.D.	0.155 ± 0.0028	0.047 ± 0.0005	0.035 ± 0.0005	0.012 ± 0.0005	0.015 ± 0.0012	0.010 ± 0.0015	0.018 ± 0.0014	

^aN.D.: Not Detected.

^bValues represents mean ± SD from triplicate.

BL 배지를 이용한 장내 혐기균에 의한 amygdalin의 분해정도. 장내 혐기균총을 BL 비선택 혐기성 broth에서 배양하였으며 이를 이용하여 cyanide 생성률을 측정하였을 때 성인남성의 장내 혐기균에 의해 $39.5 \pm 0.89\%$ 까지 amygdalin이 분해되는 것으로 나타났다. 시간별로 생장율을 측정한 결과는 12시간이 되면 배지에서 혐기균의 생장이 최대에 달아 12시간 배양을 실시하였다. 분비된 효소와 세포내 효소에 의한 분해율의 차이를 보기 위해 세포를 파쇄 분획한 시료와 배양 상층액, 총 배양액을 각각 amygdalin과 반응시켰을 때 총 배양액에서 amygdalin의 분해율이 가장 높으나, 분비된 효소보다는 세포내의

효소에 의한 분해율이 높은 것으로 나타났다(Table 2).

인체의 분변을 이용한 amygdalin의 분해. 20대 성인 남녀 각각 6명과 7명을 대상으로 분변을 채취하여 시험을

Table 3. Cyanide generated from amygdalin degradation by β -glucosidase

Time (min)	3	5	8	12	15
Cyanide generation	89.54 ± 0.71	88.88 ± 1.44	96.81 ± 0.39	98.84 ± 0.84	98.55 ± 0.90

*Values represents mean ± SD from triplicate.

Table 2. Degradation of Amygdalin by anaerobic cultured microbes from human feces

	Cell extract (%)	Supernatant	Incubation mixture
Subject 1	31.7	23.1	34.9
Subject 2	29.3	24.5	34.4
Subject 3	29.3	16.7	38.3
Subject 4	29.1	23.5	36.5
Subject 5	28.5	19.6	36.9
Mean	29.58 ± 1.23	21.48 ± 3.25	36.2 ± 1.57

*Values represents mean ± SD from triplicate.

Table 4. Cyanide generation from amygdalin by Fecal slurry method

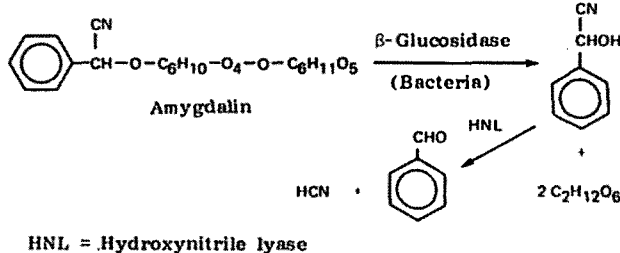
Time (hr)	2	4	6	11	19	24
Cyanide generation (%)	27.12 ± 0.63	31.38 ± 0.50	31.63 ± 0.37	29.19 ± 0.51	31.70 ± 0.25	31.78 ± 0.38

*Values are mean ± SD from 3 replicates.

Table 5. Cyanide generation from amygdalin by Fecal slurry method

	Male	Female
Subject 1	$31.52 \pm 0.66^*$	8.59 ± 0.31
Subject 2	41.53 ± 0.87	14.99 ± 0.29
Subject 3	36.23 ± 0.35	17.24 ± 0.41
Subject 4	38.35 ± 0.46	14.50 ± 0.53
Subject 5	35.89 ± 0.54	11.34 ± 0.34
Subject 6	36.78 ± 0.68	14.45 ± 0.43
Subject 7		12.33 ± 0.53

*Cyanide generation of amygdalin after 12 hr incubation by Fecal slurry method. Values are mean ± SD from 3 replicates. The statistical difference between the male group and female group was analyzed by Student *t*-test at 0.05 level of significance.

**Fig. 1.** Amygdalin decomposition mechanism (Jose, 1988).

실시하였다. 시간에 따른 25세 성인남자의 분변을 가지고 시간대 별로 현탁액을 꺼내어 시료를 넣고 분해율을 측정 한 결과에서 배양한지 4시간이 되면 최대의 분해율을 보이는 것으로 나타났으며 이후 지속적으로 유사한 분해율을 나타냈다(Table 4). 성인 남녀간의 장내 균에 의한 분해율의 차이가 커 여성인 경우에는 남성 그룹에 비해 절반 이하의 시안이온 생성률을 보였다(Table 3).

