

Quality Characteristics and Biological Activity of Fermented Black Garlic with Probiotics

Hyun-Min Tak, Gyeong-Min Kim, Jong-Su Kim, Cho-Rong Hwang, Min-Jung Kang and Jung-Hye Shin*

Namhae Garlic Research Institute, Gyeongnam 668-812, Korea

Received April 21, 2014 / Revised May 23, 2014 / Accepted May 23, 2014

This study examined the quality characteristics of fermented black garlic (BG) with probiotics. Nine strains of probiotics were tested in media containing 20% BG. Four of the strains grew well in the BG media: *Lactobacillus rhamnosus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. casei*, and *L. plantarum*. These four strains were used to make 10, 20, and 30% BG fermented product, respectively. The number of viable cells, pH, acidity, S-allyl cysteine (SAC) concentration, and nitric oxide (NO) and reactive nitrogen species (ROS) generation in Raw 264.7 macrophage cells were measured. *L. plantarum* showed the best growth of all the strains in the BG media. The pH of all the samples decreased during fermentation, and the acidity increased. However, they did not differ significantly from the pH and acidity of the control. In all four strains, the SAC content did not differ before and after fermentation. However, the SAC content increased, depending on the BG concentration. NO production was inhibited in the *L. rhamnosus* inoculation strain compared to the other strains. ROS generation was also significantly inhibited in the *L. plantarum* inoculation strain compared to the other strains. The results show that the characteristics of BG fermentation products are determined by the fermentation strain. Therefore, fermentation products with particular characteristics can be produced using a single strain or mixed strains.

Key words : Black garlic, immune activity, probiotics, reactive nitrogen species, S-allyl cysteine

서 론

인체는 생명을 유지하기 위한 대사과정에 필수적으로 산소를 요구하는데, 세포로 흡수된 산소의 1~4%는 전자 전달과정에서 완전히 환원되지 못하고 자유기로 전이되어 각종대사과정에서 super oxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$), alkoxy radical ($\text{RO}\cdot$) 등의 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 지속적으로 생성되게 된다[7, 13, 16]. 이들 ROS는 반응성이 강하고 여러 생체물질과 쉽게 화학반응을 일으키므로 체내에서는 항상성 유지를 위하여 산화억제물질을 통해 ROS를 제거하게 된다[20]. 이 때 반응의 균형이 깨어지고 산화가 더 촉진되어 산화적 스트레스가 유발되면 활성산소에 의해 세포와 조직에 비가역적인 손상이 유발되어 세포막 손상, 단백질과 DNA 손상 및 이로 인한 돌연변이, 세포구조의 빠른 붕괴를 통해 세포를 사멸시킴에 따른 염증, 세포독성, 발암 등의 유발은 각종 질환과 노화의 원인이 된다[11, 18, 22]. ROS를 생성하는 생체 내 반응 중 $\cdot\text{NO}$,

HNO_2 , ONOO \cdot 등과 같은 활성 질소 종(reactive nitrogen species, RNS)은 염증 반응 시 대식세포 호중구 및 다른 면역 세포들의 면역반응으로 인해 다량 생성된다[3, 6]. 생체 내 염증반응이 지속되면 ROS와 RNS가 과다하게 생성되어 생체 내 산화스트레스를 더 가중시키게 되므로, ROS와 RNS는 세포 작용을 조절하는 염증반응과 상관성이 높다[11].

염증 발병은 cytokine 네트워크와 여러 복합적인 염증인자(pro-inflammatory) 및 자유기(free radical)의 유발 등에 의해서 조절 및 유도 과정을 통해서 일어나는데[29], 대식세포(macrophage)가 외부의 자극이나 침입한 병원체에 반응하여 염증유발인자인 TNF- α , interleukin1- β (IL-1 β) 및 IL-6와 같은 cytokine을 생성하고, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 합성을 거쳐 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E2 (PGE2)를 생성한다. 이러한 과정을 거쳐 생성된 NO는 종양과 세균을 제거하는 등 여러 역할을 수행하지만, 체내에 과도하게 생성되면 조직의 손상, 유전자의 변이 및 혈관의 투과성 증가로 인한 부종 등 염증반응을 일으켜 인체에 피해를 주게 된다[4, 15, 19].

