

산마늘 발효추출물의 항산화활성과 세포독성

도은수, 장준복*, 길기정, 최명석¹, 양재경¹, 윤충원², 정선미, 정윤희, 이건희중부대학교 한방제약학과, ¹경상대 환경산림과학부, ²공주대학교 산림자원학과**Antioxidative Activity and Cytotoxicity of Fermented
Allium victorialis L. Extract****Eun Soo Doh, Jun Pok Chang*, Ki Jung Kil, Myung Suk Choi¹, Jae Kyung Yang¹,
Chung Weon Yun², Sun Mi Jeong, Yun hae Jung and Gun Hee Lee**

Department of Oriental Pharmaceutical Science, Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

¹Division of Environmental Forest Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea²Department of Forest Resources, Kongju National University, Yesan 340-802, Korea

Abstract - This study was conducted to investigate the antioxidative activity and cytotoxicity of fermented *Allium victorialis* extract. The results were as follows; The total polyphenol content of *A. victorialis* extract was 2.63 mg/g, and that of fermented *A. victorialis* extract was 1.65 mg/g which decreased a little by fermentation. The total flavonoid content of *A. victorialis* extract was 57.77 mg/g, and that of fermented *A. victorialis* extract was 62.27 mg/g, and this could increase a little from fermentation. Electron donating ability of *A. victorialis* extract was lower than vitamin C(97.71%), but before fermentation it was 82.29% and after fermentation it became 82.40%. Nitrite scavenging ability of *A. victorialis* extract before and after fermentation showed lower numerical value than that of butylated hydroxytoluene(BHT) at pH 2.5 but that of *A. victorialis* extract expressed higher than that of BHT. Superoxide dismutase-like activity showed relatively low level, 15%. Nitrite production increased by *A. victorialis* extract but was inhibited after fermentation. Methyl diamphetamine (MDA) content was inhibited with increased concentration of *A. victorialis* extract compared with H₂O₂ treatment but there was not any difference before and after fermentation. Therefore, production of lipid peroxide(LPO) was inhibited by *A. victorialis* extract. Cell viability of fibroblast cell was tend to slightly decrease with increased concentration of *A. victorialis* extract, but not different with control.

Key words - Fermentation, Antioxidative activity, Cytotoxicity, *A. victorialis*

서 언

인체 노화와 성인병을 비롯한 질병은 인체 내에서 생성되는 활성산소에 의해 발생된다는 학설이 점차 인정되고 있다(Cross *et al.*, 1987; Kedziora *et al.*, 1988; Marnett *et al.*, 1987; Patt *et al.*, 1988). 활성산소는 인체 내에서 산화적 스트레스(oxidative stress)를 야기하고 강력한 산화 작용을 일으켜 세포막 DNA를 손상시키며 세포까지 공격하게 된다(Heo and Wang, 2008). 생체 내 활성산소에 대한 방어 기구로서 superoxide dismutase(SOD), catalase,

peroxidase 등의 항산화 효소와 함께 vitamin C, vitamin E, glutathione과 같은 항산화 물질이 존재하고 있고(Park, 1997), 그 외에 glutathione reductase, glutathione 등의 효소 계열의 예방적 항산화제와 phenolic 화합물, flavone유도체, tocopherol류, ascorbic acid, carotenoids, glutathione, 아미노산 등의 천연 항산화제가 있으며, 합성 항산화제인 BHA와 butylated hydroxytoluene(BHT) 등이 있다(Duh *et al.*, 1999; Osborn-Barnes and Akoh, 2003; Yen and Hsieh, 1998). 그러나 butylated hydroxyanisole(BHA)와 BHT는 뛰어난 효과와 경제성 때문에 폭넓게 사용되어 왔지만 발암성이 있고, 체내 에너지 생산과 세포대사 및 호흡 작용을 방해하며, 독성이 강하다는 문제점이 보고되어 사

*교신저자(E-mail) : jpchang@joongbu.ac.kr

용이 제한적이다(Heo and Wang, 2008). 따라서 천연물 중에 존재하는 플라보노이드, 폴리페놀, SOD 유사활성물질 등이 안정성이 확보된 항산화제로 중요시되고 있으며, 비파 잎(Lee and Kim, 2009), 등대풀(Kim *et al.*, 2007), 자화지정(Choi *et al.*, 2008a), 참취 꽃(Woo *et al.*, 2008), 사철쭉(Choi *et al.*, 2008b) 등은 플라보노이드 다량 함유되어 있으며, 식물계에 널리 분포된 2차 대사산물의 하나인 폴리페놀 화합물은 항산화, 항혈전, 고지혈증 및 지방간 억제 작용 등의 활성을 가지며(Jang *et al.*, 2008), 만형자(Lee *et al.*, 2009b), 순비기나무 줄기(Joo *et al.*, 2007), 짚신나물(Seo *et al.*, 2008) 등에 많이 함유되어 있는 것으로 보고되었다.

산마늘(*Allium victorialis* Linne)은 백합과 다년생 초본식물로서 우리나라 북부지방, 지리산, 설악산, 오대산, 울릉도의 숲에서 자라고, 식물전체에서 강한 마늘냄새가 나며 맛은 맵고 성질은 약간 따뜻하며 독이 없다. 장기악독(臟氣惡毒)을 제거하고 종자는 유정을 치료하는 효과가 있다. 주요 성분으로는 유황화합물, 냄새의 근원이 되는 methyl allyl disulfide, diallyl disulfide, methyl allyl trisulfide, 항혈전작용을 가지는 3,4-dihydro-3-vinyl-1,2-thiin, 2-vinyl-1,3-dithiinsaponin, 1-kestose, neokestoserk 등(Nishimura *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1996; Lee, 2008)과 astragalín, quercetin, kaempferol 및 ferulic acid 등(Lee *et al.*, 2007)이다.

