

유산균 발효에 의한 사물탕들부터 노다케네틴의 분리 및 함량분석

김동선¹ · 노주환¹, 조장원², 마진열^{1*}

1 : 한국한의학연구원 한의신약연구그룹, 2 : 한국식품연구원

Analysis of Nodakenetin from Samultangs Fermented by Lactose Bacteria Strains

Dong-Seon Kim¹ · Joo-Hwan Roh¹, Chang-Won Cho² and Jin Yeul Ma^{1*}

1 : TKM-Based Herbal Drug Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea,

2 : Regional Food Industry Research Group, Korea Food Research Institute, Sungnam-Si, Kyeonggi-Do 463-746, Korea.

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the changes in the contents of constituents in Samultang and its fermentations with 10 species of lactic acid bacteria.

Methods : Ten strains of lactic acid bacteria, *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. amylophilus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. casei*, *B. breve*, and *B. thermophilum*, were used for the fermentation of Samultang. The increased and decreased constituents were identified using HPLC/DAD and various liquid chromatographic techniques, and the structure was elucidated using NMR and MS. These compounds were quantitatively analyzed using an HPLC/DAD system.

Results : A remarkably increased component was identified to be nodakenetin and a decreased component was determined to be nodakenin. The fermentation of the ten lactic acid bacteria demonstrated that the decomposable rate of these two compounds in fermented Samultang were different. Samultang fermented by *L. plantarum* showed the most remarkable changes.

Conclusion : Nodakenetin was identified as bioconversion component after fermentation and *L. plantarum* was discovered the best bacteria to increase the component.

Key words : Samultang, fermentation, herbal medicine, bioconversion, nodakenetin, nodakenin.

서 론

사물탕(四物湯)은 동의보감(東醫寶鑑)¹⁾에 혈병(血餅)의 통치약(痛治藥)이라고 되어 있으며, 피부가 건조하고, 혈색이 나쁜 체질, 피로회복, 월경불순, 냉증, 동상(凍傷)을 위한 처방으로 사용되고 있다²⁾. 사물탕은 당귀, 천궁, 작약 및 숙지황으로 구성되며¹⁾, 효능연구로는 심혈관 기능 및 혈액순환 개선, 빈혈 개선, 뇌조직 및 신경 보호, 면역조절, 항암, 스트레스 억제, 방사선 보호, 운동피로 회복, 염증 및 알러지 억제, 항산화 활성과 등이 보고되어 있다³⁾.

최근 장내 미생물을 이용하여, 한약의 효능을 증가시키거나 새로운 효능을 도출하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다⁴⁻⁷⁾.

본 연구에서는 유산균을 사용하여 발효사물탕들을 제조하고, 제조된 발효사물탕으로부터 주요 생물전환성분을 분리하여, 그 구조를 확인하고, 균주변화에 따른 이들 성분들의 함량을 비교 하여, 우수한 균주를 선별하고자 하였다.

재료 및 실험방법

1. 실험재료 및 기기

사물탕의 제조에 사용한 당귀, 천궁, 작약은 영천현대약업사, 숙지황은 진영제약으로부터 구매하였다. HPLC 분석을 위한 acetonitrile과 water는 HPLC용 특급용매로, trifluoroacetic

*교신저자 : 마진열. 대전광역시 유성구 전민동 461-24.

· Tel : +82-42-868-9466. · Fax : +82-42-868-9573. · E-mail : jyma@kiom.re.kr.

· 접수 : 2011년 12월 9일 · 수정 : 2012년 1월 4일 · 채택 : 2012년 1월 13일

acid(TFA)는 분석용 등급의 용매로 각각 J.T. Baker(USA)와 (주)대정화학에서 구입하였다. nodakenin은 한국식품의약품안전청에서 구입하였으며, nodakenetin은 직접분리하여 사용하였고, 이때 순도는 99.0+% (UV-Vis) 이었다. 분석 및 분취를 위한 HPLC는 Waters 2695 및 996 photodiode array detector에 의하여 수행되었다. NMR spectrum은 Varian사의 INOVA system (^1H 및 ^{13}C , 각각 400MHz 및 100 MHz)에서 CDCl_3 를 용매로 사용하여 측정하였다. ESI-MS data는 Shimadzu사의 ESI-IT-TOFMS에 의하여 얻어졌다.

