J. Appl. Biol. Chem. **53**(2), 91-98 (2010)

Article

약용 식물 발효액(들빛)의 항산화, Angiotensin Converting Enzyme 저해 및 Nitric Oxide 생성 조절 효과

조은경[1] · 갈상완[2] · 최영주*

신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과, [1]바이오식품소재학과, [2]진주산업대학교 미생물공학과

Antioxidative activity and Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory activity of Fermented Medical Plants (DeulBit) and Its Modulatory Effects of Nitric Oxide Production

Eun Kyung Cho[1], Sang-Wan Gal[2], and Young Ju Choi*

Department of Food and Nutrition, College of Medical Life Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea
[1]Department of Bio-Food Materials, College of Medical Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
[2]Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, 150 Chilamdong, Jinju, Korea

Received February 3, 2010; Accepted March 18, 2010

This study was aimed to investigate the contents of flavonoids and the biological activity of fermented beverage of medical plants, DeulBit (DB). 50 g of Cassia semen (*Cassia tora* L.), 50 g of Omija (*Schisandra chinensis* Baillon.), 50 g of Gugija (*Lycium chinense* Mill), 50g of *Menthae herba*, 75 g of *Chrysanthemum indicum* Linne, 25 g of *Dioscorea batatas*, 5 g of *Lindera obtusiloba* Blume, 150 g of *Polygonatum odoratum*, 25 g of *Glycyrrhiza uralensis*, 25 g of *Acanthopanacis cortex*, 100 g of green tea (*Camellia sinensis*), and 100 g of *Laminaria japonica* was fermented with sucrose (50.0~60.0°Brix.) and 0.5% of deep sea water in 10 L of distilled water for six months at room temperature. Total flavonoids contents of DB was calculated to 3.4±0.5 μg/g and antioxidative activity of DB was measured by using DPPH radical scavenging and SOD-like activity. DPPH radical scavenging and SOD-like activity of DB was 96% and 29% at 100% of DB, respectively. In addition, DB indicated about 88% and 66% of the xanthine oxidase and angiotensin converting enzyme inhibitory activities at 1% and 10% of DB, respectively and showed fibrinolytic activity. Nitric oxide (NO) synthesis was increased to 15 times by addition of DB. In addition, NO productions of the macrophages RAW264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS) were reduced to 40.4% by addition of DB. These results suggested that DB is significant role for antioxidative and fibrinolytic activity, and have the strong xanthine oxidase and angiotensin converting enzyme inhibitory activities.

Key words: ACE inhibition, DPPH radical scavenging activity, fibrinolytic activity, flavonoid, nitric oxide

서 론

최근 생활수준의 향상으로 평균수명의 연장과 건강에 대한 관심이 높아지고 식습관에 기인하는 여러 가지 만성질환의 증가로 인해 항산화, 항암, 면역증진 및 혈행개선 등의 생리활성을 갖는 약용식물에 대한 연구가 진행되게 되었다[Lee 등, 2003; Sun과 Tanumihardjo, 2007]. 특히, 한의학 및 민간요법에서 그 효능을 인정받고 있던 생약재가 생체내에서 식균작용을 활성화하고 항체의 생성을 촉진시키는 등 질병에 대한 방어력을 증가시켜 만성질환을 예방하고 치료하는데 효과적인 것으로 알려졌다[Lee 등, 2004]. 따라서, 동서양을 막론하고 생약재에 대한 관심이 높아지고 있으며, 약물로 인한 부작용을 극복하기 위하여 약용식물로부터 생리활성을 가진 물질 검색이 많이 이루어지고 있을 뿐 아니라, 건강음료 개발에 약용식물을 활용하고자 하는 연구가 이루어지고 있다[Kang 등, 1997].

현재 시판되고 있는 건강음료의 종류는 섬유소를 주로 한 변비예방과 정장작용을 돕는 것이거나 체중조절을 위한 것, 체내 수분과 전해질공급을 위한 것이 대부분이며, 아직은 약용식물을 이용한 음료개발에 관한 연구가 일부 영역만을 다루고 있어

*Corresponding author
Phone: +82-51-999-5459; Fax: +82-51-999-6959
E-mail: yjchoi@silla.ac.kr

doi:10.3839/jabc.2010.017

건강기능성 음료로 활용하기 위해서는 앞으로 다각적인 연구가 요구된다. 이에 약용식물이 함유하고 있는 여러 가지 생리활성 물질들을 효소로 활성화시켜 다양한 생화학반응을 일으킴으로 해서 식물체의 성분들이 소화 · 흡수되기 쉬운 형태로 전환될 수 있게 하여 새로운 생리기능을 하는 물질로 변화시키거나 유용성분이 증가한 음료를 개발하는 것이 부각되고 있다. 더욱이 최근 들어 식품의 발효를 통해 생성되는 유기산 및 분해산물들이 건강에 좋다는 연구 결과 등이 발표되면서 발효식품의 인기는 점점 높아지고 있는 실정이다[Ahn 등, 2000; Bae 등, 2002]. 효소를 이용한 식품개발로는 미생물의 활동으로 유기화합물이 분해되면서 알코올, 유기산, 탄산가스 등 분해산물을 생성하는 발효의 과정이 있다. 이는 오래전부터 이용되어 왔는데, 과실 전통발효의 경우가 해당된다. 주로 발효성 당이 다량 함유되어있는 과실을 발효시켜 술로 많이 이용되어 왔는데, 탄수화물원이 부족할 경우에는 발효원료에 설탕, 전분 등 탄수화물원을 첨가하여 발효해왔다[Hong 등, 2006]. 또한, 식물체에는 여러 가지의 효소가 함유되어 있는데 그 효소 자체를 섭취하게 함으로써 체내에서 신진대사 기능을 촉진되게 할 뿐만 아니라 발효시키면서 더 많은 효소들이 활성화 되어 여러 가지 효능효과를 가지게 한다.