산마늘은 콜레스테롤 생합성 저해(Lee *et al.*, 2004), 비만억제(Park, 1997), 항동맥경화(Kim *et al.*, 2000), 항돌연변이원성 및 세포보호(Ham *et al.*, 2004), 식이성 고지혈 및 비만(Choi *et al.*, 2005) 등에 대한 효과가 있다. 천연물의 항산화 활성은 재료의 처리조건 및 추출방법에 따라 유효물질의 함량이나 생리적 활성도 다르게 나타나므로(Chung, 2001) 산마늘을 발효하여 생리활성차이가 규명된다면, 기능성 식품과 의약품 원료로서의 이용 가능성 등 이용의 다변화를 꾀할 수 있을 것으로 판단되어 이에 대한 기초자료로 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 산마늘(*A. victorialis* Linne)은 강원도 강릉시 옥계면의 배선훈 농가에서 재배중인 것을 2009년

4월에 구입하여 실험재료로 사용하였다. 구매 직후 수세하여 이물질을 제거하고 물기를 제거한 다음 적당하게 절단하여 deep freezer에 두었다가 동결건조하고 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다. 그리고 본 실험에 사용된 세포주 RAW 264.6과 사람의 섬유아세포(human skin fibroblast cell; CCD-986K)는 한국세포주 은행(KCLB, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

추출물의 조제

동결 건조된 산마늘 잎 분말에 중량의 10배량(W/V)으로 95%에탄올을 첨가하고 48시간동안 상온에서 추출하였으며, 거즈로 1차 여과하여 잔사를 제거하고 Advantec No 2. 여과지로 2차 여과하여 40℃ 수욕상에서 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였다. 이것을 -45℃ deep freezer에 12시간 두었다가 freeze dryer(Ilshin)에 넣고 동결건조 후 4 ± 1℃에서 냉장 보관하며 사용하였다.

발효추출물 조제

발효의 효율을 높이기 위하여 한약재 발효에 많이 응용되고 있는 α -Herbzyme(한국효소) 3 g에 증류수 10 mL를 가하고 50℃에서 2시간 침출 후 거즈로 1차 걸러 잔사를 제거하고 여과지(Advantec No 2.)로 2차 여과시킨 후 그 여액을 조효소액으로 사용하였다.

동결 건조된 산마늘 분말 0.9 g에 조효소액 2.2 mL를 첨가하여 autoclave 50℃에서 2시간 효소반응 시킨 후 95℃에서 10분간 살균하고 상온에서 서서히 식혔다. 그 다음 *Streptococcus thermophilus*를 0.1 mL 접종하여 30℃ shaking incubator(120 rpm)에서 4일간 배양한 후 60℃ autoclave에서 20분간 열처리하였다. 이것을 -45℃ deep freezer에 12시간 동안 두었다가 freeze dryer에 넣고 동결건조 후 4 ± 1℃에서 냉장 보관하며 시료로 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Folin and Denis, 1915)을 응용하여 측정하였다. 시료 추출물 1 mg을 95% ethyl alcohol 1 mL에 용해시키고 Folin-Ciocalteu 1 mL를 첨가하여 27℃ 수욕 조에서 혼합하였다. 5분 정도 경과 후 Na₂CO₃ 포화용액 1 mL를 가하여 혼합하고 실온에서 1시간 동안 방치하였으며 UV-spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Japan)를 사용하여 725 nm에서 흡광

도를 측정하였다. 이 때 tannic acid를 이용한 표준곡선은 최종농도가 0, 12.25, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 작성하여 725 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

시료 중 총 플라보노이드 함량은 Zhishen *et al.* (1999)의 분광분석법을 이용하여 측정하였다. 즉, 증류수 4 mL이 들어있는 시험관에 시료 1 mL를 가하고 5분이 경과한 다음 5% NaNO_2 0.3 mL과 10% AlCl_3 0.3 mL를 차례로 가하였다. 대조군은 시료 대신 증류수 1 mL을 첨가하였다. 6분이 경과한 후에 1 M NaOH 2 mL을 가하고 증류를 첨가하여 10 mL로 맞춘 다음 510 nm파장에서 흡광도를 측정하였고, L당 catechin equivalent(CE) mg으로 환산하여 플라보노이드 함량을 표시하였다.

전자공여능 측정

전자공여능은 Leong and Shui(2002)의 방법을 변형하여 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical에 대한 소거능을 측정하였다. 즉, 시료를 ethyl alcohol에 용해시켜 100 μM 의 DPPH 용액 900 μL 와 시료 용액 100 μL 를 혼합하여 잘 교반하였다. 이 혼합 시료를 암소에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 수소전자공여능은 각 실험을 3회 반복하여 평균을 낸 다음 대조구에 대한 흡광도의 감소 정도를 다음 식에 의하여 계산하였다(Boo *et al.*, 2009).

$$A_n = (A_0 - A) / A_0 \times 100$$

A_n : DPPH radical 소거능에 대한 항산화 활성(%)

A_0 : 시료가 첨가되지 않은 DPPH 용액의 흡광도

A : 반응용액중의 DPPH와 시료의 반응 흡광도

아질산염 소거작용 측정

아질산염 소거능은 Kato *et al.* (1987)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 1 mM의 NaNO_2 용액 1 mL에 시료 추출물을 첨가하고, 여기에 0.1 N HCl (pH 1.2)과 0.1 M citrate buffer를 사용하여 반응용액의 pH를 각각 2.5와 4.2로 조정하였다. 반응용액의 부피를 10 mL로 한 다음 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 얻은 반응액을 1 mL씩 취하고 여기에 2% acetic acid 5 mL를 첨가한 후, Griess시약 0.5 mL를 가하여 혼합시켜 실온에서 15분간 방치한 다

음 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같이 아질산염 소거능을 구하였다. 대조구는 Griess 시약 대신 증류수 0.4 mL를 가하여 상기와 동일한 방법으로 측정하여 추출물을 첨가 한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 소거율을 백분율(%)로 나타냈으며, BHT 처리구와 비교하였다.