2. 사물탕의 조제

사물탕은 동의보감(東醫寶鑑)을 기본으로 하여 당귀, 천궁, 작약 및 숙지황 각각 469 g으로 구성된 약재 1,876 g에 생수(무학, 산청) 18.76ℓ 를 넣어 1시간 침적한 다음 180분간 열탕 추출한 후 test sieve (106 μm , Retsch, Germany)로 여과하였다. 제조된 탕액 10 ℓ 는 발효사물탕들의 제조에 사용하였고, 나머지는 동결건조하여 발효사물탕의 생물전환성분 확인을 위한 대조군으로 사용하였다.

3. 발효사물탕의 조제

사물탕의 발효에 사용된 10종의 유산균(*Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. amylophilus*, *L. curvatus*, *L. acidophilus*, *L. confusus*, *L. brevis*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium breve*)은 한국식품연구원 (Korea Food Research Institute : KFRI, Seongnam, Korea) 식품미생물 유전자은행에서 분양 받았다. *Lactobacillus* spp.는 MRS broth(Difco, Detroit, MI, USA)에서, *B. breve*는 Reinforced Clostridial Medium(Difco)에서 계대 배양한 뒤 초기균수를 1×10^6 CFU/mL로 조절하여 inoculum으로 사용하였다. 발효는 1 M NaOH로 사물탕의 pH를 8.0으로 조정 후, 121°C, 1.5 기압에서 15분간 가압멸균하고, 상온까지 냉각시킨 후, 유산균을 1%(v/v)로 접종하고 37°C의 항온배양기에서 48시간 동안 통기 배양하여 사물탕을 발효하였다.

4. 생물전환성분의 탐색

사물탕과 발효사물탕들을 각각 50 mg/ml로 메탄올에 용해하고, PVDF syringe filter를 사용하여 여과한 후 HPLC로 분석하여 발효 후 피크면적이 50% 이상 증가, 감소 또는 새롭게 나타난 피크들을 탐색하였다. HPLC분석은 Optima pak C18 column (5 μm , 4.6 mm x 250 mm)을 사용하여 수행되었으며, 칼럼의 온도는 35°C로 유지하였고, 검출은 PDA detector를 사용하였다. 이동상은 발효 후 새로운 피크가 발견되는 다양한 이동상 조건을 탐색하여, acetonitrile (A) 및 0.1% TFA 함유 water (B)를 이용한 gradient system으로 Table 1과 같이 최적화 하였고, 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 20 μl 로 하였다.

Table 1. Eluent condition for HPLC analysis

Time (min)	Acetonitrile	water (0.1% TFA)
0	10	90
10	30	70
45	50	50
55	70	30
65	75	25
75	10	90
85	10	90

5. 생물전환성분의 분리

*L. plantarum*으로 발효하여 얻어진 발효사물탕의 동결건조 분말 20 g을 D101 resin 800 g으로 칼럼크로마토그래피를 실시하였다. 이때 이동상 용매는 water : EtOH=9 : 1로부터 100% EtOH 까지 함량을 증가시키면서 유출하여 9개의 분획물 (Fr. 1 ~ Fr. 9)을 얻었다. 각 분획물을 PVDF syringe filter를 사용하여 여과한 후 HPLC로 위에 기술된 조건으로 생물전환성분들의 피크들이 함유된 분획물들을 확인하였다.

HPLC/DAD로 확인하여, 생물전환성분을 함유하는 분획물 Fr. 7을 회전식증발농축기로 감압건조한 후, 메탄올에 100 mg/ml의 농도로 용해하여 분취용 HPLC로 분리하였다. HPLC를 사용한 분취는 Supleco C18 column (10 μm , 10 mm x 250 mm)을 사용하여 수행되었으며, 칼럼의 온도는 35°C로 유지하였고, 검출은 PDA detector를 사용하였다. 유속은 5 ml/min, 주입량은 100 μl 로 하였다. 이동상은 acetonitrile : water (0.1% TFA 함유) = 25 : 75의 isocratic 으로 하여 분리하였다. 12.1분의 retention time에서의 성분을 20회 분취하여 모아 감압 건조하여 화합물 1 (2.3 mg)을 얻었다.