고 찰

이번 연구에서는 산 또는 장내 환경에 따른 시안 배당체의 분해를 살펴 보는 것을 주요한 목적으로 한다. 주로 체내 섭취 시 분해가 이루어지는 분해효과에 대해 살펴보기 위해 온도에 대한 조건은 최대한 사람 온도범위에 유사한 37°C를 유지하였다.

산분해 실험은 인체 위액 범위(pH 1~3)에서 이루어 졌으며 여기에서 얻어진 결과를 살펴보면 전체적으로 최대 0.2% 미만의 수치를 나타내는 것으로 나타났다(Table 1). 이는 HPLC 정량을 통해 재확인 되었으며 cassava에서 시안 배당체 제거에 관한 선행연구에서도 유사한 결과를 제시하고 있다. Cassava 자가발효 과정에서 발생하는 lactic acid로 인한 급속한 pH 감소가 발효과정에서 cyanohydrin의 분해과정을 억제하는 것으로 나타났고 또한 pH가 감소하는 과정에서 오히려 안정성이 증가한다고 보고하고 있다(Cooke, 1978).

감소하는 pH에 따라 acetone cyanohydrin(in sodium phosphate buffer) 증가하는 안정성 결과를 살펴보면 pH가 4~5인 범위에서 30°C에서 60분 가열로 10%의 acetone cyanohydrin이 HCN으로 분해가 이루어진 것에 반해 pH 6에서는 75%가 분해되었고 pH 8에서는 90%가 분해가 이루어진 것을 제시하고 있다(Vasconcelos *et al.*, 1990). 다른 선행연구에서는 cassava의 대표적인 시안 배당체인 linamarin이 희석된 산에서 100°C에서도 안정된 것을 보여주었다(Wood *et al.*, 1966). 본 실험에서는 분해되지 않은 amygdalin이 HPLC로 확인되고 있어, 산분해로 생성된 cyanohydrin이 낮은 pH에 의해 안정화 되었다기 보다는 위액 수준의 낮은 pH 범위에서 매우 안정하다고 판단할 수 있다. 이는 아몬드, 죽순, 행인, 도인 등과 같은 식품에 함유된 시안 배당체가 체내에 섭취되었을 때, 우선적으로 위산의 영향을 받게 되는데 여기서 제시해주는 것은 체내 산에 의한 분해작용이 거의 일어나지 않음을 제시한다.

앞서 얻은 결론에서 체내에서 시안 배당체가 분해되어 독성을 나타내는데 가장 큰 영향을 주는 것은 바로 장내 미생물과 체내 장내 점막세포에서 각각 분비되는 β -glu-

cosidase와 각종 효소의 작용에 의한 것이라 추정할 수 있다. 특히 β -glucosidase은 체내 온도와 pH범위에서 amygdalin의 가수분해를 촉진할 수 있다고 알려졌다(Syrgos *et al.*, 1998). 시안 배당체를 함유한 식물체에 대한 자발적인 혹은 인공적인 발효가 시안이온 제거에 미치는 작용은 시안 배당체를 함유한 식물체에 있어 두 가지 단계로 발효가 일어나게 된다. 첫 번째 단계에서 미생물체에 의해 식물 세포벽이 붕괴, 연화된다. 두 번째 단계에서는 미생물에 의한 발효가 일어나게 되는데(Ayernor *et al.*, 1985), 체내에서는 저작, 소화 과정을 거치는 동안 세포에서 추출된 배당체가 장내 균총의 발효 대상이 될 것으로 사료된다.

선행연구에서 균에 의한 분해 효과에 대해 살펴보면, 시안 배당체를 함유한 cassava에 대한 *Brevibacterium* sp. R132를 사용한 detoxification 과정에서 70~80%의 total cyanide가 *Brevibacterium*을 통해서 제거 되었다는 결과가 나왔다(Legras *et al.*, 1990). 또한 *Lactobacillus* sp. *Streptococcus* sp., *Corynebacterium* sp., yeast를 함유한 혼합된 접종물을 cassava 껍질과 발효 시킨 대한 연구 결과를 보면 시안이온을 많이 함유한 종에 대한 72시간 발효 실험에서 전체 cyanide 총량 중 59%가 감소한 결과를 보여주었다(Padmaja *et al.*, 1993).

