

4종의 발효균주가 당귀의 nodakenin과 decursin의 함량에 미치는 변화

박진한², 정지욱³, 권기태⁴, 서민준², 서은경⁵, 박용기⁶, 이제현^{1*}

1 : 경희대학교 약학대학 2 : 경주대학교 한약개발학과 3 : 대구한의과대학교 한약재약리학과 4 : 식품의약품안전청 한약정책과 5 : 이화여자대학교 약학대학 6 : 동국대학교 한방신약개발센터

Nodakenin and Decursin Contents of Fermented *Angelicae Gigantis Radix* by 4 Species Strain

Jin-Han Park², Ji-Wook Jung³, Kee-Tae Kweon⁴, Min-Jun Seo², Eun-Kyoung Seo⁵, Yong-Ki Park⁶, Je-Hyun Lee^{1*}

1 : College of Pharmacy, Kyunghee University, 2 : Dept. of Medicinal Herb Development, Gyeongju University, 3 : Dept. of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University, 4 : Herbal Medicine Policy Division, Korea Food & Drug Administration, 5 : College of Pharmacy, Ehwa Womans University, 6 : Korean Medicine R&D Center, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the nodakenin and decursin contents in each fermented *Angelicae gigantis Radix* by 4 species of ferment strains.

Methods : The strains of fermented *Angelicae gigantis Radix* were *Lactobacillus plantarum*(SE1), *L. acidophilus*(AC), *Bacillus subtilis*(B2) and *B. licheniformis*(BL2). The fermentative changes of nodakenin and decursin were analyzed using HPLC.

Results : All of 4 species strains reduced nodakenin and decursin concentration in *Angelicae gigantis Radix* by fermentation. But fermentability were difference between strains. The nodakenin concentration of AC was lower than B2. The decursin concentrations of SE1 and AC were lower than B2 and BL2.

Conclusions : 4 species of fermental strain were difference decomposable rate with nodakenin and decursin in fermented *Angelicae gigantis Radix*.

Key words : *Angelicae gigantis Radix*, *Angelica gigas*, decursin, nodakenin, Fermentation

서론

최근 한의학 시장변화와 새로운 제형의 필요에 따라 발효(fermentation)에 대한 관심과 연구가 활발히 이루어지고 있다. 발효는 동서양을 막론하고 오랫동안 우리의 식생활과 밀접한 관계있는 가공 방법으로 김치, 치즈, 막걸리 등이 대표적이며 발효식품이 가지는 독특한 풍미와 함께 식생활의 다양화로 그 수요는 날로 증가 추세에 있다. 발효는 식품 뿐 아니라 한약에 일정한 처리를 거친 후 일정 온도와 습도의 조건하에서 곰팡이와 효소의 분해 작용에 의해 약물을 발효시키는 전통적인 炮製 방법의 하나로 醱酵法을 사용하고 있다.¹⁻²⁾ 발효와 관련한 한약재로는 淡豆豉, 蕪荑, 神麴, 半夏麴, 紅麴 등이 있으며^{1,3-4)}, 최근에는 艾葉, 厚朴, 魚腥草, 瓊玉膏 등과

같이 단미 혹은 복합 한약에 발효 방법을 이용하여 원래 한약이 가지고 있는 약리 작용에 부가하여 기존의 약리 작용을 높이는 가능성을 부여하려는 연구가 많이 행해지고 있다.⁵⁻⁹⁾

當歸는 『神農本草經』¹⁰⁾의 中品에味甘溫 主治欬逆上氣 溫瘧寒熱洗 在皮膚中 婦人漏下絕子 諸惡瘡瘍金瘡 煮飲之라 하여 최초로 수재되었으며, 『名醫別錄』¹¹⁾에味辛大溫 無毒 主溫中止痛 除咯血內塞 中風瘧 汗不出 濕痺 中惡 客氣虛冷 補五臟 生肌肉으로 수록된 이래로 補血和血 調經止痛 潤燥滑腸의 효능으로 한의학입상에서 널리 사용하고 있다¹⁾.