따라서 본 연구에서는 문헌 등을 통해 생리활성효과 등이 있다고 알려진 약재들을 혼합하여 발효 시켜서 만든 약초 음료(들빛)의 효능에 대한 객관적 검증을 위해 면역기능 증진 및 혈행개선 효과, 그리고 항산화 효과에 대한 실험을 하고자 하였다.

재료 및 방법

시료. 본 실험에 사용된 실험 재료는 경상남도 거창 농가와 한약재 판매상으로부터 구입하였으며, 증류수 10 L에 결명자 50 g, 오미자 50 g, 구기자 50 g, 박하 50 g, 국화 75 g, 산마 25 g, 생강 5 g, 둥글레 150 g, 감초 25 g, 오가피 25 g, 녹차 100g과 다시마(100 g) 및 미네랄 수(해양성심층수, 0.5%)를 부재료로 첨가하여 당의 농도가 50.0~60.0°Brix가 되도록 설탕시럽을 넣은 후 약 6개월 동안 실온에서 발효시켰다. 이 발효액을 들빛이라 명명하였고, 시료로 사용하기 위해 들빛 발효액은 여과하였으며 4°C에서 냉장 보관하였다. 이 발효액의 pH는 4.9였다.

HPLC 분석. Flavonoids 분석을 위한 표준용액(quercetin, kaempferol, myricetin, apigenin, luteolin 및 rutin)은 1 mg/mL의 농도로 메탄올에 용해시켜 사용하였고, 시료(10 mg/mL)는 메탄올에 용해 한 후 Sea-pak C18 cartridge와 0.2 μm filter로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 분석용 column은 Octadecylsilane(ODS) C18(4.6×25 cm, 5 μm)을 사용하였고, 용매는 MeOH/H_2O/Acetic acid(5/93/2, v/v)와 60% MeOH를 사용하여 linear gradient해서 55분간 용출 시킨 후 15분간은 60% MeOH로서 용출하였다. Total flow rate은 1mL/min로 하였고, detector는 UV 370 nm에서, column temp. oven은 30°C로 하여 Shimadzu LC-10AD으로 분석하였다.

전자공여능(Electron donation ability: EDA) 측정. 전자공여능 측정은 Blois[1958]의 방법에 따라서 각 시료의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정 하였다. 추출시료를 DMSO에 녹여 농도별로 희석하여 시료 40 μL와 1.5 mM DPPH용액 160 μL를 섞은 후, 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 EDA(%)=[(대조구흡광도-시료첨가구흡광도)/대조구흡광도]×100으로 계산하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 흡광도차를 비교하여 프리라디칼의 제거활성을 백분율로 나타내었다.

SOD 유사활성(Superoxide dismutase-like activity: SODA) 측정. 추출물의 SOD 유사활성은 Marklund와 Marklund[1975]의 방법에 따라 과산화수소(H_2O_2)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pylogallol의 산화 정도를 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 각 추출시료를 DMSO에 녹여 농도별로 희석하여, 시료 10 μL에 pH 8.5로 보정한 Tris-HCl buffer(50 mM tris [hydroxymethyl] aminomethane, 10 mM EDTA, pH 8.5) 150 μL와 7.2 mM pyrogallol 10 μL를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 50 μL를 가하여 반응을 정지 시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 ELISA reader를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 추출물 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{SODA}(\%)=\left(1-\frac{A}{B}\right)\times 100$$

A: 추출물 첨가구의 흡광도, B: 추출물 무첨가구의 흡광도

Xanthine oxidase(XOase)에 의해 생성된 Superoxide radicals 소거능 측정. XOase에 의해 생성된 superoxide radials 소거능은 NBT(nitro-blue tetrazolium)환원법[Parejo 등, 2002]을 사용하여 검정하였다. 즉, 0.8 mM xanthine을 포함하는 0.1 mM phosphate buffer(pH 8.0) 0.5 mL와 0.48 mM NBT를 포함하는 0.1 mM phosphate buffer(pH 8.0)에 시료를 농도별로 각각 처리하여 혼합한 후, 37°C에서 5분간 incubation하엿다. 반응물에 xanthine oxidase(0.049 U/mL)를 1.0 mL을 가하여 37°C에서 20분간 incubation시켰다. 그 후, 69 mM SDS를 2.0 mL을 첨가하여 반응을 정지 시킨 후 560 nm 흡광도에서 측정하였다. 농도별 시료에 따른 NBT 환원에 대한 저해능은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{XOase inhibition}(\%)=\frac{C-S}{C-B}\times 100$$

B(blank): 0.8 mM xanthine 포함한 0.1 mM buffer(pH 8.0)와 69 mM SDS만 첨 가한 반응액 흡광도. C(control): 시료대신 0.48 mM NBT를 첨가한 반응액 흡광도. S(Sample): 시료 첨가한 반응액 흡광도.

ACE(Angiotensin I-Converting Enzyme) 저해능 측정. ACE저해 활성은 Cushman 등[1971]의 방법에 따라 측정하였으며, 조효소액은 rabbit lung acetone powder(Sigma USA)를 0.3 M NaCl을 함유한 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3)에 1 g/mL(w/v)의 농도로 4°C에서 24시간 추출한 후, 4°C, 4,000 rpm에서 40분간 원심 분리하여 상등액을 ACE 조효소액으로

사용하였다. 기질은 0.3 M NaCl 이 함유된 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3)에 HHL(hippuryl-histidyl-leucine)을 5 mg/mL(w/v)의 농도로 녹인 후 기질로 사용하였다. ACE 저해활성은 시료 50 μL에 ACE 조효소액 50 μL를 가한 다음 37°C에서 5분간 예비반응 시킨 후, 기질 50 μL을 가한 후 다시 37°C에서 1시간 반응 시켰다. 1 N HCl 150 μL로 반응을 정지시키고 ethyl acetate 750 μL 가한 후, 1분간 교반하고 4°C, 5,000 rpm에서 10분간 원심 분리 한 후 상등액 500 μL를 얻었다. 이 상등액을 120°C에서 30분간 완전히 건조 시켜 MeOH 2 mL을 넣은 후 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로서는 추출물 대신 추출용매 50 μL를 가해 실험 하였으며, ACE 저해 활성효과는 다음 계산식을 이용하여 실험하였다.