화합물 1

White powder ; ESI-MS m/z 247 $[\text{M}+\text{H}]^+$, ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.60 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-4), 7.22 (1H, s, H-5), 6.74 (1H, s, H-8), 6.21 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-3), 4.74 (1H, dd, $J=9.5, 8.5$ Hz, H-2'), 3.25 (1H, dd, $J=15.5, 8.5$ Hz, H-3'a), 3.19 (1H, dd, $J=15.5, 9.5$ Hz, H-3'b), 1.40 (3H, s, CH_3), 1.24(3H,s, CH_3) ; ^{13}C -NMR(75.5 MHz, CDCl_3) δ : 163.4 (C-2), 161.5 (C-7), 155.9 (C-10), 143.9 (C-4), 125.3 (C-6), 123.6 (C-5), 113.0 (C-9), 112.5 (C-3), 98.1 (C-8), 91.3 (C-2'), 71.9 (C-4'), 29.7 (C-3'), 26.3 (CH_3), 24.5(CH_3).

6. 균주들에 따른 사물탕들의 생물전환성분들의 함량분석

발효 사물탕의 정량분석은 HPLC를 사용하여 생물전환성분 탐색을 위하여 최적화된 조건과 동일한 조건으로 분석하였다. Nodakenin과 nodakenetin은 모두 335 nm에서 검출된 UV-Vis. 흡광도를 정량분석을 위하여 사용하였다. 표준품은 0.781, 3.125, 12.5, 50.0, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 제조하고, 발효전 및 발효 후 사물탕 시료들의 농도는 50 mg/ml 로 하여 HPLC 분석을 시행한 후 표준품의 양과 peak area사이의 상관관계를 도출하여 검량선을 작성하여 계산하였다.

결과 및 고찰

1. HPLC-DAD 분석을 통한 생물전환성분의 탐색 및 분리

사물탕으로부터 유산균들을 이용하여 10종의 발효사물탕들이 제조되었고, 이들의 성분변화를 HPLC-DAD로 분석하여 발효 후 증가 또는 감소된 피크들을 탐색한 결과, 단

지 16.7 min의 retention time에서 뚜렷하게 증가된 피크가 관찰된 반면, 11.4 min에서 감소된 피크를 확인하였다 (Fig. 1).

D101 resin 칼럼크로마토그래피와 semi-preparative HPLC를 실시하여, 증가된 성분을 분리 한 결과 화합물 1을 분리하였다.