當歸는 국가에 따라 약전에 규정하고 있는 기원식물이 차이가 있어 우리나라¹²⁾는 참당귀 *Angelica gigas*로 규정하고 있으나, 중국¹³⁾은 *A. sinensis*, 일본¹⁴⁾은 *A. acutiloba*로 자국의 약전에 규정하고 있어 기원식물의 논란이 있다.

*교신저자 : 이제현. 경상북도 경주시 석장동 동국대학교 한의과대학 한의학연구소.
· Tel : 054-770-2835, · E-mail : leejh@dongguk.ac.kr
· 접수 : 2010년 11월 10일 · 수정 : 2010년 12월 3일 · 채택 : 2010년 12월 15일

참당귀의 성분으로는 pyranocoumarin계의 decursin, decursinol, decursinol angelate, furanocoumarin계의 nodakenin, isoimperatorin, marmesin, xanthoarnol 을 주요성분으로 함유하고 있다.¹⁵⁾ 특히 대한약전은 當歸의 규격으로 nodakenin과 총 decursin (decursin과 decursin angelate의 합)의 합계 함유량 6.0 % 이상으로 규정하고 있다.¹²⁾

이에 저자는 대한약전에 규정된 當歸(*Angelica gigas*)를 실험재료로 식품의 발효균주로 흔히 사용되는 유산균인 *Lactobacillus plantarum*(SE1)과 *L. acidophilus*(AC)의 2종과 청국균인 *Bacillus subtilis*(B2)와 *B. licheniformis*(BL2)의 2종으로 각각 발효시킨 當歸에 대하여 발효균주가 지표성분인 nodakenin과 decursin의 함량의 변화에 미치는 영향을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

실험에서 사용한 시료는 동우당제약(Korea)에서 제조하였다. 강원도 정선에서 재배한 당귀를 10~15 mesh로 분쇄하여 발효하였다. 발효 균주는 유산균으로 *Lactobacillus plantarum*(SE1)과 *L. acidophilus*(AC)를 사용하였으며, 청국균으로 *Bacillus subtilis*(B2)와 *B. licheniformis*(BL2)을 사용하여 각각 발효하였다. 발효는 발효 균주를 당귀에 접종하여 incubator에서 37° C로 48시간 배양한 후 roasting기(태환자동화기기, THDRE-20, Korea)를 사용하여 250° C로 10~15분 roasting하였다. 발효의 확인은 48시간 배양한 시료에서 총균수를 측정하여 발효를 확인한 후 분석에 사용하였다.

2. 시약 및 기기

시료의 분석 및 정량에 사용한 nodakenin은 Wako Co.(Japan)의 표준품을 사용하였으며, decursin 표준품은 이화여자대학교 서은경교수로부터 분리 정제한 것을 제공받았다. HPLC에 사용한 시약은 acetonitrile(ACN)과 물은 J.T. Baker Chemical Co.(USA)의 HPLC grade를 사용하였으며, 기타 시약은 특급 이상의 제품을 사용하였다.

분석에 사용한 HPLC system은 DIONEX SUMMIT HPLC system(Germany)으로 P680 HPLC pump, ASI-100 automated sample injector, Thermostatted column compartment TCC-100, UVD 340U UV/VIS-detector와 CHROMELEON chromatography data system(version 6.40)으로 구성되어 있다.

3. HPLC 분석조건

표준품 및 시료의 nodakenin과 decursin의 정량은 HPLC를 사용하였다. HPLC 분석은 column은 Luna 5u C18 (Phenomenex Co., USA)을 사용하여, 이동상은 acetonitrile과 물을 용매기울기로 하여 1.0 ml/min의 유속에서 주입량은 10 ul, column temp.는 30° C, UV 흡광도 330 nm에서 실험하였다(table 1).