ACE inhibition(%)=(C−S/C−B)×100

S: Sample absorbance. C: Control absorbance. B: Blank absorbance

혈전분해능 측정. 혈전용해 활성의 측정에 있어서는 Astrup와 Hullertz[1952]의 방법을 변형하여 사용하였다. 0.4% Fibrinogen(Sigma)을 sodium borate buffer(10 mM sodium borate, 160 mM boric acid, 40 mM NaCl. Merk)에 녹인 다음 직경 87×10 mm petridish에 10 mL을 넣은 후 thrombin(1,000 unit/mL Sigma) 20 unit를 첨가하여 실온에 30분간 방치하여 응고시켰다. 응고된 fibrin plate 에 각 시료를 적당량 점적하여 37°C에서 반응시켜 용해된 분해면적을 측정하였으며, 활성의 세기를 측정하기 위하여 혈전분해효소 plasmin과 비교 후 unit로 환산하여 단위를 정하였다.

세포배양. 마우스대식세포주인 RAW264.7 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA. USA)에서 구입하였으며, 세포배양에 사용된 배지인 RPMI 1640 medium (Eagle's MEM)과 fetal bovine serum(FBS), Hank's balanced salt solution(HBSS) 등은 모두 Hyclone(Logan, UT, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. RAW264.7 세포주는 10% FBS와 100 unit의 penicillin과 streptomycin이 함유된 RPMI 1640 media를 사용하여 5%의 이산화탄소를 포함한 37°C의 포화습도 공기조건하에서 배양하였다.

Nitric oxide(NO) 생성량 측정 및 cell viability 측정. NO의 생성은 비색법으로 세포 상등액에 축적되는 nitrite 양을 측정하였다. 대식세포를 세포 배양판에 5×10^5 cells/mL의 세포가 되도록 재부유하여 LPS(10 μg/mL)의 자극하에 24시간 배양하고 그 배양 상층액 내의 NO를 Griess 시약과 반응시켜 측정하였다[Marletta, 1993]. 100 μL의 세포배양 상층액을 취하여 동량의 Griess 시약[1% sulfanilamide(30% acetic acid)와 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride(60% acetic acid) 혼합액]을 가하여 상온에서 20분간 반응시켰다. NO의 활성 정도는 ELISA 판독기를 사용하여 540 nm 흡광도를 측정하였다.

세포독성 실험은 mitochondrial dehydrogenase activity의 index를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay 법으로 추출물이 세포생존율에 미치는 영향을 분석하였다[Marletta, 1993]. 96-well microtiter plate(Nunc, Vangaard, Neptune, NJ)에 RAW 264.7 macrophage를 1×10^5 cells/well의 농도로 분주하였다. 분주 24시간 후 각 추출물이 함유되어 있는 배지를 100 μL씩 넣어 48시간 동안 배양하였다. Plate에 MTT 2 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT, Sigma) 용액을 20 μL씩 첨가하여 4시간 동안 배양시키고 formazan을 형성시키 후 조심스럽게 상등액을 제거하였다. DMSO 150 μL을 첨가하여 formazan을 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

플라보노이드 함량. 지금까지의 보고에 의하면 항산화능과 플라보노이드의 함량에는 비례적인 연관성이 있다고 알려져 왔다[Makris와 Rossiter, 2001]. 이러한 결과는 Kang[1993]이 감귤껍질에서 플라보노이드를 분리 추출하여 실시한 산화억제능에서도 동일한 결과를 나타낸 바 있다. 또한 Kim 등[1995]이 대두에서 각종 용매를 이용하여 플라보노이드를 추출하여 실험한 항산화능에서도 동일한 결과를 나타내었으며 붉나무 순차용매 추출물의 항산화 효과를 비교한 Lee 등[1993]의 연구결과에서도 이러한 사실을 입증한 바 있다. 본 연구에서는 들빛 발효액에 대한 플라보노이드 함량을 HPLC로 정량 분석하여(Table 1) 항산화능을 예측하고자 하였다. Quercetin은 들빛 발효액에서 0.03±0.002 mg/g의 함량을 보였지만, kaempferol와 myricetin은 관찰되지 않았다. Apigenin은 0.335±0.007 mg/g으로 높은 함량을 나타내었고, luteolin의 경우에서도 0.430±0.003 mg/g으로 관찰되었다. 대표적인 플라보노이드계 물질인 rutin은 들빛 발효액에서 2.6±0.006 mg/g으로 훨씬 높은 함량을 보이고 있는데, 이로써 총 플라보노이드의 함량은 들빛 발효액에서 3.4±0.005 mg/g으로 나타났다. 하지만, 발효전의 플라보노이드 함량 측정시 quercetin, kaempferol, apigenin, luteolin, rutin은 0.534±0.007, 0.015±0.002, 1.1±0.008, 2.5±0.004, 36.8±0.009 mg/g으로 총 플라보노이드의 함량이 41.0±0.013 mg/g으로 나타나 들빛 발효액 보다 높은 수치를 보였다. 그럼에도 불구하고, Fig. 2에서 들빛 발효액은 높은 라디칼 소거능을 나타내고 있는데, 이는 약용식물이 함유하고 있는 여러 가지 생리활성 물질들이 발효로 인하여 항산화효과를 나타내는 새로운 생리활성 물질로 변화한 것으로 추정된다.

