J Korean Soc Food Sci Nutr
42(3), 342~347(2013)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2013.42.3.342

유산균발효마늘의 유기황화합물과 CYP2E1-Transfected HepG2 Cell에서 알코올 유발 세포독성에 미치는 영향

정은봉[1] · 최지휘[1] · 유희종[1] · 김기호[1] · 이성구[1,2] · 황용일[2] · 이승현[1†]

[1](주)바이오랜드 생명공학연구소
[2]경남대학교 식품생명학과

Organosulfur Compounds in Fermented Garlic Extracts and the Effects on Alcohol Induced Cytotoxicity in CYP2E1-Transfected HepG2 Cells

Eun-Bong Jung[1], Ji-Hwi Choi[1], Heui-Jong Yu[1], Ki-Ho Kim[1], Sung-Ku Lee[1,2], Young-Il Hwang[2], and Seung-Hyun Lee[1†]

[1]*R&D Center, Bioland, Gyeonggi 425-839, Korea*
[2]*Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Gyeongnam 631-701, Korea*

Abstract

In this study, we investigated changes in the organosulfur compounds of garlic (by fermentation with lactic acid bacteria) and the effects of these fermented garlic extracts on alcohol-induced cytotoxicity in CYP2E1-transfected HepG2 cells. *Lactobacillus plantarum* has the highest growth rate in a garlic medium and the *S*-allyl-L-cysteine (SAC) in fermented garlic extracts with *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* were significantly higher compared to other lactic acid bacteria strains ($p<0.05$). The SAC, *S*-ethyl cysteine (SEC) and *S*-methyl cysteine (SMC) in garlic extracts were all increased by fermentation with lactic acid bacteria. However, alliin in the fermented garlic extracts with lactic acid bacteria strains was lower than the original garlic extract and the contents of cycloalliin in the garlic extracts did not change with fermentation ($p<0.05$). The electron donating ability of the fermented garlic extracts increased with dose. The electron donating ability of the fermented garlic extract with *L. plantarum* and *P. pentosaceus* was over 90% efficient at 5 mg/g. The fermented garlic extracts (with lactic acid bacteria) and garlic extract were not influenced, up to 100 μg/mL, in CYPE1-transfected HepG2 cells. The CYPE1-transfected HepG2 cell viabilities were 92.60% and 92.23% when treated with both alcohol (200 mM) and fermented garlic extract (100 μg/mL) with lactic acid bacteria respectively, for 6 days.

Key words: garlic, lactic acid bacteria, fermentation, CYP2E1, alcohol

서 론

간은 인체에서 가장 큰 장기이며, 소화 및 배설 기능, 영양소 저장, 새로운 물질 합성, 해로운 화학물질을 해독시키는 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으며, 간은 혈액의 흐름이 매우 풍부한 기관으로 혈류를 통한 독성물질의 침투도 용이하게 일어날 수 있다. 또한 만성적인 에탄올 섭취의 경우에도 간세포에 장애를 초래하여 알코올성 간염, 지방간 및 간 경변을 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다(1). 이러한 간질환은 한국인에 있어서 암, 당뇨병과 함께 가장 발생빈도가 높은 것으로 조사되고 있고, 간암에 의한 사망률은 세계에서 가장 높은 것으로 조사되고 있다. 간 손상으로 인한 간장해에 대하여 다양한 치료약이 개발되어 사용되고 있으나 결정적으로 유효한 약물은 별로 없으며, 우리나라를 비롯하여 동아시아 지역에서는 천연물을 기원으로 하는 한약재를 조합한 한방제가 경험적으로 널리 이용되고 있다(2). 근래 만성적인 알코올 섭취 시 유도되는 CYP2E1 효소 활성이 간 손상의 중요 인자로 주목받고 있으며 실험적으로 CYP2E1의 유도가 감소됨으로써 간 손상의 정도가 감소되는 것으로 보고되고 있다(3). 백합과(Liliaceae)의 파속(*Allium*)에 속하는 마늘(*Allium sativum* L.)에는 다량의 유기황화합물이 존재하는데 이는 마늘의 주요 생리활성 기능에 관여함과 동시에 강한 향과 매운맛을 유발하는 물질들로 식용함에 있어 거부감을 줄 수도 있다. 이처럼 마늘에 기인하는 맛과 향을 억제하기 위해 고온숙성 혹은 열처리를 하게 되는데 이는 열에 의해 효소 활성도가 떨어져 allicin이 감소되어 마늘 특유의 독특한 맛과 향은 부드러워지며 단맛이 강해진다(4-7). 또한 폴리페놀류의 함량이 증가하며, 생마늘에는 존