Table 1. HPLC condition for analysis of nodakenin and decursin in *Angelicae gigantis Radix* and its fermentations

Description	Condition		
	min	water	acetonitrile
Gradient mobile phase	15	80	20
	18	70	30
	26	70	30
	38	50	50
	40	10	90
	52	50	50
	54	90	10
	60	90	10
Flow rate	1.0 ml/min		
Inject vol.	10 ul		
Column	Luna 5u C18(2), 250×4,60 mm, Phenomenex (USA)		
Column temp.	30° C		
UV wavelength	330 nm		

4. 검량선 작성

Nodakenin과 decursin을 methanol에 희석하여 각각 50.0 ug/ml와 204.8 ug/ml의 표준액을 제조하였다. 이를 methanol에 희석하여 nodakenin 검액은 50.0, 25.0, 12.5, 6.3, 2.5, 1.3 ug/ml의 농도, decursin은 204.8, 102.4, 51.2, 25.6, 10.2, 5.1 ug/ml의 농도로 조제하여 HPLC로 분석한 후 면적에 대한 농도로 검량선을 작성하였다.

5. 시료의 추출과 분석

당귀 및 발효당귀의 시료는 각각 분말로 분쇄하여 0.2 g을 정확히 취하고 methanol 10 ml을 넣고 24시간 상온에서 추출하였다(n=5). 추출액은 syringe filter(PTFE membrane, 0.2 um, non-sterile, Advantec MFS Inc.)로 여과한 후 검량선의 유효 농도내에서 필요에 따라 희석하여 HPLC로 분석하였다. 정량은 nodakenin과 decursin의 검량선에 대입하여 검액에 함유되어 있는 성분을 계산하였다.

6. 통계처리

실험으로부터 얻은 결과는 평균 ± 표준편차 (mean ± S.D.)로 기록하였고 유의성 검정은 t-test를 사용하여 p값이 0.05 미만인 경우에 유의성으로 인정하였다.

결과 및 고찰

1. HPLC chromatogram과 검량선

Nodakenin과 decursin은 각각 21분과 44분에 검출되었다(Fig. 1).

Nodakenin의 peak 면적에 대한 검량선은 1.3~50 ug/ml의 농도 범위에서 R²=0.9998의 직선성을 나타냈으며, decursin은 5.12~204.8 ug/ml의 농도 범위에서 R² = 0.9999의 직선성을 나타내었다.(Fig. 2)

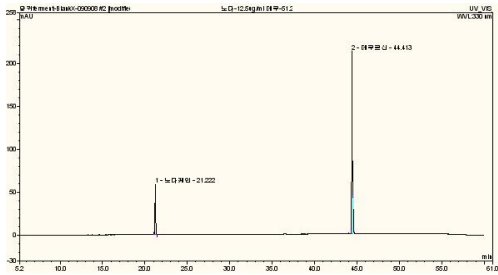


Fig. 1. Representative chromatogram of nodakenin and decursin.

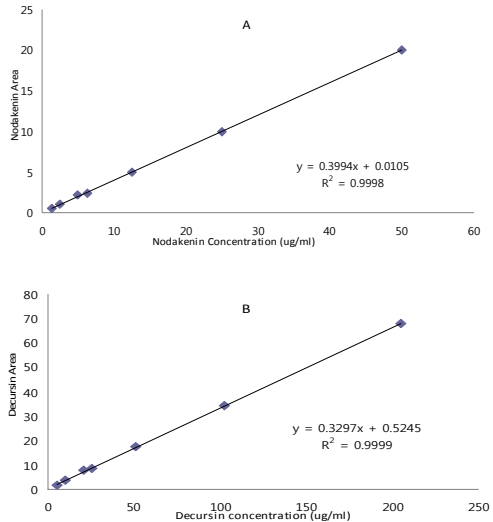


Fig. 2. Calibration curves of nodakenin(A) and decursin(B).