DPPH를 활용한 항산화활성. 인체내의 free radical은 지질,

Table 1. The contents of flavonoids of DeulBit (DB) and medical plants before fermentation (BDB) (mg/g)

Flavonoids	DB	BDB
Quercetin	0.03±0.002	0.534±0.007
Kaempferol	-	0.015±0.002
Myricetin	-	-
Apigenin	0.335±0.007	1.1±0.008
Luteolin	0.430±0.003	2.5±0.004
Rutin	2.6±0.006	36.8±0.009
Total	3.4±0.005	41.0±0.013

Flavonoids were analyzed by HPLC.
Results are presentated as means±SD of three independent experiments.

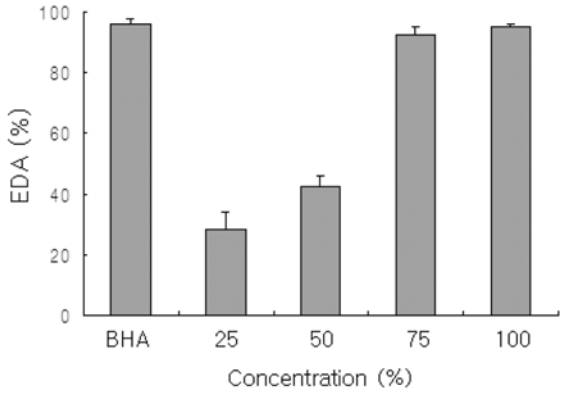

Fig. 1. DPPH electron scavenging ability on 25, 50, 75, and 100% of DeulBit (DB). Results are mean±SD of triplicate data. BHA; butylated hydroxyanisole (0.01%).

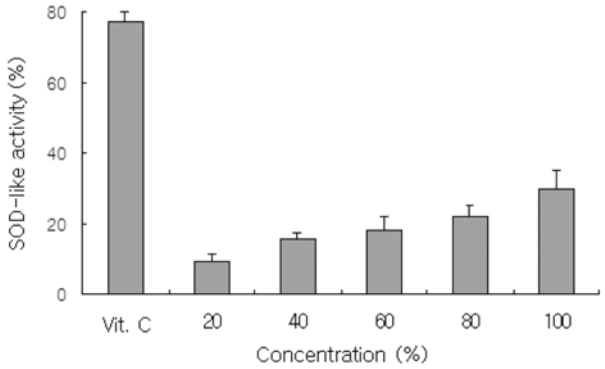

Fig. 2. Superoxide dismutase (SOD)-like activity on 20, 40, 60, 80, and 100% of DeulBit (DB). Results are presentated as means±SD of three independent experiments. Vit. C; vitamin C (0.01%).

단백질 등과 반응하여 생체의 노화를 촉진할 수 있는 물질로, 이러한 free radical을 제거할 수 있는 천연물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거법은 항산화물질의 전자공여능을 이용한 항산화 측정법으로써 주로 pheonlic 구조와 aromatic amine 화합물에서 많이 사용되는 방법이다. 본 연구에서 들빛 발효액의 항산화 효과를 DPPH radical 제거 정도를 측정하여 전자공여능으로 나타낸 결과 발효 원액(100%)에서 96%로 나타났다(Fig. 1). 일반적으로 이용되는 positive control인 BHA 0.01%에서 전자소거능이 96%로 보고되고 있어서[Cho 등, 2009], 들빛 발효액의 높은 항산화 활성이 기대된다. 이는 발효 중 미생물들의 작용을 통해서 항산화능을 나타내는 새로운 생리활성 성분이 생성된 것으로 생각된다.

약용식물 추출물의 전자소거능에 대한 보고에 의하면 감초, 녹차, 박하, 국화, 오미자, 구기자 추출물에서 39, 94, 26, 51, 49, 30%로 나타났는데, 이는 본 연구의 시료인 들빛 발효액의 높은 항산화능을 뒷받침 하고 있다[Jeon 등, 2003; Park 등, 2006].

SOD 유사활성. SOD는 생체내에서 superoxide radical을 과산화수소로 환원시켜주는 천연 항산화효소로 알려져 있는데, 활성산소종을 제거한다는 측면에서 산화방지와 노화억제와도 밀접한 관련이 있으므로 식물체 중에서 SOD와 유사한 활성을 나타내는 소재를 찾고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다[Hong 등, 1998].

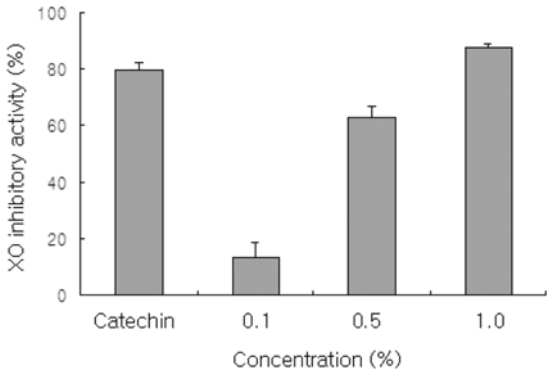

Fig. 3. Xanthine oxdiase inhibitory activity on 0.1, 0.5, and 1% of DeulBit (DB). Results are presentated as means±SD of three independent experiments. Catechin; catechin of 0.01%.

본 연구에서 들빛 발효액의 SOD 유사활성은 100% 들빛 발효액에서 29%의 활성을 보였으며 SOD 활성은 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하였다(Fig. 2). 대조구인 Vit. C의 경우 농도 0.001%일 때 77%로 보고되어 있는데, 들빛 발효액과의 비교 결과에 따르면 대조구 보다 낮은 SOD 유사활성을 나타내고 있다. 하지만, 지금까지의 약용식물에 대한 SOD 활성은 추출물에서 분석되어 왔고, 발효액에 대한 보고는 거의 없는 와중에 Kim 등[2003]은 약용식물 추출물을 발효시킨 발효액 중에 아카시아와 감잎 등에서 각각 25, 29%의 SOD유사 활성을 나타내었다고 보고하였다. 또한 약용식물 추출물의 SOD 유사활성에 대한 보고에 의하면 오가피는 14%, 결명자는 18%, 감초는 36%, 구기자는 21%, 박하는 15%, 생강은 9%으로 알려져 있다[Lim 등, 2004]. 이는 본 연구의 시료인 들빛 발효액의 SOD 유사활성을 뒷받침 하고 있다.