†Corresponding author. E-mail: jordam@hanmail.net
Phone: 82-31-8085-7577, Fax: 82-31-8085-7609

재하지 않은 *S*-allyl cystein(SAC)이라는 수용성의 유황아미노산이 생성되어 생마늘보다 항산화력이 상승하고, 암예방, 콜레스테롤 저하, 동맥경화 개선, 심장질환의 예방 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(8-10). 숙성마늘의 다양한 효과가 연구되어 왔으나 자가 숙성할 경우 20~30일로 숙성기간이 오래 걸리는 문제점이 있다. 본 연구에서는 숙성흑마늘이 갖고 있는 기호성을 증진시키면서 제조공정을 단축시키고자 다양한 유산균을 이용하여 발효마늘을 제조하고 유효 생리활성 성분의 함량의 변화량을 유산균 균주별로 비교 측정하였다. 또한 유산균발효마늘이 CYP2E1 매개로 일어난 알코올성 간손상에 대해서 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 CYP2E1-transfected HepG2 세포에 에탄올과 발효마늘 추출물을 투여하고 세포활성을 측정하여 발효마늘의 알코올성 간손상에 대한 보효효과를 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 실험에서 사용한 유산균발효마늘 추출물과 마늘 추출물을 제조하기 위한 마늘은 경남 창녕마늘로 가월영농조합에서 구매하여 사용하였으며 발효마늘 추출물들 중의 황화합물들을 분석하기 위하여 표준시약 alliin, allicin, *S*-allyl-L-cysteine(SAC), *S*-ethyl cysteine(SEC), *S*-methyl cysteine(SMC)(LKT Laboratories, Inc., St. Paul, MN, USA)와 cycloalliin hydrochloride monohydrate(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)를 사용하였다. 기기분석을 위한 acetonitrile은 HPLC grade(Fisher Scientific Korea, Seoul, Korea)를 사용하였다.

유산균배양 및 발효마늘 추출물 제조

유산균 발효균주를 선택하기 위하여 마늘 5 kg에 증류수 10 kg의 증류수를 발효조(MJS U3, Marubishi, Tokyo, Japan)에 넣고 교반하며 121°C에서 1시간 동안 멸균하였다. 마늘 멸균액을 각각 300 mL씩 flask에 분취하고 Table 1에 나타낸 6종의 유산균 *Lactobacillus helveticus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum* BL2, 그리고 *Pediococcus pentosaceus*를 각각 접종하고 접종 직후의 생균수와 37°C에서 2일간 배양한 생균수를 측정하였으며, 배양액을 95°C에서 열처리하고 여과한 후 동결건조 하여 발효마늘 추출물을 제조하였다.

추출물 중의 황화합물 분석

유산균발효마늘 추출물들 중 alliin, SAC, SEC, SMC 분석은 아미노산 분석용 전처리 시약인 Waters AccQ-Tag chemistry package(Waters Co., Milford, MA, USA)를 사용하여 형광 유도체화 한 후 Table 2의 조건에서 HPLC(Alliance HPLC, Waters Co.)를 이용하여 분석하였으며, cycloalliin의 분석은 Ichikawa 등의 분석법(11)을 변형하여 분석하였다. 그리고 allicin의 분석은 Ilić 등(12)의 방법을 변형하여 Table 2의 조건으로 UPLC(Waters Co.)를 이용하여 분석하였다.

DPPH를 이용한 free radical 소거능 측정

유산균발효마늘 추출물의 DPPH(2-2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)에 대한 free radical 소거능력은 Blois의 방법(13)을 변형하여 전자공여능(electron donating ability, EDA)을 측정하여 알아보았다. 0.4 mM DPPH 용액을 ethanol로 희석하여 사용하였으며 농도별로 용해한 추출물 1 mL와 DPPH 용액 9 mL를 시험관에 넣고 30분간 반응시킨 후 원심분리하여 517 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하였으며, EDA는 시료 첨가구와 메탄올 첨가구(blank)의 흡광도 차이를 비교하여 전자공여능을 측정하였다.