항산화제는 염증성 질환에 효과적으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데[1], 항산화제를 통해 산화적 스트레스를 조절 할 경우 염증반응이 효과적으로 억제된다는 여러 연구결과들을 바탕으로 다양한 천연 자원 소재로부터 염증억제 효능이 있는 물질을 얻고자 하는 연구들이 진행되고 있다[17, 26]. 이러한 천연물 소재 중 흑마늘은 마늘(*Allium sativum* L.)을 열에

*Corresponding author

Tel : +82-055-860-8952, Fax : +82-055-860-8960

E-mail : whanbee@hanmail.net

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

의해 숙성 가공하여 색이 검게 변하며, 매운 맛과 향은 감소되고 생마늘에 비하여 항산화, 항암, 항염증 및 항비만활성, 알코올에 대한 간 보호 효과와 미백효과 등의 기능성을 지니고 있음이 규명되어 있고[14, 21, 23, 24, 28], 생리활성 규명을 위한 다양한 연구들이 계속해서 추진되고 있다.

본 연구에서는 유산균에 의한 발효물이 혈장 지질 저하 효과, 간 기능 보호 작용, 정장작용, 면역기능 강화, 항돌연변이 효과, 항산화활성 및 항암작용 등의 다양 건강기능을 지니고 있으므로[2], probiotics로 흑마늘 발효물을 제조함에 있어 주요 활성 인자로 S-allyl cysteine (SAC)의 함량변화 및 항염증과 체내 항산화활성을 평가하여 흑마늘 probiotics 발효물 제조를 위한 최적의 조건을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 흑마늘은 남해보물섬흑마늘영농조합법인(경남 남해군)에서 구매를 하였으며, 껍질을 제거한 흑마늘은 초저온냉동고에 저장하고 실험 시 해동하여 사용하였다. 흑마늘 발효물 제조를 위해 3차 증류수에 흑마늘을 10, 20, 30% (w/v) 농도로 첨가한 후 믹서기(Hanil, Korea)에서 3분간 파쇄하였다. 이것을 121°C에서 15분간 멸균한 다음 probiotics 균주를 접종하였다. 흑마늘 발효를 위한 균주는 농촌진흥청 농업유전자원지원센터(KACC)로부터 9종의 probiotics를 분양받아 사용하였다.

흑마늘 발효물 제조를 위한 발효균주 선발

흑마늘에 대한 발효능이 우수한 균주를 선발하기 위하여 9종의 probiotics 각각을 MRS (Difco, USA) 평판배지에 streaking하여 37°C에서 24~48시간 배양한 후 생성된 single colony를 다시 MRS 배지에 접종하고 48시간 배양하여 starter를 제조하였다. 각각의 starter는 37°C에서 24시간 MRS 배지에서 배양한 후, 10% 탈지분유(서울우유협동조합, 서울)와 3% 흑설탕을 첨가하여 멸균한 용액에 접종하였다. 이를 37°C에서 24시간 배양하여 멸균한 20% 흑마늘 추출물에 각 3% (w/w)씩 접종한 다음 48시간 배양하여 생균수를 측정하였다.

흑마늘 발효물의 제조

흑마늘 추출물이 첨가된 배지에서 생육능이 우수한 probiotics 4종(*L. rhamnosus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. casei*, *L. plantarum*)을 선발하였다(Table 1). 선발된 균주를 이용한 발효물은 발효균주 선발시와 동일한 조건에서 발효하였으며, 72시간 동안 배양하면서, 발효 전(0시간), 12, 24 및 72시간에 시료를 취하여 생균수, pH, 산도 및 S-allyl cysteine (SAC)를 분석하였으며, 발효물을 동결 건조하여 분말화 한 것을 세포 실험용 시료로 사용하였다.