XOase에 의해 생성된 Superoxide radicals 소거능. XOase는 xanthine을 기질로 하여 uric acid를 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소이다. Superoxide radicals은 살아있는 세포에서 발생하는 활성산소 중에서 가장 중요한 라디칼로 작용하며, 이러한 라디칼은 불포화 지방산의 과산화에 영향을 미치고 있다[Winterbourn과 Kettle, 2003]. 그러므로, superoxide radicals의 소거능은 항산화활성 메카니즘을 묘사하는 가장 중요한 방법 중 하나로 표현된다. 본 실험에서는 대조구로 catechin을 사용하였으며 들빛 발효액에 대해 농도별로 분석하였다. Superoxide radical소거능 측정 결과 농도가 증가할수록 소거능이 증가하였으며, 대조구인 catechin과 비교한 결과 0.1%에서 80%인 반면, 100배 희석한 들빛 발효액(1%)은 88%로 높게 나타났다(Fig. 3). Catechin은 polyphenol계 항산화 물질로써 식물성 대사산물로 알려져 있으며 항산화효과가 비타민 E에 비해 무려 50배나 되고, 비타민 C에 비해 100배에 달하기 때문에, 체내의 활성산소를 제거하는 효과가 매우 탁월하다고 알려져 있다[Park 등, 2007]. 들빛 발효액의 superoxide radical 소거능은 catechin의 효과보다 높은 결과를 나타내고 있어 본

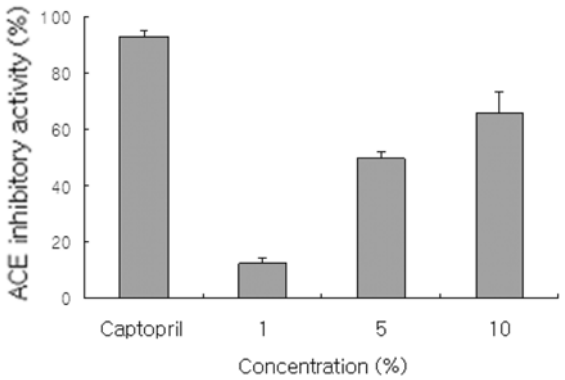

Fig. 4. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity on 1, 5, and 10% of DeulBit (DB). Results are presentated as means±SD of three independent experiments. Captopril; captopril of 0.01%.

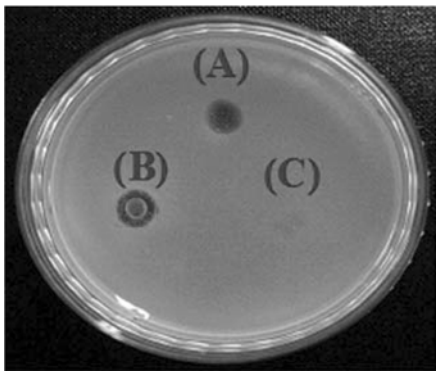

Fig. 5. Fibrinolytic activites of DeulBit (DB). (A), 1 μg of plasmin; (B), DB; (C), 10 mg/mL of water extract from medical plants. 20 μL of test samples was dropped onto the fibrin plate and the plate was incubated for 2 h at 37°C.

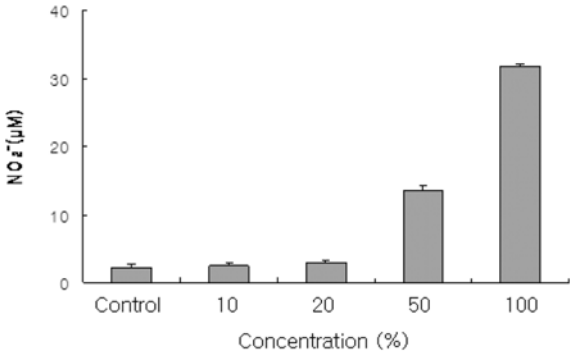

Fig. 6. Stimulation of NO synthesis by 10, 20, 50, and 100% of DeulBit (DB). NO production was determined in macrophage RAW 264.7 cells. Results are mean±SD of triplicate data.

연구의 들빛 발효액이 우수한 항산화 소재로 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

본 실험결과는 약리작용에 대한 효과가 있는 대나무 추출물의 superoxide radical소거능 65%보다 높은 수치를 나타내고 있다[Song 등, 2007]. 또한, 약용식물 중 비자 추출물의 superoxide radical소거능 89%[Jeon 등, 2009]와 유사한 결과를 나타내고 있는데 비자의 superoxide radical소거능은 팥배나무 종자와 산뽕나무 종자 추출물의 superoxide radical소거능 각각 77, 41%[Hyun 등, 2007] 보다 높다.

ACE 저해활성. ACE는 강력한 혈관수축작용을 나타내는 angiotensin II를 생성하여 고혈압의 원인이 되고 있다. Angiotensin II는 혈관을 수축시키는 작용을 하고, 부신에서 aldosterone의 분비를 촉진시켜 체내 수분 보유량을 많게 하여 결과적으로 혈압을 상승시키는 작용을 한다. ACE의 작용이 계속 지속화 될 경우 고혈압이 지속되어 혈관벽이 약화되어 터지게 되거나, 뇌졸중 등의 여러 질환을 유발시킬 수 있다. 이러한 ACE의 활성 저해인자로는 저분자 peptide들과 그 유도체들, 녹차에 존재하는 catechin과 메밀의 rutin 과 같은 polyphenol성분들이 대표적으로 알려져 있다. 이러한 ACE의 작용을 억제하기 위한 활성이 있는 지 알아보기 위해 실험을 한 결과, 들빛 발효액에서 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4). 대조구로 현재 시판되고 있는 항고혈압제인 captopril을 사용하였으며, captopril 0.01%에서 93%의 저해 활성을 보였는데 10배 희석한 들빛 발효액(10%)에서는 66%의 저해 활성을 보였다. 이러한 결과는 혈관질환에 예방 효능이 높은 양파 열수 추출물의 ACE 저해율 44%보다 높게 나타났다[Ma, 2000]. 또한 고혈압 예방 효능이 높은 기능성 식품인 유색감자의 ACE 저해율 보다 뛰어난 효능을 나타내고 있다[Parejo 등, 2002]. 따라서 본 연구에서 개발된 들빛 발효액은 고혈압 예방 기능성 음료로서 이용가능성이 높은 것으로 사료된다.