추출물의 transfected HepG2 세포독성 및 에탄올에 의해 손상된 transfected HepG2 세포의 보호효과

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다(14,15). CYP2E1 transfected HepG2 세포를 5×10^4의 밀도로 24-well plate(Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM) 배지에 접종하여 24시간 배양하였다. 배양 후 각각의 유산균발효마늘 추출물을 농도별로 첨가하고 37°C, 5% CO_2 조건에서 6일간 배양하였다. 배양 후 PBS로 세척하고 MTT를 DMEM 배지에 10배 희석시켜 그 희석액을 1 mL 첨가하여 37°C에서 4시간 배양시키고 배지를 버리고 DMSO를 첨가하여 상온에서 10분 동안 녹이고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

각각의 유산균발효마늘 추출물이 에탄올에 의해 손상된 CYP2E1 transfected HepG2 세포의 보호효과는 MTT 환원 방법과 동일한 농도로 CYP2E1 transfected HepG2 세포를 넣고 배양하였다. 24시간 배양 후 세포를 5% FBS가 첨가된

Table 1. Lactic acid bacteria for fermentation with garlic extracts

Lactic acid bacteria	International depositary authority	Sample name
Non bacteria	–	Control
Lactobacillus helveticus	KCCM11223	Fermented garlic extracts with *L. helveticus* (FGLH)
Lactobacillus fermentum	KCCM35469	Fermented garlic extracts with *L. fermentum* (FGLF)
Lactobacillus casei	KCCM12452	Fermented garlic extracts with *L. casei* (FGLC)
Lactobacillus reuteri	KCCM40717	Fermented garlic extracts with *L. reuteri* (FGLR)
Lactobacillus plantarum BL2	KCCM11004P	Fermented garlic extracts with *L. plantarum* BL2 (FGLP)
Pediococcus pentosaceus BL1	KCCM11019P	Fermented garlic extracts with *P. pentosaceus* (FGPP)

Table 2. Condition for analysis of organosulfur compounds

	Analysis condition		
	Alliin, SAC, SMC, SEC	Cycloalliin	Allicin
Instrument	HPLC	HPLC	UPLC
Column	Accq-Tag (3.9×150 mm, 4.0 μm)	TSKgel amide 80 (4.5×250 mm, 5 μm)	Acquity UPLC BEH RP 18 (2.1×100 mm, 1.7 μm)
Mobile phase	Gradient condition A: AccQ-Tag Eluent A B: 60% acetonitrile	Isocratic condition A solvent: 0.2% phosphoric acid B solvent: 100% acetonitrile A:B=25:75	Isocratic condition A solvent: Water B solvent: 100% acetonitrile A:B=30:70
Detector	254 nm	210 nm	200 nm
Flow rate	1.0 mL/min	1.0 mL/min	0.4 mL/min
Column temperature	37°C	30°C	30°C

min	A (%)	B (%)
0	100	0
0.5	98	2
15	93	7
19	90	10
32	67	33
33	67	33
34	0	100
37	0	100
38	100	0
50	100	0

DMEM 배지로 교체하였으며 에탄올을 투입하기 30분 전에 각각의 유산균발효마늘 추출물을 투입하였다. 에탄올을 200 mM의 농도로 처리하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 24시간 배양하였으며 3일 및 6일간 동일한 처리를 하였다. 3일과 6일 배양 후 PBS로 세척한 다음 MTT(2.5 mg/mL)를 DMEM 배지에 10배 희석시켜 그 희석액을 1 mL 첨가하여 37°C에서 4시간 배양시켰다. 그 후 배지를 버리고 DMSO 0.5 mL를 첨가하여 상온에서 10분 동안 완전히 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 결과의 통계처리는 statistical analysis system(SAS) program(version 8.0, SAS institute, Inc., Cary, NC, USA)에 의해 ANOVA 검정과 Duncan's multiple range test 방법을 이용하여 평균값 간에 유의수준 $p<0.05$에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