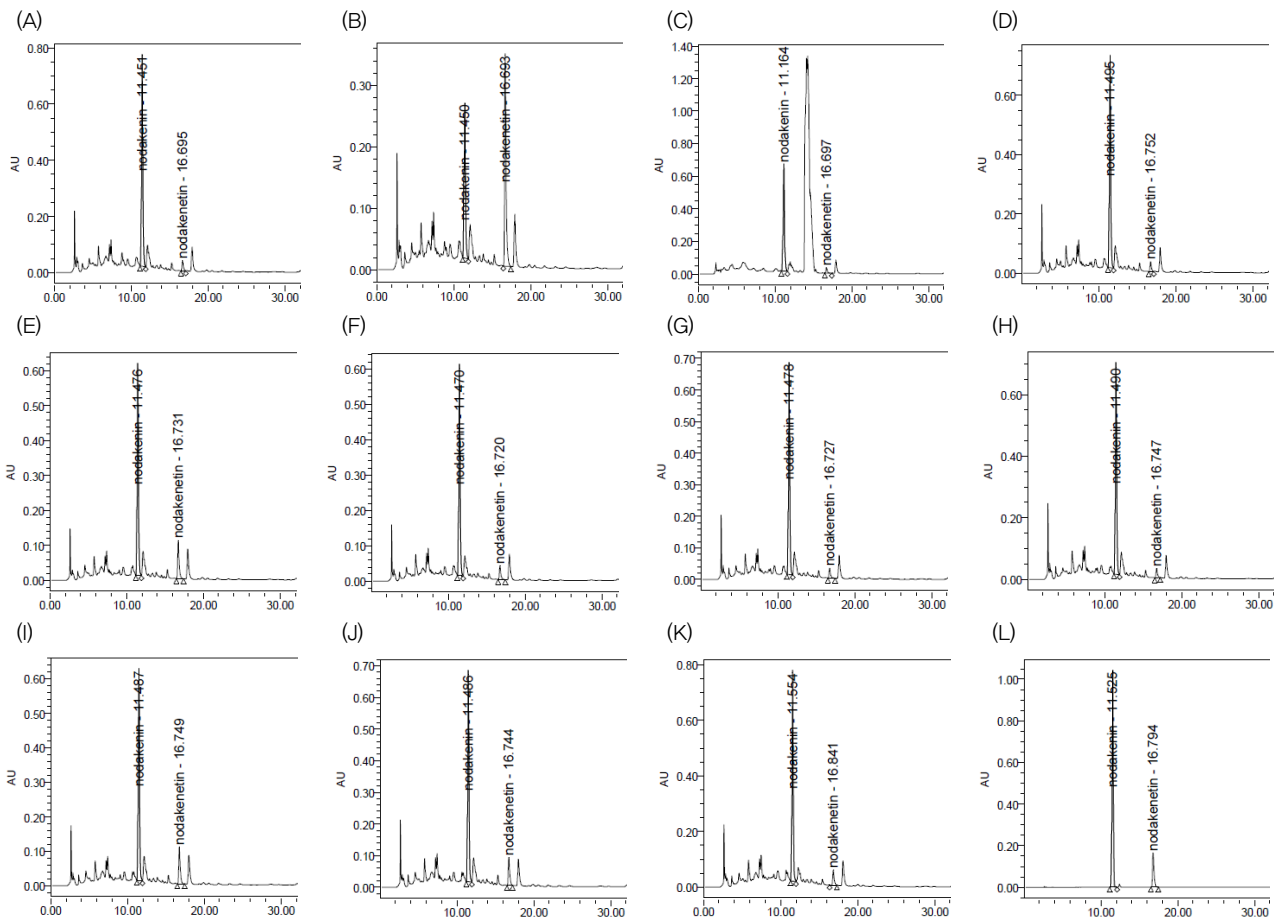


Fig. 1. Analytical HPLC chromatograms of Samul-tangs (SMT) before and after fermentation with lactic acid bacteria strains. (A) SMT ; (B) SMT fermented with *L. casei* ; (C) SMT fermented with *L. plantarum* ; (D) SMT fermented with *L. acidophilus* ; (E) SMT fermented with *L. amylophilus* ; (F) SMT fermented with *L. curvatus* ; (G) SMT fermented with *L. acidophilus* ; (H) SMT fermented with *L. confusus* ; (I) SMT fermented with *L. brevis* ; (J) SMT fermented with *L. acidophilus* ; (K) BJT fermented with *B. breve* ; (L) nodakenin and nodakenetin

2. 생물전환성분들의 구조 확인

분리된 화합물 1은 무색분말로 ESI-MS 스펙트럼에서 m/z 247[M+H]⁺를 관찰하여 분자량이 246 임을 알 수 있었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 doublet($J=8.5$ Hz)으로 서로 coupling하고 있는 δ 6.21(H-3)과 7.60(H-4)의 olefinic signal들, δ 6.74(H-8)와 7.22(H-5)에서의 olefinic singlet signal들, aliphatic 영역에서 서로 coupling($J=15.5$ Hz)하고 있는 δ 3.25(H-3'a)와 3.19(H-3'b)에서의 double doublet signal들, 또한 이들과 서로 coupling($J=9.5, 8.5$ Hz)하고 있는 δ 4.74(H-2')에서의 double doublet signal들, 그리고 ¹³C-NMR 스펙트럼

에서 δ 163.4(C-2), 112.5(C-3) 및 143.9(C-4)에서의 olefinic carbon들과 29.7(C-3')에서의 aliphatic carbon 으로부터 pyranocoumarin으로 추정하였다. 이러한 정보로부터 사물탕의 구성성분에 대하여 검토한 결과, 용이하게 nodakenetin의 구조가 도출되었고, 참고문헌(8, 9)의 ¹H과 ¹³C-NMR 데이터를 비교하고, 일치함을 확인하여 nodakenetin (Fig. 2)으로 동정하였다.