생균수 측정

발효 시간별로 시료를 회수하여 1분 동안 균질화시킨 후 1 ml를 취해 0.04% bromocresol purple이 첨가된 MRS 평판배지에 접종하여 평판측정법으로 생균수를 측정하였다. 각각의 plate는 37°C incubator에서 48시간 동안 배양하면서 형성된 colony 수를 계측하고 그 colony에 희석배수를 곱하여 시료 ml당 CFU (colony forming unit)로 나타내었다.

pH 및 산도 측정

발효 시간별로 회수한 발효물 1 g에 증류수를 가하여 50 ml로 정용한 다음 0.45 µm membrane filter로 여과한 여액을 시료로 사용하였다. pH와 산도는 자동정적기(G20 compact titrator, Mettler Toledo, Switzerland)를 사용하여 측정하였다. 자동정적기의 혼합 속도와 시간은 각각 30%와 15초로 하였으며, 종말점은 pH 8.4로 설정하여 0.1 N NaOH 용액 소량에 젯산계수를 곱하여 표시하였다.

S-allyl cysteine (SAC) 분석

흑마늘 발효물 1 ml를 취하여 3,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리 하였다. 원심 분리한 상층액을 0.22 µm membrane filter로 여과한 후 이를 분석용 시료로 사용 하였다. SAC 함량은 질량분석기(SQ Quantum LC-MS/MS, Thermo scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석용 칼럼은 ZORBAX SB-C₁₈ (4.6×250 mm, 5 µm, Agilent)을 사용하였고, 이동상은 물에 용해한 0.1% formic acid와 acetonitrile로 용해한 0.1% formic acid를 99:1, 80:20 및 0:100의 비율로 조절하면서 분석하였다. 이동상의 속도는 0.7 ml/min, 시료 주입량은 1 µl, scan type은 SRM mode 161.8<73.2로 유지하였다.

Raw 264.7 cell을 이용한 항염증 및 항산화 활성

세포배양

실험에 사용된 RAW 264.7 마우스 대식세포는 한국세포주 은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였다. RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, USA), 250 units/ml의 penicillin (Sigma Co Ltd, USA) 및 250 mg/ml의 streptomycin (Sigma Co Ltd, USA)을 포함하는 DMEM (Gibco, Germany) 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고, 2일 후 RAW 264.7 세포가 80% confluent 한 상태에서 세포를 분리하여 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 한 다음 현탁하여 사용하였다.

세포 독성 측정

발효 조건별 흑마늘 발효물을 멸균수에 용해시킨 후 0.22 µm 필터에 여과하여 사용하였다. 세포의 생존에 미치는 영향을 관찰하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Amresco, USA) 방법을 이용하여 측정하였다. 96 well plates에 RAW 264.7 세포를 6×10⁴

cells/well 농도로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후, 각 시료를 100 µg/ml 농도로 세포에 처리하였다. 이 때 시료의 농도는 예비실험을 통하여 미리 산정하였으며, 시료 처리 1시간 뒤에 1 µg/ml의 lipopolysaccharides (LPS)를 각 well에 가하여 24시간 동안 배양하였다. MTT 용액(5 mg/ml) 10 µl를 넣어 37°C에서 2시간 반응시킨 후 dimethyl sulfoxid (DMSO, Amresco, USA)를 100 µl 가하고 10분간 교반하여 ELISA reader (Epoch, Bioteck, Germany)로 570 nm 흡광도를 측정하였다. 세포의 독성은 시료를 처리하지 않은 무대조군 대비 시료 처리군의 세포 수에 대한 비로 세포생존율을 산출하여 표시하였다.