유산균발효마늘 추출물 제조

마늘 중의 alliin이 alliinase에 의해 allicin으로 전환되어 젖산균을 포함한 다양한 미생물에 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(16-18). 따라서 다른 배지 성분을 함유하지 않은 마늘추출액에 잘 자라는 유산균을 알아보고 유기황화합물들의 변화를 알아보기 위하여 6종의 유산균을 접종하여 24시간 배양하고 생균수를 측정하였다. 24시간 배양 후 *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum* BL2, 그리고 *P. pentosaceus* 생균수는 각각 4.6×10^6, 4.4×10^8, 2.4×10^8, 2.4×10^7, 1.8×10^9, 1.0×10^9 CFU/mL로 *L. plantarum* BL2가 가장 잘 자라는 것으로 나타났으며 *L. helveticus*가 가장 낮은 성장률을 나타내었다(Fig. 1). 이는 Kim 등(19)의 결과에서 마늘의 조직이 파괴되며 발생되는 alliinase가 열처리에 의해 불활성화되어 alliin이 항균작용이 있는 allicin으로 전환되지 않았기 때문에 유산균들의 성장이 가능하다고 하였는데, 본 연구에서도 마늘을 멸균하는 과정에서 alliinase가 불활성화 되어 유산균의 증식이 원활한 것으로 확인되었다. 단, 유산균에 따라 증식의 차이가 발생하였다. 마늘의 항균활성도 유산균에 따라 저항력의 차이가 있는 것을 확인하였다. 48시간 배양 후 각각의 배양액을 열처리하고 여과하여 동결건조 하여 Table 1과 같이 유산균 종류별 발효마늘 추출물을 제조하였으며 유산균을 접종하지 않고 여과하여 동결건조 한 마늘 추출물을 대조구로 사용하였다.

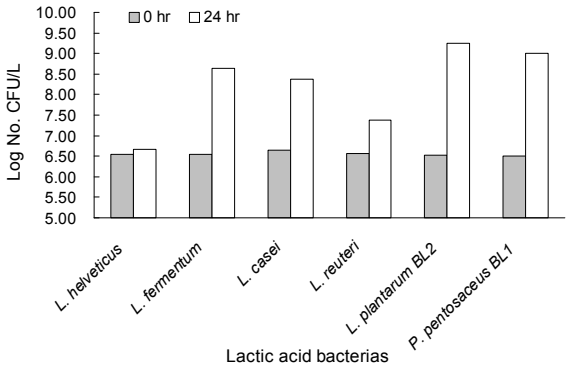

Fig. 1. Growth of lactic acid bacteria in garlic medium.

Table 3. Contents of organosulfur compounds in fermented garlic extracts

Organosulfur compounds	Fermented garlic extracts (mg/g)						
	Control	FGLH	FGLF	FGLC	FGLR	FGLP	FGPP
SAC	0.792±0.021$^{c1)2)}$	1.360±0.115^{bc}	1.541±0.343^{b}	1.898±0.366^{b}	1.608±0.115^{b}	3.619±0.363^{a}	3.234±0.635^{a}
SEC	0.101±0.011^{d}	0.122±0.005^{c}	0.193±0.011^{b}	0.128±0.013^{c}	0.104±0.009^{d}	0.224±0.010^{a}	0.206±0.007^{b}
SMC	0.025±0.018^{e}	0.111±0.011^{d}	0.314±0.008^{a}	0.201±0.013^{b}	0.161±0.012^{c}	0.302±0.012^{a}	0.311±0.013^{a}
Alliin	0.879±0.016^{a}	0.843±0.017^{bc}	0.755±0.027^{d}	0.805±0.007^{c}	0.813±0.013^{c}	0.724±0.008^{e}	0.745±0.019^{ed}
Cycloalliin	5.023±0.047^{a}	5.043±0.061^{a}	5.060±0.052^{a}	5.050±0.079^{a}	5.077±0.054^{a}	5.101±0.078^{a}	5.044±0.039^{a}

[1)]Values are mean±SD, n=3.
[2)]Means with the same letter in the same row are not significantly different by Duncan's range test ($p<0.05$).

발효마늘 추출물의 제조와 황화합물 분석

마늘, 양파와 같은 *Allium*속 식물에는 SAC, SEC, SMC 등과 같은 친수성 유기황화합물들이 다량 존재하며 항산화와 항당뇨 등과 같은 생리활성 기능이 있는 것으로 알려져 있다(20,21). Cycloalliin도 *Allium*속 식물 중에 있는 주요 황아미노산 중 하나인 isoalliin이 열처리에 의하여 안정적인 cycloalliin으로 전환된다고 알려져 있으며 지방간과 serum triglyceride를 낮추는 것으로 알려져 있다(22,23).