발효 후 감소된 성분은 화합물 1과 동일한 PDA spectrum (λ max₁ 203 nm, λ max₂ 335 nm)을 나타내고, C18-역상칼럼에서 상대적으로 이른 retention time에서 출현함에 따라, nodakenetin의 배당체로 추정되어, 표준품과 비교한 결과 nodakenin(Fig. 2)으로 확인 하였다.

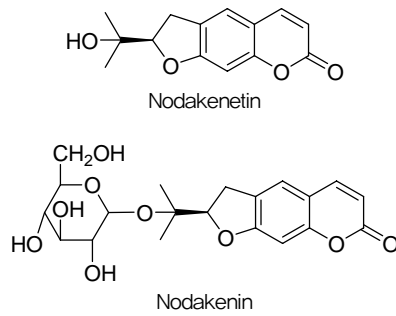


Fig. 2. Chemical structures of bioconversion components identified from fermented Samultangs.

3. 발효사물탕들의 생물전환성분들의 함량분석

Nodakenetin 및 nodakenin의 HPLC 정량을 위한 검량선의 상관관계는 0.999 이상으로 매우 적합하였다. Nodakenetin에 대한 검량선은 $Y=99600X + 41800$, $R^2 = 0.9996$ 이었으며, nodakenin의 검량선은 $Y=411000X + 24400$, $R^2=0.9999$ 이었다 [Y = peak area, X = 표준품의 함량 (ug/ml)].

분석결과 발효전 사물탕의 nodakenin은 3.74 mg/g으로 높은 함량을 나타낸 반면, nodakenetin은 0.08 mg/g으로 미량으로 검출되었다(Table 2).

발효균주별 함량변화의 결과를 보면, nodakenin 함량이 감소함에 따라 aglycone인 nodakenetin 함량은 반비례하여 증가함이 관찰되었다. Nodakenetin 함량에 있어서 3배 이상으로 뚜렷한 증가를 가져온 균주들로는 *L. plantarum*, *L. amylophilus* 및 *L. brevis*였다. 가장 많은 함량변화를 가져온 균주는 *L. plantarum* 균주로 발효한 사물탕의 nodakenin함량은 1.91 mg/g으로서 발효전과 비교하여 2.22 mg/g 59%가 감소한 반면, nodakenetin 함량은 0.91 mg/g으로 11.4배가 증가하였다. Nodakenin의 분자량 408과 nodakenetin의 분자량 246을 고려하면 감소된 nodakenin의 62%가 nodakenetin으로 전환된 것으로 추정된다.

본 연구를 통하여, nodakenetin과 nodakenin을 지표성분으로 하여 확립된 분석법은, 향후 사물탕 발효의 최적화를 위하여 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 nodakenin은 항박테리아⁽¹⁰⁾ 및 뇌신경보호⁽¹¹⁾ 및 기억력 관련⁽¹²⁾ 등 많은 효능이 보고되어 있으나, aglycone인 nodakenetin은 P388 cell line에 대한 강한 암세포 독성효과⁽¹³⁾ (IC_{50} , 2.8 ug/ml)외에는 많은 연구가 되어 있지 않다. 따라서 발효사물탕과 더불어 nodakenetin에 대한 추가 효능 연구를 통하여 새로운 발효한약개발을 기대할 수 있겠다.

Table 2. The contents of bioconversion compositions in fermented Samultangs (Mean±SD, n=3)

Fermented Samul-tangs	unit : mg/g	
	Nodakenin	Nodakenetin
Not fermented	3.74 ± 0.46	0.08 ± 0.01
<i>L. casei</i>	3.68 ± 0.16	0.08 ± 0.01
<i>L. plantarum</i>	1.52 ± 0.03	0.91 ± 0.02
<i>L. acidophilus</i>	3.64 ± 0.14	0.08 ± 0.01
<i>L. amylophilus</i>	3.12 ± 0.30	0.27 ± 0.02
<i>L. curvatus</i>	3.37 ± 0.28	0.15 ± 0.01
<i>L. acidophilus</i>	3.62 ± 0.09	0.08 ± 0.01
<i>L. confusus</i>	3.79 ± 0.19	0.08 ± 0.01
<i>L. brevis</i>	3.28 ± 0.14	0.29 ± 0.02
<i>L. acidophilus</i>	3.42 ± 0.07	0.23 ± 0.01
<i>B. breve</i>	3.51 ± 0.03	0.12 ± 0.01