2. 당귀의 발효 균주별 nodakenin 함량

당귀를 발효하기 전의 nodakenin의 함량은 3686.2 ± 214.7 ug/g이었으나, 발효에 따라 대부분 분해되어 함량은 $10.7 \sim 8.3\%$ 로 감소하였다. ($p < 0.001$) 균주에 따라 함량을 비교하면 *B. subtilis*(B2)가 393.4 ± 7.2 ug/g 으로 발효균주 중에서 가장 높은 함량을 나타내었다. ($p < 0.01$, $p < 0.001$) 이는 당귀에 함유된 nodakenin의 분해 능력이 다른 실험균주에 비하여 상대적으로 떨어지는 것으로 나타났다. *B. licheniformis*(BL2)는 329.9 ± 10.1 ug/g, *L. plantarum*(SE1)은 329.0 ± 7.5 ug/g으로 nodakenin의 분해능이 비슷하였으며, *L. acidophilus*(AC)가 307.1 ± 7.5 ug/g으로 가장 많은 분해능을 나타내었다.

이를 보면 실험에 사용한 *Bacillus*속의 균주 2종과 *Lactobacillus*속의 균주 2종 모두 당귀의 발효과정에서 nodakenin의 함량을 감소시키는 것으로 나타났다. 그러나 nodakenin의 분해 정도는 균주별로 차이가 있었으며, *Bacillus*속의 균주가 *Lactobacillus*속의 균주 보다 nodakenin의 발효 분해능이 적은 경향을 나타내었다.

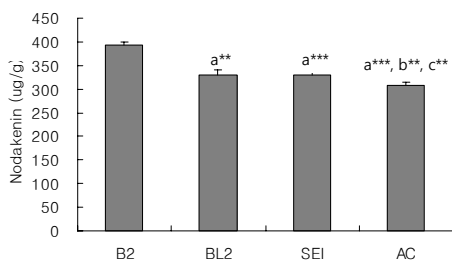


Fig. 3. Nodakenin contents of fermented *Angelica gigantis* Radix. Ferment fungi were *Bacillus subtilis*(B2), *B. licheniformis*(BL2), *Lactobacillus plantarum*(SE1) and *L. acidophilus*(AC). All of fermented groups were significant decreased in nodakenin contents with not fermented (3686.2 ± 214.7 ug/g)($p < 0.001$). ^acompared with B2, ^bcompared with BL2, ^ccompared with SE1. ^a $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$

3. 당귀의 발효 균주별 decursin 함량

당귀를 발효하기 전의 decursin의 함량은 61.74 ± 1.09 mg/g이었으나, 발효에 따라 대부분 분해되어 함량은 $18.8 \sim 22.6\%$ 로 감소하였다. ($p < 0.001$) 균주에 따라 함량을 비교하면 *Bacillus*속의 균주인 *B. subtilis*(B2)가 13.93 ± 0.39 mg/g, *B. licheniformis*(BL2)가 13.76 ± 1.68 mg/g으로 비슷한 함량능을 나타내었으며, *Lactobacillus*속 균주의 *L. plantarum*(SE1)이 11.94 ± 0.45 mg/g, *L. acidophilus*(AC)가 11.01 ± 1.08 mg/g으로 *Bacillus*속의 균주 보다 적은 함량을 나타내었다. ($p < 0.01$, $p < 0.001$)

이를 보면 실험에 사용한 *Bacillus*속의 균주 2종과 *Lactobacillus*속의 균주 2종 모두 당귀의 발효과정에서 decursin의 함량을 감소시키는 것으로 나타났으나, decursin의 분해 정도는 *Bacillus*속의 균주가 *Lactobacillus*속의 균주 보다 발효에 의한 분해능이 적은 것으로 나타났다.