$$N(\%) = [1 - (A - C) / B] \times 100$$

N : nitrite scavenging ability

A : absorbance of 1 mM NaNO_2 added sample after standin for 1 hour

B : absorbance of 1 mM NaNO_2

C : absorbance of control

SOD 유사활성 측정

SOD 유사활성 측정은 Marklund and Marklund(1974)의 방법에 따라 과산화수소(H_2O_2)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 즉, 일정농도의 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 tris HCl buffer [50 mM tris(hydroxymethyl) amino-methane + 10 mM EDTA] 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하고 250°C에서 10분간 방치 후, 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 다음의 공식과 같이 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타냈다.

$$\text{SOD 유사활성}(\%) = (1 - \text{무첨가구의 흡광도} / \text{시료첨가구의 흡광도}) \times 100$$

세포 배양

RAW 264.7 cells는 37°C, 5% CO_2 incubator 조건에서 10% FBS, antibiotics가 첨가된 DMEM 배지가 함유되어 있는 100 mm culture dish에서 배양하였다. 충분히 증식된 후 배양 2일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline 용액으로 수세한 후 스크래퍼를 이용하여 긁어 계대 배양하였다.

Fibroblast cells는 37°C, 5% CO_2 incubator 조건에서 10% FBS, antibiotics가 첨가된 DMEM 배지로 배양하였다. 75 cm^2 flask(SPL, Korea)에서 충분히 증식시킨 후 배양

3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline 용액으로 수세한 다음 trypsin 용액을 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 3분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다.

Nitric oxide(NO) 측정

96-well plate에 RAW 264.7 cells를 5×10⁵ cell/mL 씩 넣어 CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 24시간 배양한 후 상등액을 제거하고 PBS로 수세한 후 각각의 시료 10, 50, 100 µg/mL을 첨가하였다. 시료 첨가 30분 후에 lipopolysaccharide(LPS) 100 ng/mL으로 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. Nitric oxide detection kit(Intron, Korea)를 사용하여 반응 완충제에 있는 sulfanilamide 50 µL넣고 10분 동안 반응시킨 후 안정 완충제에 있는 naphthylethylenediamine 50 µL를 넣고 10분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 sodium nitrite의 검량선으로부터 NO 대사물질인 nitrite의 생성정도를 산출하였다.

Lipid peroxide(LPO) 생성에 관한 영향 측정

시료의 hydrogen peroxide에 의한 과산화지질의 생성에 대한 효과를 알아보기 위해 Ohkawa *et al.*(1979)의 방법을 응용하여 실험하였다.

6 well plate(SPL, Korea)에 HNF 1×10⁶ cells/mL, HepG2 5×10⁶ cells/mL의 cell을 3 mL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 10, 50, 100 µg/mL과 FBS free DMEM에 녹인 200 µM H₂O₂를 각각의 well에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 PBS로 2회 수세한 후 스크래퍼를 이용하여 PBS 1 mL를 넣고 긁어냈다. 이것을 15 mL의 cornical tube에 담아 homogenizing 한 다음, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 취해 SMART micro protein assay BCA kit(intron, Korea)로 단백질을 정량한 후 새로운 1.5 mL tube에 옮겼다. 새로운 1.5mL tube에 SDS Lysis solution과 농도별 시료를 각각 100 µL 넣고 vortexing 한 후 5분 동안 실온에서 배양하여 TBA Reagent를 250 µL 넣고 95°C에서 60분간 incubation 시킨 후 얼음에서 5분 동안 식힌 다음 3000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 1.5 mL tube에 있는

농도별의 시료 상층액을 300 µL 취하고 n-butanol 300 µL을 넣고 혼합하여 vortexing 한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 한 다음 상층액 200 µL을 취하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였다.

세포독성검정

Fibroblast cell을 96 well plate에 1×10⁵ cell/mL을 100 µL 씩 넣고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline 용액으로 수세하였다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 10, 50, 100, 200, 400 µg/mL을 각 well에 처리한 후 24시간 배양하였다. 24시간 배양한 후에 상등액의 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline 용액으로 수세하였다. 2 mg/mL MTS와 1 mg/mL PMS을 DMEM에 녹인 후 각 well에 100 µL씩 처리하였다. 4시간 동안 배양한 후 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산하였다.

$$\text{Cell viability(\%)} = 100 \times \text{AC} / \text{AT}$$

AC : absorbance of control

AT : absorbance of tested extract solution

통계처리

통계처리는 Student T-test를 하였으며, P<0.05 및 P<0.01, P<0.001인 경우 유의성이 있는 것으로 인정하였다. 정상군에 대한 대조군의 유의성은 ‘*’ 대조군에 대한 각 처리군의 유의성은 ‘#’으로 표시하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량

폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며 한분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합을 하는 성질을 가지며 항암 및 항산화 효과와 같은 다양한 생리활성기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 2008). 산마늘 비발효 추출물(NF)과 발효추출물(FST)의 총 폴리페놀함량은 비

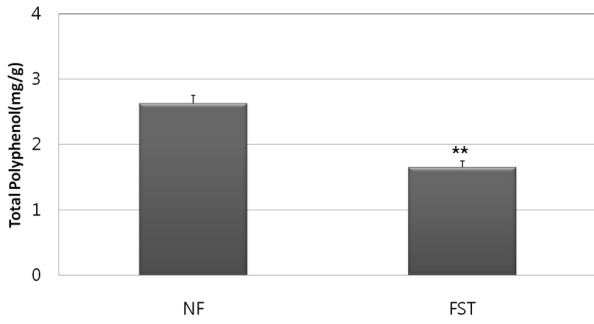


Fig. 1. Total polyphenol content of *A. victorialis* extract. NF : Not fermented, FST : Fermented with *S. thermophilus*. Each bar is the mean \pm S.E., from three independent experiment. Statistically significant value compared with control (NF) data by T-test. ** $p < 0.01$.