혈전분해능. 지금까지 발효식품으로부터의 혈전분해능이 보고되어 왔는데, 이는 발효식품의 미생물에 의한 것으로 알려졌다. 즉, 된장으로부터 분리된 *Bacillus*속 KDO-13[Lee 등, 2001], 치즈로부터 분리된 *B. amyloliquefaciens* DC-4[Peng 등, 2003], 흑두로 제조한 청국에서 분리된 *B. subtilis* BB-1[Lee 등, 2005], 멸치액젓으로부터 분리된 *B. subtilis* JM-3[Lee 등, 2002], 청국장으로부터 분리된 *B. subtilis* KCK-7[Paik 등, 2004] 등이 혈전분해능이 우수한 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구의 시료인 들빛 발효액으로부터의 혈전분해능이 예상되는 바 그 활성을 조사하고자 하였다. 그 결과, 들빛 발효액에서 혈전분해능이 나타났는데, 비교분석용으로 혈전분해제 plasmin 1 μg과 들빛 열수 추출물 10 mg/mL을 사용하였다(Fig. 5). 발효액의 혈전분해능은 체온과 유사한 온도인 37°C에서 2시간 반응 후 확인되고 있는데, 이는 plasmin과 유사한 분해능을 나타내었다. 이에 반해 추출물에서는 혈전분해능을 보이지 않고 있어 들빛 발효액의 혈전분해능은 발효 중 생성된 균주들의 혈전분해능으로 사료된다.

대식세포에서의 NO 생성능. NO는 분비조직과 세포의 기능에 영향을 미치며, 세포성 면역계의 주된 역할의 하나로 세포독성이나 성장 억제 작용을 한다[Jeon 등, 2005]. 또한, 최근에는 NO가 대부분의 포유류 동물의 세포내에서 생성되고 신경계에서는 화학적 신호 전달 물질로서, 혈관계에서는 혈압 조절과 혈소판의 응집 및 호중성구의 집합 작용을, 골격근에서는 대사와 근 수축 조절 등 생리학적으로 중요한 역할을 한다고 보고되었다. 이 뿐만 아니라, NO가 세포 활성화 물질 및 reactive oxygen intermediates(ROI)에 의해 유발된 세포 독성을 최소화

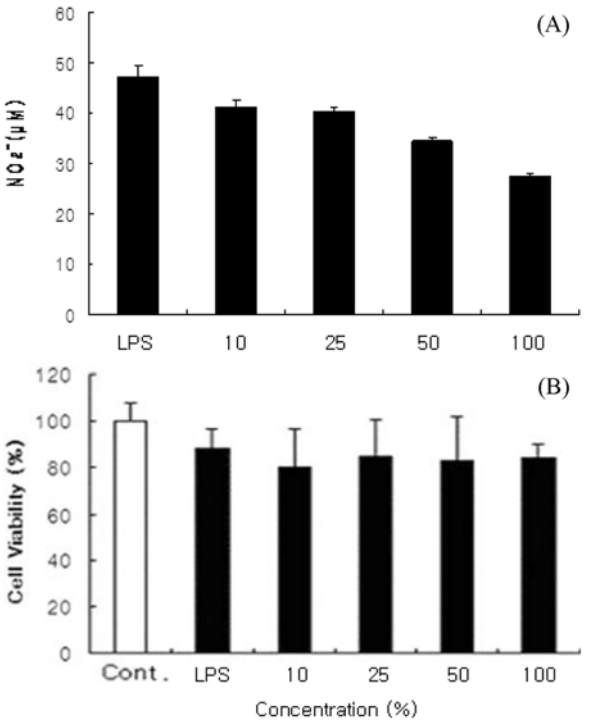

Fig. 7. Effects of DeulBit (DB) on (A) NO amounts and (B) cell viability in bacterial LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. RAW264.7 cells were cultured for 24 hr with 10%, 25%, 50%, and 100% of DB in the presence of LPS (10 μg/mL). NO release was measured using the method of Griess (nitrite). Cytotoxicity was determined by MTT assay. Results are presentated as means±SD of three independent experiments.

시키는 역할이 밝혀짐으로써 이 분야에 대해서 활발히 연구되고 있다[Krncke 등, 1997; Wink 등, 1996]. 이에 본 실험에서는 들빛 발효액을 대식세포에 처리하여 NO의 생성능을 확인하였다(Fig. 6). 결과에서도 확인할 수 있는 것처럼 대식세포가 생성하는 NO량 2.0 μM보다 들빛 발효 원액(100%)이 30.0 μM로 높은 NO 생성능을 나타내었다(Fig. 6). 하지만, 일정량 이상의 NO는 세포독성을 유발할 수 있으므로 면역계를 활성화 시킨 후 빠른 시간내 제거된다고 알려져 있다[Ischiropoulos과 al-Mehdi, 1995]. 이로써, 들빛 발효액이 면역조절능과 관련하여 활용 가능성이 있으며 전통발효를 통해 높은 면역조절 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