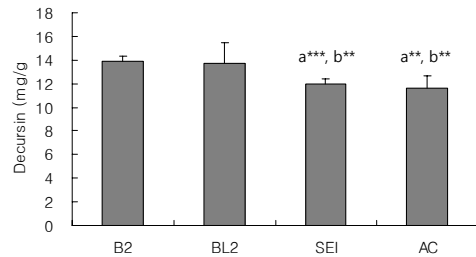


Fig. 4. Decursin contents of fermented *Angelica gigantis* Radix. Ferment fungi were *Bacillus subtilis*(B2), *B. licheniformis*(BL2), *Lactobacillus plantarum*(SE1) and *L. acidophilus*(AC). All of fermented groups were significant decreased in decursin contents with not fermented (61.74 ± 1.09 mg/g)($p < 0.001$). ^acompared with B2, ^bcompared with BL2, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$

결론

당귀를 청국균속의 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*, 유산균속의 *L. plantarum*과 *L. acidophilus*를 사용하여 발효한 후 한약재에 함유된 nodakenin과 decursin의 함량을 측정하여 발효균주에 따른 변화를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*의 균주로 발효한 당귀의 발효물의 nodakenin과 decursin의 함량은 모두 유의성있게 감소하였다.
2. 당귀에 함유된 nodakenin과 decursin의 분해능은 균주에 따라 차이를 나타내었으며, *B. subtilis*가 가장 낮았으며, *L. acidophilus*가 가장 높게 나타났다.

3. 당귀에 함유된 decursin의 분해능은 *Bacillus*속의 균주보다 *Lactobacillus*속의 균주가 높은 것으로 나타났다.

이상과 같은 결과로 미루어 발효한약을 제조함에 있어 발효균주에 따라 각각의 약재의 변화가 다르게 나타날 수 있으며, 따라서 개별 약재의 유의성 있는 발효균주의 개발과 발효특성의 연구가 필요할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구를 통해 당귀의 발효균주에 따른 함유성분의 분해능의 차이를 이용하여 다양한 발효한약의 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2005년도 경희대학교 연구비지원에 의한 결과임.

참고문헌

1. 한의과대학 본초학편집위원회. 본초학. 서울:영림사. 2004:145, 194, 415-6, 427, 632-4.
2. 강병수, 서부일, 최호영. 한약포제와 임상응용. 서울:영림사. 2003:63.
3. 서부일, 이제현, 최호영, 권동렬, 부영민. 임상한약본초학. 서울:영림사. 2006:634.
4. 이시진. 본초강목. 북경:人民衛生出版社. 1978:1547.
5. 한효상, 박완수, 이영중. 애엽발효추출물의 면역활성에 관한 연구. 본초학회지. 2008;23(3):103-12.
6. 이기동, 김정숙, 배재오, 윤형식. 경옥고가미방 효모발효물 함유 한방화장품이 인체 피부 생리에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2007;22(4):227-32.
7. 손미예. 버섯균사체로 발효시킨 복령과 후박의 항산화 및 항암효과. 식품산업과영양. 2007;12(2):51-7.
8. 정용준, 한동오, 최보희, 박철, 이해정, 김성훈. 발효한약 추출물 HP-1이 알코올을 투여한 쥐의 알코올 대사에 미치는 영향. 동의생명리학회지. 2007;21(2):387-91.
9. 자재영, 전병삼, 박정원, 문제철, 조영수. 차가버섯과 어성초 함유 발효 조성물이 인체 위함 AGS 및 대장암 HCT-15세포 생육에 미치는 영향. 한국응용생명화학학회지. 2004;47(2):202-7.
10. 작자미상. 신농본초경. 타이베이:文光圖書有限公司. 1983:140.
11. 도홍경. 명의별록. 북경:인민위생출판사. 1986:112.
12. 식품의약품안전청고시 제2007-89호. 대한약전 제9개정. 2007:916-7.
13. 국가약전편찬위원회. 중화인민공화국약전2005년판 1부. 북경:化學工業出版社. 2005:89.
14. 후생노동성. 일본약국방 제15개정. 2005:1247.
15. 김영중. 당귀의 생리활성 성분의 분리:국가한약재평가기술과학화연구사업단. 한약재평가기술과학화1단계연구사업성과발표회자료집. 서울:국가한약재평가기술과학화연구사업단. 2007:153-5.