장내 균주에 의한 작용을 보기위해 BL 배지를 이용하여 혐기성균을 배양한 것과 직접 희석한 것으로 amygdalin의 분해율을 측정했다. BL 혐기성균 배양액을 이용한 실험의 경우는 배양 후 24시간, 균 수가 $1.2 \times 10^{10} \sim 1.04 \times 10^{11}$ CFU/ml 되었을 때 실험을 실시하였는데 분해되어 시안이온을 생성하는 비율은 $39.5 \pm 0.89\%$ 로 최대 값을 나타냈다. 다른 시안 배당체의 또 다른 종류인 linamarin의 경우, 장내 미생물(*E. coli*, *S. faecalis*)에 의해 체내에서 대략 14~27%까지 가수 분해가 이루어진다는 보고보다 높은 분해율을 보이고 있다(Fomunyan *et al.*, 1984).

이번 연구는 전반적으로 amygdalin의 체내 흡수에 대한 기작을 체내 GI tract를 가정한 다양한 환경과 조건을 만들어 주고 이에 따른 시안 배당체, 이당체인 amygdalin의 체내 분해 흡수 형태를 *in vitro* 상황에서 파악하고자 했으나 여러 가지 방법들에는 몇 가지 한계점이 따르게 된다. 이는 체내 균총은 개인에 따라 구성, 수, 활성에 커다란 차이를 보인다. 이는 성별, 개인적 식습관, 장내 pH, redox potential, 장내 균주 간에 상호작용 효과가 차이를 나타내기 때문이다.

특히 소장 이후 대장의 혐기성균에 의한 분해 실험은 체내 총 혐기균의 채취로 이루어 지는데 채취하는 체내 총 혐기균은 genus 별로 BL 배지에서 자라는 특성이 달라 잘 자라는 하나의 genus가 지속적인 배양에서 주 되

게 자라게 되어 장내와 같이 다양한 균들의 복합적 구성을 만들어 낼 수 없다. 그리고 이 외에도 체내 균주는 먹는 식이에 의해서도 자라는 균 수와 genus가 다르기 때문에 균일한 형태의 균총을 지속적으로 얻을 수 없다. 이는 개인, 남녀에 의한 분해율 차이의 원인일 것으로 생각된다. 사람 분변을 회석하여 분해율을 측정하는 시험의 경우는 위와 같이 하나의 특정 균총만 가지고 실험을 수행하는 단점을 극복하였다고 생각된다. 또한 개인차를 고려하여 시험을 수행함으로써 BL 배지를 가지고 시험한 것보다 제한점이 적을 것으로 사료된다. 그러나 이도 시험과정에서 외부 공기내 산소에 의해 혐기성 균이 소멸될 수 밖에 없는 제한점이 존재한다.

그러나 본 연구로 미루어 본다면 식용·약용으로 섭취한 시안 배당체가 위액을 통과할 때는 상대적으로 안정하나, 대장내에서 30% 이상 분해되어 시안 이온을 생성할 가능성이 있는 것으로 나타나 이를 식물의 섭취에 대한 주위와 관리가 요구된다고 하겠다.