각각의 유산균발효마늘 추출물 중에 다양한 유기황화합물들의 함량을 분석하여 화학적 성분을 분석하여 Table 3에 나타내었다. 유산균발효마늘 추출물들 중의 SAC의 함량은 FGLP와 FGPP가 각각 3.619 mg/g과 3.234 mg/g으로 유의적으로 가장 많이 생성되는 것으로 나타나 발효하지 않은 대조구에 비하여 4배 정도의 함량이 높은 것으로 나타났으며 SEC의 경우 FGLP가 0.224 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타냈다. SMC의 경우 FGLP, FGPP, FGLF의 경우 각각 0.302, 0.311, 0.314 mg/g으로 유의적으로 가장 높은 함량을 나타내었으며 대조구에 비하여 10배 이상 함량이 늘어난 것으로 나타났다. SAC, SEC, SMC의 경우 유산균을 이용하여 발효하였을 때 대조구에 비하여 모두 함량이 증가한 것을 알 수 있었다. FGLP와 FGPP가 유산균의 증식이 원할한 만큼 유산균에 의한 황화합물의 전환효과가 다른 유산균에 비해 큰 것을 알 수 있었다. Alliin의 경우 대조구에서 0.879 mg/g으로 유산균발효마늘 추출물에 비하여 유의적으로 가장 높은 함량을 나타냈다. 또한 cycloalliin의 경우 대조구와 유산균발효마늘 추출물들의 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다. 마늘에는 γ-glutamylcysteine류의 화합물들을 함유하고 있으며 이는 저온저장 중에 마늘에 있는 효소들에 의해 산화 및 환원과정을 거쳐 alliin으로 전환되는 것으로 알려져 있으며, 마늘에 물리적 충격이 가해지면 마늘 조직 중의 alliinase가 나와 allicin으로 전환이 빨라지며 SAC의 경우 γ-glutamylcysteine이 alliin과 allicin을 거치지 않고 바로 전환되는 것으로 알려져 있다(24). 유산균발효마늘 추출물이 SAC 함량이 높고 alliin의 함량이 낮은 것은 마늘조직에 있는 alliinase가 유산균 접종전에 멸균공정에 의해 불활성화되어 γ-glutamylcysteine이 alliin과 allicin으로 전환되지 않았을 것으로 사료된다.

발효마늘 추출물의 전자공여능 효과

각각의 유산균발효마늘 추출물들을 이용하여 농도별 DPPH에 대한 전자공여능을 측정하여 Table 4에 나타냈다. 모든 처리구에서 농도 의존적으로 전자공여능이 증가하는 것으로 나타났으며 0.25 mg/g과 10.0 mg/g의 농도에서는 처리군간 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다. 하지만 0.5~5.0 mg/g의 농도에서는 처리군간 차이를 나타내었다. 2.0 mg/g의 농도에서 전자공여능은 FGLP, FGPP, FGLC가 각각 50.11%, 48.50%, 48.16%로 유의적으로 가장 높았으며 SAC 함량과 비례적으로 전자공여능 효과가 있는 것으로 나타났다. 이는 Ide 등(25)이 숙성마늘에서 분리한 대표적인 항산화물질로 알려진 SAC의 농도와 비례적으로 항산화 효과를 나타낸다고 보고하였는데 본 실험결과도 SAC 함량과 항산화 효과의 연관성을 확인하였다. 또한 FGLP와 FGPP의 경우 5.0 mg/g의 농도에서 모두 90% 이상의 전자공여능 효과를 나타내어 다른 유산균발효마늘 추출물에 비하여 유의적으로 가장 높은 항산화력을 확인하였다.