NO 생성능 및 cell viability. 지금까지 NO는 면역 세포에서 외부의 자극에 의해 생성되며 주로 침입한 미생물이나 종양 세포에 대해 독성을 갖는 방어 물질로서 작용하는 것으로 알려져 왔다[Hierholzer 등, 1998; Luss 등, 1996]. 즉, 대식세포의 NOS(nitric oxide syntase)가 TNF-α와 같은 여러 가지 cytokine과 대장균 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 세균내 독소의 영향을 받아 NOS 유전자의 발현이 유도되어 방어물질 NO를 대량 생산한다. 이와 반대로, 세포내 독소의 영향이 적어진다면 NO 생산량 또한 줄어들 것이다. 이에 본 실험에서는 대장균 LPS를 대식세포에 처리하여 NO를 유도시킨 다음 들빛 발효액을 대식세포에 처리하여 NO 소거능에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 7). 그 결과, LPS에 의하여 유도된 대식세포의 NO 량은 들빛 발효액을 농도별로 첨가하였을 때 점차 감소하였다. 즉, 10배로 희석한 발효액은 11%의 NO 소거능을 나타내고 있는 반면, 발효 원액(100%)은 42%의 NO 소거능을 나타내었다(Fig. 7). 이러한 결과는 들빛 발효액이 NO 조절기능과 밀접한 관계가 있음을 보여주는 것이다.

LPS 자극에 의한 약용식물의 NO 생성 억제 연구 또한 이루어져 왔는데 Seo 등[2009]은 NO 소거능을 봉선화, 금불초, 산옥잠화, 모시풀등과 같은 약초의 메탄올추출물 농도 100 μg/mL에서 50% 이상의 활성을 보고하였다. Ahn 등[2005]은 본 연구 결과와 유사한 도라지의 NO 소거능을 보고하였는데, 우수한 NO 소거능으로 차세대 염증질환 치료제와 예방약으로 활용할 수 있을 것으로 판단하고 있다. 이는 역시 본 연구에서 분석된 들빛 발효액의 활용도를 대변하고 있다.

발효액 시료에 대한 세포활성은 MTT 분석을 통해서 측정하였다. 그 결과 100% 들빛 발효액을 처리한 대식세포의 세포생존율이 90% 정도를 나타내는 바 본 연구에서 사용된 시료에 대한 세포독성은 없는 것으로 관찰되었다. 또한, 실험결과에 나타난 NO량의 변화가 세포독성에 의한 영향과는 무관함을 확인 할 수 있었다.

초 록

본 연구에서는 결명자, 오미자, 구기자, 박하, 국화, 산마, 생강, 둥글레, 감초, 오가피, 녹차, 다시마를 발효시킨 들빛 발효액으로 여러 가지 생리활성에 대하여 분석하였다. 우선, 들빛 발효액의 플라보노이드 함량과 DPPH 활성을 측정하였다. 그 결과 들빛 발효액의 총 플라보이드 함량은 3.4±0.5 mg/g으로, DPPH법을 통해 측정한 들빛 발효액의 radical 소거능은 96%로 나타났다. 들빛 발효액의 SOD 유사활성은 29%로 나타내었고, XOase에 의해 생성된 superoxide radical 소거능은 88%로 높게 나타났다. 들빛 발효액의 항고혈압 측정실험에서는 66%의 저해률을 나타내어 ACE 저해 활성이 뛰어난 것으로 나타났다. 혈전분해능에 대한 들빛 발효액의 분석 결과는 혈전용해제로 알려져 있는 plasmin과 유사한 활성을 보이고 있다. 들빛 발효액과 면역활성과의 연관성은 NO 생성 증가율과 LPS에 의해 유도되는 NO 생성 억제율 분석으로 조사되었다. 그 결과, 들빛 발효액은 무려 15배의 높은 NO 생성 증가율을 보였다. 또한 LPS에 의해 유도된 NO 생성 억제율은 들빛 발효액 100%에서 42%로 나타나 높은 면역조절능을 나타내었다. 이상의 결과는 들빛 발효액의 우수한 생리활성을 증명하고 있고, 항산화력, 항고혈압 효과, 혈전분해능 및 면역 조절활성이 높은 것으로 나타나 기능성 음료의 소재로서 그 활용도가 높을 것으로 판단된다.

Key words: ACE inhibition, DPPH radical scavenging activity, fibrinolytic activity, flavonoid, nitric oxide

참고문헌

Ahn KS, Noh EJ, Zhao HL, Jung SH, Kang SS, Kim YS. 2005. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by *Platycodon grandiflorum* saponins via suppression of nuclear factor-kB activation in RAW 264.7 cells. *Life Sci* **76**, 2315-2328.

Ahn SW, Kim MH, Chung WT, Hwang B, Seong NS, Lee HY. 2000. Enhancement of alcohol fermentation yield by adding the extract of dried Rehmannia glutinosa Liboschitz. *Kor J Medicinal Crop Sci* **8**, 351-361.

Astrup, T. and S. Hullertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophy* **40**, 346-351.

Bae IY, Yoon EJ, Woo JM, Kim JS, Lee HG, Yang CB. 2002. The development of Korean traditional wine using the fruits of Opuntia ficus-indica var, saboten-I. Characteristics of Mashes and Sojues, *J Korean Soc Appl Biol Chem* **45**, 11-17.

Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1200.

Cho EK, Song HJ, Cho HE, Kim MH, Choi IS, Choi YJ. 2009. Inhibitory effects of ethanol extracts from pine buds (*Pinus densiflora*) on angiotensin converting enzyme, xanthine oxidase and nitric oxide synthesis. *J Life Sci.* **19**, 1629-1636.

Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* **20**, 1637-1648.

Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, Peitzman AB, Billiar TR, Tweardy DJ. 1998. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med* **187**, 917-928.

Hong HD, Kang NK, Kim SS. 1998. Superoxide dismutase-like activity of apple juice mixed with some fruits and vegetables. *Korean J Food Sci Technol* **30**, 1484-1487.