발효추출물(NF)에서 2.63 mg/g, 발효추출물(FST)에서 1.65 mg/g으로 나타났다. 이는 Lee *et al.*(2009b)이 연구한 만형자 186.69 mg/g보다 70배 이상 적은 수치이고, 구릿대 잎 95.23 mg/g(Lee, 2007), 사철쭉 78.7 mg/g(Choi *et al.*, 2008b), 민들레 51.95 mg/g(Heo and Wang, 2008) 등의 함량과 비교해서 극히 적은 양이지만, 우리가 식품으로 흔히 이용하는 머위 2.23 mg/g(Seo *et al.*, 2008), 마늘 3.7 mg/g(Jang *et al.*, 2008) 등과는 유사한 함량을 나타내었다. 발효추출물(FST)과 비발효추출물(NF)의 차이를 보면 발효 후 폴리페놀 함량이 감소하였는데, 송이버섯과 동충하초 균사체를 혼합 배양한 한방추출물의 생리활성연구에서 발효 전후에 차이가 없다고 한 보고(Lee *et al.*, 2008)와 탈지대두 발효 후에 폴리페놀함량이 증가한다는 보고(Lee *et al.*, 2009a)와 상이하였는데, 이는 재료간의 차이나 발효균주의 발효능과도 관련이 있을 것으로 생각되나 좀 더 자세한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

총 플라보노이드 함량

플라보노이드는 주로 anthocyanidins, flavonols, flavones, catechins 및 flavanones 등으로 구성되어 있으며, 그 구조에 따라 특정 플라보노이드는 항산화 및 항균성을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다(Middleton and Kandaswami, 1994; Nakagawa and Amano, 1974). 식물에 다량 존재하는 플라보노이드는 항산화작용, 순화기 질환 예방, 항염, 항알러지, 항균, 항 바이러스, 면역증강, 모세혈관 강 등 다양한 기능성 생리활성 효과를 보인다(Kawaguchi *et al.*, 1997). 산마늘 비발효추출물(NF)과 발효추출물(FST)의 총

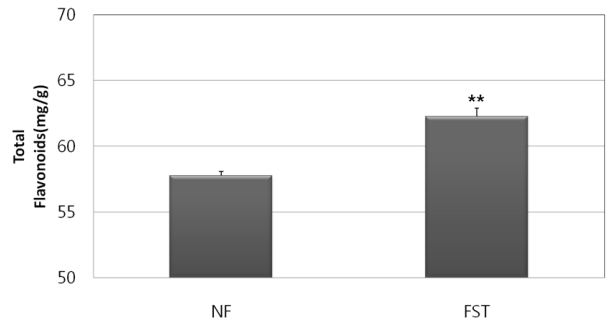


Fig. 2. Total flavonoid content of *A. victorialis* extract. NF: Not fermented, FST: fermented with *S. thermophilus*. Each bar is the mean \pm S.E., from three independent experiment. Statistically significant value compared with control data by T-test. ** $p < 0.01$.

플라보노이드함량은 비발효추출물(NF)에서 57.77 mg/g, 발효추출물(FST)에서 62.27 mg/g을 나타내어 발효 후에 함량이 증가하였는데 이러한 결과는 생더덕을 발효하면 생더덕 보다 플라보노이드 함량이 약 5배 높다는 결과(Park *et al.*, 2009)와 유사한 경향이며, 비파 110.3 mg/g(Lee and Kim, 2009), 자화지정 102.30 mg/g(Choi *et al.*, 2008a)의 절반정도에 미치는 함량이지만 만형자 31.05 mg/g(Lee *et al.*, 2009b), 인진쑥 20.86 mg/g(Jung *et al.*, 2008), 민들레 잎 20.57 mg/g(Heo and Wang, 2008) 보다는 훨씬 함량이 높았다.

전자공여능

전자공여능을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 그 중에서 DPPH가 항산화물질에 의해 탈색되는 원리를 이용하는 방법은 비교적 간단하면서도 대량으로 측정이 가능한 방법이다. 전자공여능은 활성라디칼에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라 인체 내에서 활성라디칼에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로 이용되고 있다(Choi and Oh, 1985). 산마늘의 발효추출물과 비발효 추출물의 mg/mL농도에서 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 비발효추출물(NF)은 82.29%, 발효추출물(FST)은 81.40%의 소거능을 나타내 대조군인 vitamin C 97.71%보다는 낮았지만, 비교적 높은 소거활성을 나타냈다(Fig. 3). 이러한 결과는 약용식물 물추출물의 mg/mL농도에서 오가피 71.8%, 음양곽 69.5%, 산수유 66.7%, 당귀 15.8%, 감초 13.3% 및 등글레 5.4%(Kim *et al.*, 2004) 등이나, 삼백초 56.1%(Seo *et al.*, 2008)나 더덕 17.9%

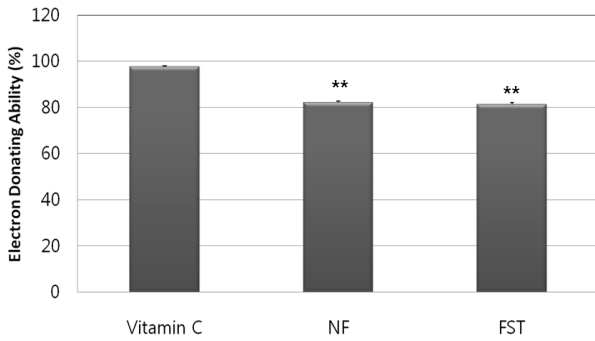


Fig. 3. Percentage of electron donating ability of *A. victorialis* extract. NF: Not Fermented, FST: Fermented with *S. thermophilus*. Each bar is the mean \pm S.E., from three independent experiment. Statistically significant value compared with control (Vitamin C) data by T-test. ** $p < 0.01$.

(Park *et al.*, 2009) 보다 훨씬 높은 것으로 산마늘 추출물의 DPPH free radical 소거활성이 우수한 것으로 판단되며, 발효유무와는 관계가 없었다. 그러나 Park *et al.*(2009)은 발효더덕의 DPPH free radical 소거활성이 생더덕 보다 4배 더 높았다고 보고하였고, Shon(2007)은 복령과 후박의 버섯균사체 발효물은 DPPH free radical 소거활성이 더 낮았다고 보고하였으나, 본 연구에서는 발효유무와 관계가 없었는데 이것은 발효 균주나 발효 대상이 다르기 때문인 것으로 추측된다.