Table 4. DPPH radical scavenging activities of fermented garlic extracts

Concentration (mg/mL)	Fermented garlic extracts						
	Control	FGLH	FGLF	FGLC	FGLR	FGLP	FGPP
0.25	11.53±1.16$^{a1)2)}$	11.69±1.60^{a}	11.37±1.02^{a}	11.72±0.87^{a}	11.68±1.22^{a}	11.73±1.44^{a}	11.72±0.90^{a}
0.5	18.33±1.24^{c}	18.19±1.26^{c}	18.63±0.86^{c}	20.89±2.22^{b}	19.46±1.31^{bc}	23.83±1.66^{a}	23.04±1.28^{a}
1.0	21.16±1.70^{c}	21.18±2.04^{c}	23.95±3.15^{bc}	24.11±2.21^{bc}	24.18±2.66^{bc}	27.64±1.45^{a}	26.33±0.79^{ab}
2.0	40.28±2.50^{c}	40.74±1.76^{c}	41.54±1.64^{c}	48.16±1.22^{a}	44.79±1.57^{b}	50.11±1.51^{a}	48.50±1.48^{a}
2.5	43.87±5.71^{d}	45.80±2.06^{d}	54.93±1.53^{c}	64.57±1.99^{a}	59.54±2.08^{b}	67.19±1.76^{a}	66.20±2.53^{a}
5.0	75.71±2.21^{d}	76.38±2.97^{d}	80.53±2.82^{c}	86.36±1.70^{b}	83.03±2.59^{bc}	90.23±1.73^{a}	90.30±1.78^{a}
10.0	90.45±2.39^{a}	90.97±2.49^{a}	91.09±1.80^{a}	90.74±1.68^{a}	90.78±1.91^{a}	91.34±1.80^{a}	91.13±1.15^{a}

[1)]Values are mean±SD, n=4.
[2)]Means with the same letter in the same row are not significantly different by Duncan's range test ($p<0.05$).

발효마늘 추출물이 알코올 손상 간세포주에 미치는 영향

유산균발효마늘 추출물의 세포독성과 알코올에 의해 유도된 독성에 대한 보호효과를 CYP2E1 transfected HepG2 세포주를 이용하여 측정하였다. MTT법에 의한 세포독성을 측정한 결과 각각의 유산균발효마늘 추출물 농도가 유산균의 종류에 상관없이 200 μg/mL일 때 무처리구와 비교하여 세포성장에 영향을 주는 것으로 나타났으며 100 μg/mL의 농도까지는 세포성장에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 또한 시료를 처리하지 않고 에탄올만 처리하였을 경우 100 mM과 200 mM의 농도에서 3일간 처리하였을 때 각각 93.78 %와 82.24%의 세포생존율을 나타내어 100 mM의 에탄올 농도로 3일간 처리하였을 때는 높은 세포생존율을 나타내어 무처리구와 큰 차이가 없었다. 또한 6일간 100 mM과 200 mM의 농도로 각각 에탄올만 처리하였을 경우 각각 82.24%와 61.23%의 세포생존율을 나타내어 알코올에 의한 세포독성 보호효과를 알아보기 위한 에탄올 처리 농도를 200 mM의 농도로 설정하였다(Fig. 2). 따라서 에탄올을 200 mM의 농도로 처리하고 동시에 각각의 유산균발효마늘 추출물을 100 μg/mL의 농도로 처리하여 각각의 발효마늘 추출물이 알코올에 의한 세포독성에 미치는 영향을 알아보았다(Fig. 3).

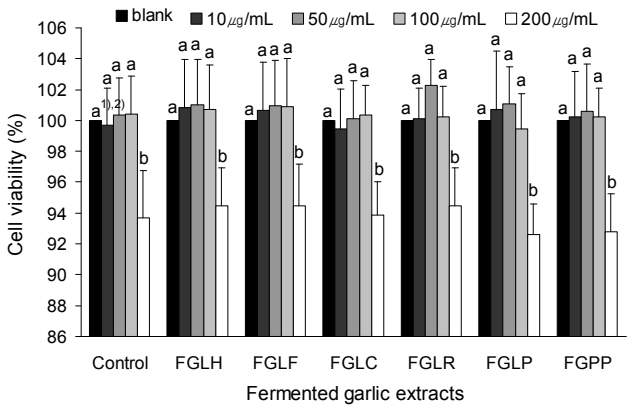

Fig. 2. Cell viability of HepG2 cell with treatment of fermented garlic extracts at various concentration. [1)]Values are mean±SD, n=5. [2)]Means with the same letter in the group bars are not significantly different by Duncan's range test ($p<0.05$).

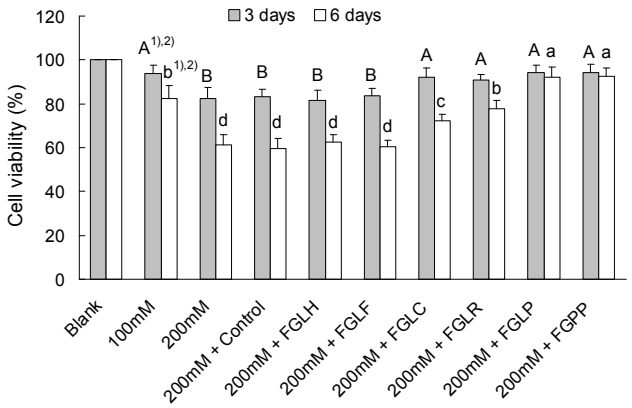

Fig. 3. Effects of fermented garlic extracts on ethanol induced cell toxicity in CYP2E1-transfected HepG2 cells. [1)]Values are mean±SD, n=5. [2)]Means with the same letter in the bar are not significantly different by Duncan's range test ($p<0.05$).