결론

발효사물탕으로부터 발효 후 증가 및 감소된 주요성분으로서, 각각 nodakenetin과 nodakenin을 분리, 동정하였고, 10종의 유산균들로부터 제조된 발효사물탕들에 대하여 이들 함량변화를 분석한 결과, nodakenin의 함량에 있어서, 10% 이상의 감소와 더불어 aglycone인 nodakenetin의 함량에 있어서, 3배 이상 증가를 가져온 균주들로는 *L. plantarum*, *L. amylophilus*, *L. brevis*였다. 이중 *L. plantarum* 균주로 발효한 사물탕의 nodakenin 함량이 발효전 3.74 mg/g에서 1.91 mg/g으로 59%의 감소와 더불어 aglycone인 nodakenetin에 있어서 발효전 0.08 mg/g에서 0.91 mg/g, nodakenetin 함량은 0.91 mg/g으로 11.4배가 증가하여, 가장 우수한 균주로 평가되었다.

본 연구를 통하여, 선발된 우수균주인 *L. plantarum*, 그리고 nodakenetin과 nodakenin을 지표성분으로 하여 확립된 분석법은 향후 발효사물탕의 개발을 위하여 효율적으로 사용될 수 있을 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원 (K11050)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Heo J [許浚](1596, Joseon period). Dongui Bogam[東醫寶鑑]. Seoul : Nam sandang, 1976 ; 113.
2. Ahn CK. Sangyong Hanbang Haeseul- jip[A guide of common use oriental medicine] .Jinju : Kihwa Pharmaceutical Co, Ltd, 1999 ; 333-335.
3. Kim JH, Lee JK, Ha HK, Seo CS, Lee HY, Jeong DY, et al. Analysis of studies on Samul-tang for fundamental establishment of evidence based medicine. Kor. J. Orient. Physiol. & Pathol. 2009 ; 23 : 779-788.
4. Bae EA, Han MJ, Kim EJ, Kim DH. Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants. Arch. Pharm. Res. 2004 ; 27 : 61-67.
5. Park JH, Kim HJ, Lee MJ. The role of gut microbiota in obesity and utilization of fermented herbal extracts. J. of Soc. of Kor. Med. for Obesity Res. 2009 ; 9 : 1-14.
6. Suhr SS, Jung SK. Antiviral effects of fermented *Lonicerae flos* on A type influenza Virus. Korean J. Orient. Int. Med. 2009 ; 30 : 465-480.
7. Ham S, Lim B, Yu J, Ka SO, Park BH. Fermentation increases antidiabetic effects of *Acanthopanax senticosus*. Kor. J. Orient. Physiol. & Pathol. 2008 ; 22 : 340-345.

8. Jung NI, Yook CS, Lee HK. Coumarins from the roots of *Angelica decursive-albiflora*. Kor. J. Pharmcognosy. 1994 ; 25 : 311-318.
9. Lee S, Kang SS, Shin KH. Coumarins and pyrimidine from *Angelica gigas* roots. Natural, Prod. Sci. 2002 ; 8 : 58-61.
10. Lee S, Shin DS, Kim JS, Oh KB, Kang SS. Antibacterial coumarins from *Angelica gigas* roots. Arch Pharm Res. 2003 Jun ; 26(6) : 449-52.
11. Kang SY, Kim YC. Neuroprotective coumarins from the root of *Angelica gigas* : Structure-activity relationships. Arch. Pharm. Res. 2007 ; 30 : 1368-1373.
12. Kim DH, Kim DY, Kim YC, Jung JY, Lee S, Yoon, BH, et al. Nodakenin, a coumarin compound, ameliorates scopolamine-induced memory disruption in mice. Life Sci. 2007 ; 80 : 1944-1950.
13. Hideji T, Yun YS, Hiroshi M, Koich T, Lee SR. Cytotoxic Coumarins from the Roots of *Angelica gigas* Nakai. J. Oriental Bot. Res. 1994 ; 7(1) : 13-15