참고문헌

- 지근역. 한국인 유아의 장내 세균 분포 (1992). 산업 미생물학회 특별강연. pp. 101-114. 1992년 춘계학술 발표대회 초록집.
- Adiotomre, J., Eastwood, M.A., Edwards, C.A. and Brydon, W.G. (1990). Dietary fiber: *In vitro* methods that anticipate nutrition and metabolic activity in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, **52**, 128-134.
- Rauws, A.G., Olling, M. and Timmermann, A. (1982). The pharmacokinetics of amygdalin. *Arch. Toxicol.*, **49**, 301.
- Rauws, A.G., Olling, M. and Timmermann, A. (1982). The pharmacokinetics of prunasin, a metabolite of amygdalin. *J. Toxicol.: Clin. Toxicol.*, **19**, 851-856.
- Alexander, L. and Christine, A.E. (2004). Differential fermentation of glucose-based carbohydrates *in vitro* by human faecal bacteria. *Eur. J. Nutr.*, **43**, 183-189.
- Ayernor, G.S. (1985). Effects of the retting of cassava on product yield and cyanide detoxification. *J. Food Sci. Technol.*, **20**, 89.
- Bokanga, M., O'Hair, S.K., Narayanan, K.R. and Steinkraus, K.H. (1988). Cyanide detoxification and nutritional changes during cassava (*Manihot esculenta* Crantz) fermentation. In Proc. VIII Symposium of International Society for Tropical Root Crops. Howler. R.H., Ed., Bangkok, Thailand., 385.
- Bourquin, L.D., Titegemeyer, E.C., Fahey, G.C. and Garleb, K.A. (1993). Fermentation of dietary fibre by human colonic bacteria: disappearance of short chain fatty acid production from and potential holding capacity of various substrates. *Scand. J. Gastroenterol.*, **28**, 249-255.
- Brent, W. (2003). Kinetic analysis of hexose transport to determine the mechanism of amygdalin and prunasin absorption in the intestine. *J. Appl. Toxicol.*, **23**, 371-375.
- Brink, N.G., Kuehl, F.A. and Folkers, K. (1950). Vitamin B12: the identification of vitamin B12 as a cyano-cobalt coordination complex. *Science*, **112**, 354.
- Cooke, R.D. (1978). An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **29**, 345-352.
- Cummings, J.H. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 443-459.
- Cyrille, K., Christle, H., Catherine, P., Martijn, V., Marleen, V.N. and Robert, H. (2002). Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic *in vitro* large-intestinal model. *Carcinogenesis*, **23**, 1009-1016.
- Daly, J., Tomlin, J. and Read, N.W. (1993). The effect of feeding xanthan gum on colonic function in man: correlation with *in vitro* determinant of bacterial breakdown. *Br. J. Nutr.*, **69**, 897-902.
- David Millerm, M.D. and Rover, K.C. (1963). The digestion of Carbohydrates in the small Intestine. *American Journal of Clinical Nutrition*, **12**, 220-227.
- De Bruijn, G.H. (1973). The cyanogenic character of cassava (*Manihot esculenta*). In Chronic Cassava Toxicity (edited by B.L. Nestel & R. MacIntyre), 43-48. Ottawa, Canada: International Development Research Centre.
- Miler, D. (1963). *Am. J. clin. Nutr.*, **12**, 220.
- Edwards, C.A., Gibson, G., Champ, M., Jensen, B.-B., Mathers, J.C., Nagengast, F., Rummey, C. and Quehl, A. (1996). *In vitro* method for quantification of the fermentation of starch by human faecal bacteria. *J. Sci. Food Agric.*, **71**, 209-217.
- Koyama, E., Kitazawa, K., Ohiori, Y., Izawa, O., Kakegawa, K. and Fujuno, A. (2003). *In vitro* metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. Food and chem. *Toxicol.*, **41**, 359-374.
- Espinoza, O.B., Perez, M. and Raminiez, M. (1992). Bitter cassava poisoning in eight children: a case report. *Vet Hum Toxicol.*, **34**, 65-68.
- Gerhard, J.S., Adalert, G. and Rauws, R.E. (1986). Intestinal first pass metabolism of amygdalin in the rat *in vitro*. *Bio. Pharmacol.*, **35**, 2123-2128.
- Halstrom, F. and Moller, K.D. (1945). Content of cyanide in human organs fro, cases of poisoning with cyanide taken by mouth, with contribution to toxicology of cyanides. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **1**, 18.
- Bradbury, J.H. Egan, S.V. (1991). Amalysis of cyanide in cassava using acid hydrolysis of cyanogenic glucosides. *J. Sci. Food Agric.*, **55**, 277-290.
- Bradbury, J.H., Bradbury, M.G. and Sylvia, V.E. (1994). Comparison of methods of amalysis of cyanogens in cassava. *Acta Horticulturae*, **375**, 87-96.
- Ji, G.E. (1994). Composition and distribution of intestinal microbial flora in Korean. *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.*, **22**, 453-458.
- John, H.C., Martha, A. and Mclafferty, P.G. (1980). Role of the gastrointestinal microflora in amygdalin(laetrile)-induced cyanide toxicity. *Bio. Pharmacol.*, **29**, 301-304.
- Jose, M.C. (1988). Food toxicology (part A), Marcel dekker, New York, pp. 74.
- Konstantinos, N.S., Gail, R. and Agamemnon, A.E. (1998). *In*