200 mM의 에탄올과 시료를 3일간 처리하였을 경우 FGLP, FGPP, FGLC, FGLR이 다른 유산균발효마늘 추출물인 FGLF, FGLH, 대조구에 비하여 유의적으로 높은 생존율을 나타내었으며 6일간 처리하였을 경우 FGPP와 FGLP의 경우 각각 92.60%와 92.23%의 세포생존율을 나타내어 유의적으로 가장 높은 생존율을 나타냈다. 대조구, FGLH, FGLF의 경우 200 mM의 에탄올을 처리하였을 때와 유의적으로 같은 생존율을 나타내어 알코올성 간세포독성 보호 효과가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Kurose 등(26) 및 Wu와 Cederbaum(27)은 알코올에 의한 간세포독성은 ROS의 증가와 항산화활성의 감소와 관련이 있다고 보고한 것과 같이 FGPP와 FGLP가 항산화활성이 가장 높아 세포생존율이 높았을 것으로 사료된다.

요 약

마늘에 적용가능 한 유산균을 찾기 위해 마늘 이외의 배지성분 없이 각각의 유산균을 배양하고 유산균발효마늘 추출물을 제조하여 각각의 추출물의 유기황화합물을 분석하고 항산화효과 및 알코올 유발 세포독성에 미치는 영향을 알아보았다. 마늘멸균액을 배지로 유산균을 48시간 배양하였을 때 *L. plantarum*이 가장 잘 자랐으며 유산균발효마늘 추출물 중 항산화활성 등의 효능이 있는 것으로 알려진 SAC 함량은 *L. plantarum*의 발효물과 *P. pentosaceus*의 발효물이 각각 3.619 mg/g과 3.234 mg/g으로 가장 많은 것으로 나타났다($p<0.05$). 그리고 SAC, SEC, SMC의 경우 유산균발효마늘 추출물들이 마늘 추출물에 비해 높았으나 alliin의 경우 유산균발효마늘 추출물들이 마늘 추출물에 비하여 낮은 것으로 나타났다($p<0.05$). 또한 cycloalliin의 경우 마늘 추출물과 유산균발효마늘 추출물들 간의 함량 차이는 없었다($p<0.05$). 모든 유산균발효마늘 추출물이 농도 의존적으로 항산화활성이 높은 것으로 나타났으며, *L. plantarum*의 발효물과 *P. pentosaceus*의 발효물이 5.0 mg/g의 농도에서 90% 이상의 높은 전자공여능을 효과를 나타냈다. 유산균발효마늘 추출물들이 100 μg/mL의 농도까지 CYP2E1 transfected HepG2 세포주에 영향을 주지 않았으며, 각각의 유산균발효마늘 추출물을 알코올에 의해 손상된 CYP2E1 transfected HepG2 세포의 보호효과를 확인한 결과 에탄올과 시료를 6일간 처리한 경우에 FGPP와 FGLP가 각각 92.60%와 92.23%로 유의적으로 가장 높은 세포생존율을 보였다($p<0.05$).

문 헌

1. Lieber CS. 1994. Alcohol and the liver. *Gastroenterology* 106: 1085-1105.
2. Lee KW, Nam BH, Jo WS, Oh SJ, Kang EY, Cui Y, Lee