아질산염 소거작용

Nitrite는 발암에 관련된 물질로 독성이 있고, 일정농도 이상 섭취할 경우, 식품내의 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine이 생성되는데(Park *et al.*, 2009), 동물실험결과 대부분 발암성을 나타내는 것으로 밝혀져 있다(Hong *et al.*, 2004). 산마늘의 비발효추출물(NF), 발효추출물(FST) 및 BHT의 아질산염 소거활성을 조사한 결과, pH 2.5에서는 비발효추출물(NF)은 38.74%, 발효추출물(FST)은 38.58%로 BHT 48.58%보다 낮았고, pH 4.2에서는 비발효추출물(NF)이 30.72%로 BHT 26.14%보다 높게 나타났으며, 발효추출물(FST)은 22.54%로 나타나 발효추출물(FST) 보다 비발효추출물(NF)의 아질산염 소거활성이 높았고(Fig. 4), pH 2.5에서 pH 4.2에서 보다 아질산염 소거능이 높았다. 이러한 결과는 발효 술잎 추출물(Hong *et al.*, 2004)이나 발효 된장(Oh and Kim, 2007)의 아질산염 소거능이 무발효물 보다 더 우수하다는 결과와는 차이

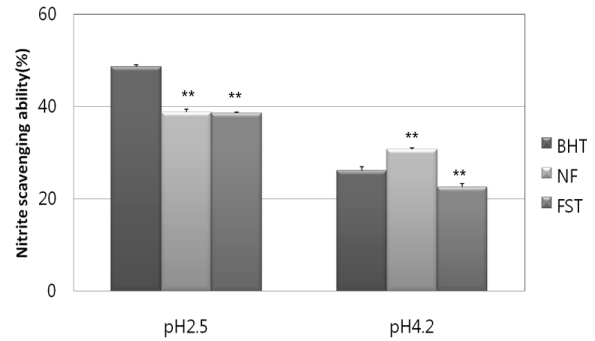


Fig. 4. Percentage of nitrite scavenging ability of the *A. victorialis* extract. NF: Not fermented, FST: Fermented with *S. thermophilus*. Each bar is the mean \pm S.E., from three independent experiment. Statistically significant value compared with control (BHT) data by T-test. ** $p < 0.01$.

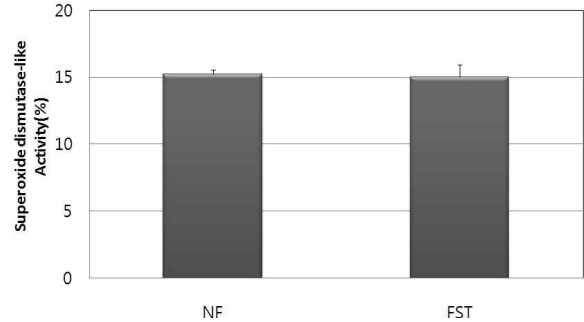


Fig. 5. Percentage of superoxide dismutase-like activity of *A. victorialis* extract. NF: Not fermented, FST: Fermented with *S. thermophilus*. Each bar is the mean \pm S.E., from three independent experiment.

가 있었으나, pH가 낮을수록 아질산염소거능이 우수하다는 보고들과는 일치하였다(Lee *et al.*, 2009b; Jang *et al.*, 2008; Bae *et al.*, 2002).

SOD 유사활성

SOD는 생체에 매우 유해한 superoxide anion radical 과 반응하여 과산화수소를 생산하는 효소로 생체 내에서 활성산소 장애에 대한 방어 작용을 하는 대표적인 활성산소저해제로 보고되어 있다(Baehner *et al.*, 1975). SOD 유사활성 물질은 효소는 아니지만 주로 phytochemical에 속하는 저분자 물질이 SOD와 유사한 역할을 하여 superoxide의 반응성을 억제하며 superoxide로부터 생체를 보호한다(Kitani *et al.*, 2002). 산마늘의 비발효추출물(NF)과 발효추출물(FST)의 SOD 유사활성을 조사한 결과 비발효추

출물(NF)에서 15.23%, 발효추출물(FST)에서 15.00%를 나타내어 발효 전후에 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 5). 산마늘 추출물의 SOD 유사활성능은 만형자 83.40%(Lee *et al.*, 2009b), 머위 96.7%, 짚신나물 94.4%, 삼백초 84.9%(Seo *et al.*, 2008) 및 연잎 66.19%(Lim *et al.*, 2008) 등과 비교하면 상당히 낮은 수치로 SOD 유사 활성물질로서의 이용성은 크지 않을 것으로 사료된다.

Nitric oxide(NO) 생성능

Nitric oxide(NO)는 혈액응고 및 혈압조절 기능, 암세포에 대한 면역 기능 등이 있지만, 과량이 존재하면 인체에 유해한 영향을 미치게 되어 세포손상 뿐만 아니라 염증 반응을 비롯한 뇌막염, 알츠하이머병과 파킨슨병 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다(Lee and Kim, 2009). 100 ng/mL LPS농도로 활성화된 Raw 264.7 cell에 산마늘 비발효추출물(NF)과 발효추출물(FST)을 농도별로 첨가하여 NO 생성율을 조사한 결과, 비발효추출물(NF)은 10 및 50 µg/mL농도에서 대조군인 LPS처리구 보다 높았으나 100 µg/mL농도에서는 96.9%로 약간 낮아졌다. 반면에 발효추출물(FST)은 10, 50 및 100 µg/mL농도에서 각각 87.16%, 88.5%, 85.6%로 농도의존적으로 NO생성이 억제되었으며 비발효추출물(NF) 보다 NO 생성율이 낮아(Fig. 6) 발효추출물(FST)이 NO 생성 억제에 더 효과적이라고 할 수 있다. Han *et al.*(2008)은 애엽 발효물의 10 µg/mL이상 농도에서는 NO 생성이 감소하지만, 200 µg/mL에서는 감소하지 않았다고 보고하

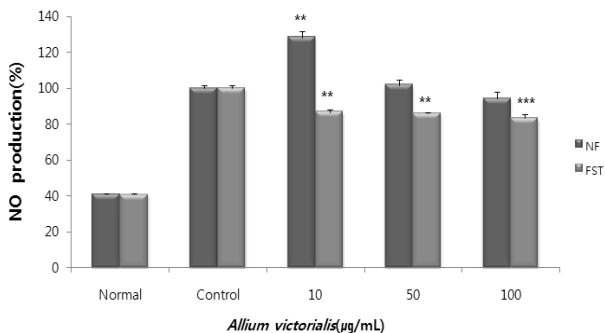


Fig. 6. Percentage of NO production at a various cultural concentration of *A. victorialis* extract in Raw 264.7 cell. NF: Not fermented, FST: Fermented with *S. thermophilus*. Each bar is the mean ± S.E., from three independent experiment. Statistically significant value compared with control data by T-test. **p<0.01, ***p<0.001.