Hong SW, Kim JY, Lee BK, Chung KS. 2006. The bacterial biological response modifiee enriched chungkookjang fermentation, *Korean J Food Sci Technol* **38**, 548-553.

Hyun SH, Jung SK, Jwa MK, Song CK, Kim JH, Lim SB. 2007. Screen of antioxidants and cosmeceuticals from natural plant resources in Jeju island. *Korean J Food Sci Technol* **39**, 200-208.

Ischiropoulos H, al-Mehdi AB, 1995. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* **364**, 279-282.

Jeon HS, Lee YS, Kim NW. 2009. The antioxidative activities of Torreya nucifera seed extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **38**, 1-8.

Jeon JR, Kim JY, Lee KM, Cho DH. 2005. Anti-obese effects of mixture contained pine needle, black tea, and green tea extracts. *J Kor Soc Appl Biol Chem* **48**, 375-381.

Jeon TW, Park JH, Shin MG, Kim KH, Byun MW. 2003. Effects of gamma-irradiation on biological activities and color changes of extracts of Schizandrae fructus. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **32**, 137-142.

Kang JH. 1993. Studies on the antioxidative effect and the inhibitory effect on the DNA damage of bioflavonoid extracted from Citrus sinensis. *Kosin J Health Sci* **3**, 74-81.

Kang JM, Cha IH, Lee YK, Ryu HS. 1997. Identification of volatile essential oil and flavor characterization and antibacterial effect of fractions from Houttuynia cordata Thunb. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **26**, 209-213.

Kim JY, Maeng YS, Lee GY. 1995. Antioxidative effects of soybean extracts by using various solvents. *Kor J Food Sci Technol* **27**, 635-639.

Kim NM, Lee JW, Do JH, Yang JW. 2003. Effects of the fermentation periods on the qualities and functionalities of the fermentation broth of wild vegetables. *Kor J Food Sci Technol* **35**, 272-279.

Krncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. 1997. Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection-How, why, when, and where? *Nitric Oxide* **1**, 107-120.

Lee MK, Choi GP, Ryu LH, Lee GY, Yu CY, Lee HY. 2004. Enhanced immune activity and cytotoxicity of Artemisia capillaris thunb. extracts against human cell lines. *Korean J Medicinal Crop Sci* **12**, 36-42.

Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS, Kim JH. 2003. Screening of medical plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci* **73**, 167-179.

Lee SK, Bae DH, Kwon TJ, Lee SB, Lee HH, Park JH, Heo S. 2001. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme form *Bacillus* sp. KDO-13 isolated from soybean paste. *J Microbiol Biotechnol* **11**, 845-845.

Lee SS, Kim SM, Park UK, Kim HY, Shin IS. 2002. Studies on proteolytic and fibrinolytic activity of Bacillus subtilis JM-3 isolated from anchovy sauce. *Kor J Food Sci Technol* **34**, 283-289.

Lee YH, Lee SH, Jeon JM, Kim HC, Cho YU, Park KH, Choi YJ, Gal SW. 2005. Cloning and characterization of a gene for fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BB-1 isolated from black bean Chung-kuk. *J Life Sci* **15**, 513-521.

Lee YJ, Shin DH, Chang YS, Kang WS. 1993. Antioxidative effect of Rhus javanica Linne extract by various solvents. *Kor J Food Sci Technol* **25**, 677-682.

Luss H, Nussler NC, Beger HG, Nussler AK. 1996. Expression and detection of inducible nitric oxide synthase in experimental models of inflammation. *Methods* **10**, 51-60.

Ma SJ. 2000. Inhibitory effect of onion seasoning on angiotensin converting enzyme. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **29**, 395-400.

Makris DP, Rossiter JT. 2001. Comparison of quercetin and non-orthohydroxy flavonoid as antioxidants by competing in vitro oxidation reactions. *J Agric Food Chem* **49**, 3370-3377.

Marklund S, Marklund G. 1975. Involvement of superoxide aminoradical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* **47**, 468-474.

Marletta MA. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* **268**, 12231-12234.

Paik HD, Lee SK, Heo S, Kim SY, Lee HH, Kwon TJ. 2004. Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* KCK-7 from *ChungKookjang*. *J Microbiol Biotechnol* **14**, 829-835.

Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J, Conida C. 2002. Comparision between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric*

Food Chem **50**, 6882-6890.

Park SJ, Park WJ, Lee BC, Kim SD, Kang MH. 2006. Antioxidative activity of different species *Lycium chinensis* Miller extracts by harvest time. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **35**, 1146-1150.

Park YE, Cho HM, Lee HJ, Hwang YS, Choi SSN, Lee SJ, Park ES, Lim JD, Choung MG. 2007. Antioxidant and inhibition on angiotensin converting enzyme activity of colored potato extracts. *Kor J Crop Sci* **52**, 447-452.

Peng Y, Huang Q, Zhang RH, Zhang YZ. 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comparative Biochem Physiol Part B* **134**, 45-52.

Seo JS, Lee TH, Lee SM, Lee SE, Seong NS, Kim JY. 2009. Inhibitory effects of methanolic extracts of medicinal plants on nitric oxide production in activated macrophage RAW 264.7 cells. *Kor J Medicinal Crop Sci* **17**, 173-178.

Song HS, Moon HJ, Park BE, Choi BS, Lee DJ, Lee JY, Kim CJ, Sim SS. 2007. Anti-oxidant activity and whitening activity of bamboo extracts. *Yakhak Hoeji* **51**, 500-507.

Sun T, Tanumihardjo SA. 2007. An Integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *J Food Sci* **72**, 159-165.

Wink DA, Cook JA, Pacelli R, DeGraff W, Gamson J, Liebman J, Krishna MC, Mitchell JB. 1996. The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: A direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch Biochem Biophys* **331**, 241-248.

Winterbourn CC, Kettle AJ. 2003. Radical-radical reactions of superoxide: A potential route to toxicity. *Biochem Biophys res comm* **305**, 729-736.