JY, Chenon SC, Jeong MH, Lee JD. 2006. Collection, identification and hepatic effect of native *Cordyceps militaris*. *Korean J Mycol* 34: 7-14.
3. Fang C, Lindros KO, Badger TM, Ronis MJ, Ingelman-Sundberg M. 1998. Zonated expression of cytokines in rat liver: effect of chronic ethanol and the cytochrome P450 2E1 inhibitor, chlormethiazole. *Hepatology* 27: 1304-1310.
4. Cho KJ, Cha JY, Yim JH, Kim JH. 2011. Effects of aging temperature and time on the conversion of garlic (*Allium sativum* L.) components. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 84-88.
5. Lawson LD, Wang ZJ. 2005. Allicin and allicin-derived garlic compounds increase breath acetone through allyl methyl sulfide: use in measuring allicin bioavailability. *J Agric Food Chem* 53: 1974-1983.
6. Choi YH, Shim YS, Kim CT, Lee C, Chin DB. 2007. Characteristics of thiosulfinates and volatile sulfur compounds from blanched garlic reacted with alliinase. *Korean J Food Sci Technol* 39: 600-607.
7. Jang EK, Seo JH, Lee SP. 2008. Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. *Korean J Food Sci Technol* 40: 443-448.
8. Cañizares P, Gracia I, Gómez LA, García A, Martín De Argila C, Boixeda D, de Rafael L. 2004. Thermal degradation of allicin in garlic extracts and its implication on the inhibition of the in-vitro growth of *Helicobacter pylori*. *Biotechnol Prog* 20: 32-37.
9. Yang ST. 2007. Antioxidative activity of extracts of aged black garlic on oxidation of human low density lipoprotein. *J Life Sci* 17: 1330-1335.
10. Rahman MS. 2007. Allicin and other functional active components in garlic: health benefits and bioavailability. *Int J Food Prop* 10: 245-268.
11. Ichikawa M, Ide N, Yoshida J, Yamaguchi H, Ono K. 2006. Determination of seven organosulfur compounds in garlic by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 54: 1535-1540.
12. Ilić D, Nikolić V, Stanković M, Nikolić L, Stanojević L, Mladenović-Ranisavljević I, Smelcerović A. 2012. Transformation of synthetic allicin: influence of ultrasound, microwaves, different solvents and temperatures, and the products isolation. *ScientificWorldJournal* doi: 10.1100/2012/561823.
13. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
14. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
15. Lee YH, Ho JN, Dong MS, Park CH, Kim HK, Hong BS, Shin DH, Ch HY. 2005. Transfected HepG2 cells for evaluation of catechin effects on alcohol-induced CYP2E1 cytotoxicity. *J Microbiol Biotechnol* 15: 1310-1316.
16. Feldberg RS, Chang SC, Kotik AN, Nadler M, Neuwirth Z, Sundstrom DC, Thompson NH. 1998. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1763-1768.
17. Cavallito CJ, Bailey JH. 1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties, and antimicrobial action. *J Am Chem Soc* 66: 1950-1951.
18. Cavallito CJ, Bock JS, Suter CM. 1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. Determination of chemical structure. *J Am Chem Soc* 66: 1952-1954.
19. Kim YS, Baek HH, Chung IM, Kwon B, Ji GE. 2009. Garlic fermentation by lactic acid bacteria. *Food Sci Biotechnol* 18: 1279-1283.
20. Sheela CG, Kumud K, Augusti KT. 1995. Anti-diabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats. *Planta Med* 61: 356-357.
21. Hatono S, Jimenez A, Wargovich MJ. 1996. Chemopreventive effect of *S*-allylcysteine and its relationship to the detoxification enzyme glutathione S-transferase. *Carcinogensis* 17: 1041-1044.
22. Ueda Y, Tsubuku T, Miyajima R. 1994. Composition of sulfur-containing components in onion and their flavor characters. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 108-110.
23. Yanagita T, Han SY, Wang YM, Tsuruta Y, Anno T. 2003. Cycloalliin, a cyclic sulfur imino acid, reduces serum triacylglycerol in rats. *Nutrition* 19: 140-143.
24. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* 131(3s): 955s-962s.
25. Ide N, Lau BH, Ryu K, Matsuura H, Itakura Y. 1999. Antioxidant effects of fructosyl arginine, a Maillard reaction product in aged garlic extract. *J Nutr Biochem* 10: 372-376.
26. Kurose I, Higuchi H, Miura S, Saito H, Watanabe N, Hokari R, Hirokawa M, Takaishi M, Zeki S, Nakamura T, Ebinuma H, Kato S, Ishii H. 1997. Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology* 25: 358-378.
27. Wu D, Cederbaum AI. 1996. Ethanol cytotoxicity to a transfected HepG2 cell line expressing human cytochrome P4502E1. *J Biol Chem* 271: 23914-23919.

(2012년 10월 18일 접수; 2012년 12월 4일 채택)