여 본 연구와는 다른 경향이였다.

Lipid peroxide(LPO) 생성에 관한 영향

LPO는 세포막의 지질성분이 독성물질들에 의해서 손상을 받게 되면 지질성분의 산화반응이 촉진되어 나타나는 반응산물로 LPO함량은 생체 조직 중에서 생화학적 조직 손상의 척도로 널리 이용되며 조직의 산화적 손상에 의해 야기되는 병리현상의 척도로 활용되어진다. 활성산소에 의해 생성된 과산화지질은 피부에 유해한 대표적인 물질로 불포화지방산이 산소를 흡수하여 산화되어 생기고, 이것이 증가하면 피부섬유가 취약해져 주름살 색소 침착 등의 피부노화가 발생하며 뇌조직에 산화적 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다(Halliwell, 1987; Yu, 1993). 섬유아세포에 대하여 hydrogen peroxide에 의해 유도된 LPO의 지표 물질인 MDA 함량을 측정된 결과 추출물을 10, 50, 100 µg/mL 농도로 첨가했을 때 MDA 함량은 비발효추출물(NF)에서 각각 7.61, 6.61, 6.27 nmole/mg protein, 발효추출물(FST)에서 각각 7.14, 6.63, 6.24 nmole/mg protein로 농도가 증가할수록 MDA 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 비발효추출물(NF)과 발효추출물(FST)에서 100 µg/mL 농도 일 때 가장 우수한 항산화 효과를 나타내었다(Fig. 7). 산마늘 추출물의 지질과산화 억제작용은 정상세포(5.43 nmole/mg protein)수준에는 미치지 못하지만 모든 추출물의 발효 유무와 관계없이 모든 농도에서 우수한 효과를 나타내었다.

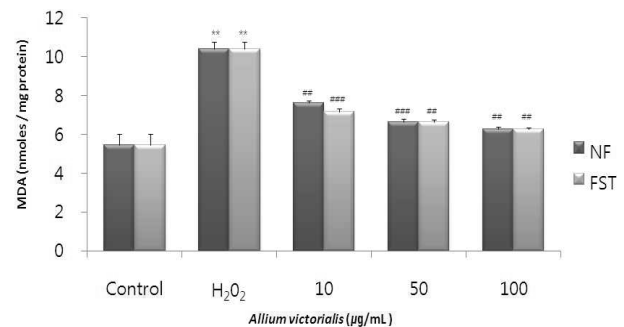


Fig. 7. Production of MDA at various concentration of *A. victorialis* extract in fibroblast cell. NF: Not fermented, FST: Fermented with *S. thermophilus*. Each bar is the mean ± S.E., from three independent experiment. Statistically significant value compared with control data by T-test. *,# p<0.05, **,### p<0.01, ### p<0.001. # vs H₂O₂, * vs control.

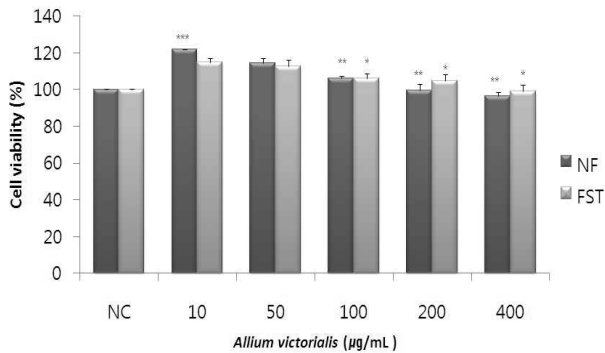


Fig. 8. Percentage of fibroblast cell viability at various concentration of *A. victorialis* extract. NF: Not fermented, FST: Fermented with *S. thermophilus*. Each bar is the mean \pm S.E. from three independent experiment. Statistically significant value compared with control (NC) data by T-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Fibroblast cell의 생존율

산마늘 추출물의 농도별 첨가에 따른 섬유아세포의 생존율을 조사한 결과, 10 µg/mL 농도에서 비발효추출물(NF)은 121.78%, 발효추출물(FST)은 115.02%의 세포생존율을 나타냈으며 400 µg/mL 농도에서도 비발효추출물(NF) 96.47%, 발효추출물(FST) 98.95%의 생존율을 보여 향후 산마늘의 각종 소재로 이용시에도 큰 문제가 없을 것임을 시사하고 있으며, 발효의 유무와 생존율과는 거의 차이가 없었다.

적 요

산마늘 잎 에탄올추출물을 *Streptococcus thermophilus*를 이용하여 발효시킨 후 항산화활성 및 세포독성을 검정한 결과, 총 폴리페놀 함량은 발효 전에는 2.63 mg/g, 발효 후에는 1.65 mg/g이었으며 발효 후 함량이 감소하였고, 플라보노이드 함량은 발효 전에는 57.77 mg/g, 발효 후에는 62.27 mg/g으로 발효 후에 증가하였다. 전자공여능은 발효 전에는 82.29%, 발효 후에는 81.40%로 vitamin C (97.71%) 보다 낮았으나 우수한 활성을 나타냈으며, 아질산염소거능은 발효전 후 추출물 모두 pH 2.5에서는 BHT 보다는 낮지만 활성이 우수하였고, pH 4.2에서는 발효하지 않았을 때 BHT보다 더 좋은 활성을 나타냈으며, SOD 유사활성능은 15% 정도로 낮은 효과를 나타냈다. NO 생성능은 발효 전에 오히려 더 많은 NO를 생성하였고 발효 후에는 생성이 억제되었다. 산마늘 추출물이 LPO 생성에 미

치는 영향은 H₂O₂ 처리군에 비하여 발효 여부와 관련 없이 산마늘 추출물치리에 따라 농도가 증가할수록 MDA 함량이 감소하여 LPO 생성을 억제하는 것으로 나타났으며, 섬유아세포의 생존율은 산마늘 추출물 처리 농도의 증가에 따라 약간 감소하는 경향이나 대조구와 차이가 거의 없었다.