- in vitro* cytotoxicity following specific activation of amygdalin by β -glucosidase conjugated to a bladder cancer-associated monoclonal antibody. *Int. J. Cancer*, **78**, 712-719.
- Lambert, J.L., Ramasamy, J. and Paukstelis, J.V. (1975). Stable reagents for the colorimetric determination of cyanide by modified König reactions. *Analytical Chemistry*, **47**, 916-918.
- Legras, J.L., Jory, M., Arnaud, M.A. and Galzy, P. (1990). Detoxification of cassava pulp using *Brevibacterium* sp. R312. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, **33**, 529.
- Leon, B. (1998). Amygdalin degradation by *Mucor circinelloides* and *Penicillium aurantiogriseum*: mechanisms of hydrolysis. *Arch. Microbiol.*, **169**, 106-112.
- McBurney, M.I. and Thompson, L.U. (1989). Effect of human faecal donor on *in vitro* fermentation variables. *Scand. J. Gastroenterol.*, **24**, 359-369.
- Meuser, F. and Smolnik, H.D. (1979). Processing of cassava into gari and other food stuffs. *Starch/Starke*, **32**, 116.
- Millingi, N., Poulter, N. and Rosling, H. (1992). An outbreak of acute intoxications from consumption of insufficiently processed cassava in Tanzania. *Nutr. Res.*, **12**, 677-687.
- Mizuma, T., Ohta, K., Hayashi, M. and Awazu, S. (1992). Intestinal active absorption of sugar conjugated compounds by glucose transport system: implication of improvement of poorly absorbable drugs. *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 2037-2039.
- Mortensen, P.B. and Norgaard-Andersen, I. (1993). The dependence of the *in vitro* fermentation of dietary fibre to short chain fatty acids on the contents of soluble mon-starch polysaccharides. *Scand. J. Gastroenterol.*, **2**, 418-422.
- Olusegun, L.O. (1994). Eliminating cyanogens from cassava through processing: technology and tradition. *Acta Horticulturae*, **375**, 163-174.
- Osuntokun, B.O. (1994). Chronic cyanide intoxication of dietary origin and a degenerative neuropathy in Nigerians. *Acta Horticulturae*, **375**, 311-321.
- Oyewole, O.B. (1992). S. A. Effect of processing variables on cassava fermentation for fufu production. *Trop. Sci.*, **32**, 231.
- Padmaja, G., Mathew, G. and Moorthy, S.N. (1991). Enhancement in starch extractability from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) tuber through fermentation with a mixed culture inoculum. *J. Root Crops*, **17**, 1.
- Padmaja, G. (1995). Cyanide detoxification in cassava for food and feed use. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, **35**, 259-339.
- Fomunyam, R.T. (1984). Hydrolysis of linamarin by intestinal bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **30**, 1530-1531.
- Salvador, V., Chernoff, C., Barry, J.-L., Bertrand, D., Bonnet, C. and Delort-Labal, J. (1993). Sugar composition of dietary fibre and short chain fatty acid production during *in vitro* fermentation by human bacteria. *Br. J. Nutr.*, **70**, 189-197.
- Adewusi, S.R.A. (1985). On the metabolism of amygdalin. 2. The distribution of β -glucosidase activity and orally administered amygdalin in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **63**, 1084-1087.
- Strugala, G.J., Rauws, A.G., Elsenhans, B., Rauws, A.G. and Forth, W. (1995). Small-intestinal transfer mechanism of prunasin, the primary metabolite of the cyanogenic glycoside amygdalin. *Hum. Exp. Toxicol.*, **14**, 895-901.
- Sylvester, D.M., Jayton, W.L., Morgan, R.L. and Way, J. (1983). Effects of thiosulfate on cyanide pharmacokinetics in dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **69**, 265.
- Tewe, O.O. (1989). Detoxification of cassava products and effects of residual toxins on consuming animals. In Proc. FAO Expert Consultation Meeting on Roots, Tubers, Plantains and Bananas, 81.
- Vesey, C.J. and Wilson, J. (1978). Red cell cyanide. *J. Pharm. Pharmacol.*, **30**, 20-26.
- Weaver, G.A., Krauser, J.A., Miller, T.L. and Wolin, M.J. (1989). Constancy of glucose and starch fermentations by two different human faecal microbial communities. *Gut*, **30**, 19-25.
- Majak, W., McDiarmid, R.E. and Hall, J.W. (1990). Factors that determine rates of cyanogenesis in bovine ruminal fluid *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, **68**, 1648-1655.
- Wood, J.L. and Cooley, S.L. (1956). Detoxification of cyanide by cystine. *J. Biol. Chem.*, **218**, 449-457.
- Wood, T. (1966). The isolation, properties and enzymic breakdown of linamarin from cassava. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **17**, 85-90.