사 사

이 논문은 2009년도 산림청 산림과학기술개발사업(과제번호:S120910L140110)의 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Bae, Y.I., C.H. Jeong and K.H. Shim. 2002. Nitrite-scavenging and antimutagenic effect of various solvent extract from different parts of loquat (*Eriobotrya japonica*, Lindl). Kor. J. of Food Preservation. 9:92-96 (in Korean).
- Baehner, R.L., S.K. Murrmann, J. Davis and R.B.Jr. Johnson. 1975. The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in phagocytosis-associated oxidative metabolic reactions. J. Clin Invest. 56:571-576.
- Boo, H.O., H.H. Lee, J.W. Lee, S.J. Hwang and S.U. Park. 2009. Different of total phenolics and flavonoids, radical scavenging activities and nitrite scavenging effects of *Momordica charantia* L. according to cultivars. Kor. J. of Medicinal Crop Sci. 17:15-20 (in Korean).
- Choi, B.D., C.S. Park and E.Y. Joo. 2008a. Physiological activities of Korean and Chinese *Viola mandshurica* extracts. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 37:1101-1108 (in Korean).
- Choi, J.H. and S.K. Oh. 1985. Studies on the antiaging of Korean ginseng. Korean J. Food. Sci. Technol. 17:506-515 (in Korean).
- Choi, J.W., K.T. Lee, W.B. Kim, K.K. Park, W.Y. Chung, J.H. Lee, S.C. Lim, H.J. Jung and H.J. Park. 2005. Effect of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* leaves on triton WR-1339-induced and poloxamer-407-induced hyperlipidemic rats and on diet-induced obesity rats. Kor. J. Pharmacogn. 36:109-115 (in Korean).
- Choi, S.R., D.H. You, J.Y. Kim, C.B. Park, J. Ryu, D.H. Kim and J.S. Eun 2008b. Antioxidant and antimicrobial

- activities of *Artemisia capillaris* Thunberg. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 16:112-117 (in Korean).
- Chung, H.S. 2001. Isolation of new bioactive phytochemicals from natural products. Food Industry and Nutrition 6:53-59 (in Korean).
- Cross, E.E., B. Halliwell, E.T. Borish, W.A. Pryor, B.N. Ames, R.L. Saul and J.M. McCord. 1987. Oxygen radicals and human disease (clinical conference). Ann. Intren. Med. 107:526-545.
- Duh, P.D., Y.Y. Tu and G.C. Yen 1999. Antioxidant activity of water extract of Harg Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). Lebensm Wiss Technol. 32:269-277 (in Korean).
- Folin, O. and W. Denis 1915. A colorimetric method for determination of phenols (phenol derivatives) in urine. J. Biol. Chem. 22:305-308.
- Halliwell B. 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. Fase. J. 1:258-364.
- Ham, S.S., C.B. Cui, H.T. Choi and D.S. Lee. 2004. Antimutagenic and cytotoxic effects of *Allium victorialis* extracts. Kor. J. Food Preservation. 11:221 (in Korean).
- Han, H.S., W.S. Park and Y.J. Lee. 2008. Studies on the immunomodulating activity of fermented Artemisiae Argyi Folium extract. Kor. J. Herbology 23:103-112 (in Korean).
- Heo, S.I. and M.H. Wang. 2008. Antioxidant activity and cytotoxicity effect of extracts from *Taraxacum mongolicum* H. Kor. J. Pharmacogn. 39:255-259 (in Korean).
- Hong, G.T., Y.R. Lee, M.H. Yim and C.N. Hyun. 2004. Physiological functionality and nitrite scavenging ability of fermentation extracts from pine needles. Kor. J. Food Preserv. 11:94-99 (in Korean).
- Jang, E.K., J.H. Seo and S.P. Lee. 2008. Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. Kor. J. Food Sci. Technol. 40:443-448 (in Korean).
- Joo, E.Y., Y.S. Lee and N.W. Kim. 2007. Polyphenol compound contents and physiological activities in various extracts of the *Vitex rotundifolia* stems. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 36:813-818 (in Korean).
- Jung, M.H., Y. Yin, S.I. Heo and M.H. Wang. 2008. Antioxidant and anticancer activities of extract from *Artemisia capillaries*. Kor. J. Pharmacogn. 39:194-198 (in Korean).
- Kato, H., I.E. Lee, N.V. Chuyen, S.B. Kim and F. Hayase. 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidines. Agric. Biol. Chem. Tokyo 51:1333-1338.
- Kawaguchi, K., T. Mizuno, K. Aida and K. Uchino. 1997. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and pseudomonas. Biosci. Biotech. and Biochem. 61:102-104.
- Kedziora, J. and G. Bartosz. 1998. Down's syndrome: a pathway involving the lack of balance of reactive oxygen species. Free Radic. Biol. Med. 4:317-330.
- Kim, E.Y., I.H. Baik, J.H. Kim, S.R. Kim and M.R. Rhyu. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. Kor. J. Food Sci. Technol. 36:333-338.
- Kim, J.Y., J.A. Lee, K.N. Kim, G.P. Song and S.Y. Park. 2007. Antioxidative and antimicrobial activities of *Euphorbia helioscopia* extracts. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 36:1106-1112 (in Korean).
- Kim, T.G., S.H. Kim, S.Y. Kang, K.K. Jung, D.H. Choi, Y.B. Park, J.H. Ryu and H.M. Han. 2000. Antiatherogenic effect of the extract of *Allium victorialis* on the experimental atherosclerosis in the rabbit and transgenic mouse. Kor. J. Pharmacogn. 31:149-156 (in Korean).
- Kim, W.B., J.K. Kim, E.A. Lee, B.H. Kim and H.T. Lim. 1996. Intraspecific variations of the *Allium victorialis* var. *platyphyllum* by polymerase chain reaction. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38:129-132 (in Korean).
- Kitani, K., C. Minami, T. Amamoto, S. Kanai, G.O. Ivy and M.C. Carrillo. 2002. Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders: potentials of propargylamines for human use. Ann. N. Y. Acad. Sci. 959:295-307.
- Lee, E.S. 2008. Effect of AVP (*Allium victorialis* var. *palatyphyllum*) extract on the apoptosis in human hepatoma cell. Duksung women's university. p. 44 (in Korean).
- Lee, H.B., H.J. Kim, M.S. Chong, H.U. Cho, Y.H. Choi, K.S. Lim and K.N. Lee. 2008. Physiological activity of extracts from mixed culture of medical herbs and mycelia of *Tricholoma matsutake* and *Cordyceps militaris* by fermentation. Kor. J. Herbology 23:1-8 (in Korean).
- Lee, H.J., S.K. Lee, Y.J. Choi, H.J. Jo, H.Y. Kang, S.S. Lee and D.H. Choi. 2007. Extractives from the *Allium*

- victorialis*. J. Kor. For. Soc. 96:620-624 (in Korean).
- Lee, K.I. and S.M. Kim. 2009. Antioxidative and antimicrobial activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaf extracts. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 38:267-273 (in Korean).
- Lee, S.G., H.J. Kim, S.P. Lee and I.S. Lee. 2009a. Antioxidant and anticancer activities of defatted soybean grits fermented by *Bacillus subtilis* NUCI. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 38:657-662 (in Korean).
- Lee, S.S., S.H. Moon, H.J. Lee, D.H. Choi and M.H. Cho. 2004. Cholesterol inhibitory activities of kaempferol and quercetin isolated from *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. Mokchae Konghak. 32:17-27 (in Korean).
- Lee, Y.S. 2007. Antioxidative and physiological activity of extracts of *Angelica dahurica* leaves. Kor. J. Food Preserv. 14:78-86 (in Korean).
- Lee, Y.S., B.D. Choi, E.Y. Joo and S.R. Shin. 2009b. Antioxidative activities and tyrosinase inhibition ability in various extracts of the *Vitex rotundifolia* seeds. Kor. J. Food. Preserv. 16:101-108 (in Korean).
- Leong, L.P. and G. Shui. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in singapore markets. Food Chemistry. 76:69-75.
- Lim, J.A., E.S. Lee and S.H. Baek. 2008. Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of ethanol extract from *Nelumbo nucifera* leaves. Kor. J. Oriental Physiology & Pathology 22:654-659 (in Korean).
- Marklund, S. and G. Marklund. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 47:468-474.
- Marnett, L.J. 1987. Peroxyl free radicals: Potential mediators of tumor initiation and promotion. Carcinogenesis 8:1365-1373.
- Middleton, E. and C. Kandaswami. 1994. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. Food Tech. 48:115-119.
- Nakagawa, M. and I. Amano. 1974. Evaluation method of green tea grade by nitrogen analysis. J. of Japanese Food Sci. and Tech. 21:57-63.
- Nishimura, H., C.H. Wijaya and J. Mizutani. 1998. Volatile flavor components and antithrombotic agents: Vinylthiols from *Allium victorialis* L. J. Agric. Food Chem. 36:563-566.
- Oh, H.J. and C.S. Kim. 2007. Antioxidant and nitrite scavenging ability of fermented soybean foods (chungkukjang, Doenjang). J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 36:1503-1510 (in Korean).
- Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. Jun. 95:351-8.
- Park, S.J., S.W. Song, D.H. Seong, D.S. Park, S.S. Kim, J.Y. Gou, J.H. Ahn, W.B. Yoon and H.Y. Lee. 2009. Biological activities in the extract of fermented *Codonopsis lanceolata*. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 38:983-988 (in Korean).
- Park, S.N. 1997. Skin aging and antioxidants. J. Soc. Cos. Chem. Kor. 23:75-132 (in Korean).
- Patt, J., A.H. Harken, L.K. Burton, T.C. Rodell, D. Piernareei, W.J. Schorr, N.B. Parker, E.M. Berger, I.R. Horesh, L.S. Terada, S.I. Linas, J.C. Cheronis and J.E. Repine. 1988. Xanthine oxidase derived hydrogen peroxide contributes to reperfusion induced edema in gebril brains. J. Clin. Invest. 81:1556-1562.
- Seo, H.S., B.H. Chung and Y.G. Cho. 2008. Antioxidant and anticancer effects of agrimony (*Agrimonia pilosa* L.) and chinese lizardtail (*Saururus chinenses* Baill). Kor. J. Medicinal Crop Sci. 16:139-143 (in Korean).
- Shon, M.Y. 2007. Antioxidant and anticancer activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* fermented with mycelial mushrooms. Food Industry and Nutrition. 12:51-57 (in Korean).
- Woo, J.H., H.S. Jeong, J.S. Yu, Y.D. Chang and C.H. Lee. 2008. Antioxidant effect of extracts obtained from four aster species native to korea. Korean J. Plant Res. 21:52-59 (in Korean).
- Yen, G.C. and C.L. Hsieh. 1998. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in vitro*. J. Agric. Food Chem. 46: 3431-3436 (in Korean).
- Yu, B.P. 1993. Oxidative damage by free radicals and lipid peroxidation in aging. In : Yu B.P. Free radicals in aging. CRC Press, Boca Raton. 57-88.
- Zhishen, J., T. Mengcheng and W. Jianming. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64:555-559.

(접수일 2010.8.24; 수락일 2010.11.17)