Nitric oxide (NO) 생성량 측정

세포로부터 생성된 NO의 양을 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로서 Griess reagent system (Promega, USA)을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 1×10⁶ cells/well 농도로 24 well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 발효 전과 72시간 발효한 흑마늘 발효물을 100 µg/ml의 농도로 각각 처리한 다음, 1시간 후에 LPS 1 µg/ml를 처리하여 24시간 배양한 후 세포 상층액을 회수하였다. 원심분리(3,000 rpm, 5 min, 4°C) 후, 세포 배양 상층액 50 µl를 취해 sulfanilamide solution 50 µl와 혼합하여 상온에서 10분간 반응시켰다. NED solution, 50 µl를 혼합하여 상온에서 10분간 반응 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, sodium nitrate로 표준곡선을 작성하여 NO 함량을 산출하였다.

DCFH-DA에 의한 intracellular ROS 측정

흑마늘 발효물의 intracellular ROS는 intracellular ROS assay kit (Cell biolabs, USA)를 이용하여 측정하였다. 96 well black plate에 5×10⁴ cell/well의 RAW 264.7 세포를 분주한 후 배양하여 세포를 well에 부착시킨 다음 serum free DMEM 배지로 교환하였다. 세포를 24시간 배양한 후 흑마늘 발효물을 100 µg/ml의 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양하였다. PBS (pH 7.4)로 3회 세척한 후 1XDCFH-DA를 배지에 100 µl 첨가하여 1시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후 또 다시 PBS로 3회 씻어낸 다음 H₂O₂를 1

mM의 농도로 배지에 첨가하였다. Lysis buffer 100 µl를 가하여 교반한 다음 fluorescence microplate reader (PerkinElmer, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 측정된 흡광도 값을 무처리군의 흡광도 값과 비교한 배수 (fold)로 ROS 생성량을 표시하였다.

통계분석

분석 결과는 SPSS 12.0 (12.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균±표준편차로 나타내었으며, ANOVA의 one-way Duncan's multiple test로 유의수준은 0.05 이하로 유의성을 분석하였다. 세포실험 결과는 ANOVA의 one-way Tukey's test로 유의수준 0.05 및 0.01 이하로 유의성 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

흑마늘 발효를 위한 probiotics 선발

흑마늘 발효능을 가진 균주 선발을 위하여 9종의 probiotics를 대상으로 20% 흑마늘 함유물을 발효시킨 후 생존수를 측정된 결과는 Table 1과 같다. 발효 48시간 후에 생존수를 측정하여 starter 접종 직후의 균수와 생존율을 비교한 결과, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. casei*, *L. plantarum* 4개의 균주가 생존율 100% 이상을 나타내었다. *L. salivarius* 균은 75.6%의 생존율을 보여 흑마늘을 영양분으로 이용은 가능할 것으로 판단되나 이상의 4개의 균주(100.1~106.2%)에 비하여 생존율이 낮았다. 나머지 균주에서는 생존율이 낮아 동일할 실험조건하에서는 생균이 확인되지 않았으므로 상기 4개의 균주를 흑마늘 발효물 제조용 균주로 선발하여 이후 실험을 진행하였다.

생균수 변화

흑마늘이 각각 10, 20, 30%씩 첨가된 배지에 선발된 발효능이 우수한 probiotics 4종의 균주를 각각 3%씩 접종하여 생존수를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 4종의 균주 중 *L. plantarum*

Table 1. Survival rate of probiotics in 20% black garlic added broth (Log CFU/ml)

No.	Strains name	Fermentation time (hr)		survival rate (%)
		0	48	
1	<i>Lactobacillus salivarius</i>	7.907	5.981	75.6
2	<i>Enterococcus faecalis</i>	7.792	ND	0.0
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	7.953	7.962	100.1
4	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	7.663	8.135	106.2
5	<i>Lactobacillus casei</i>	7.878	8.067	102.4
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	7.694	ND	0.0
7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	7.647	ND	0.0
8	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	7.442	ND	0.0
9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8.148	8.485	104.1

의 생육이 가장 좋았으며 4 균주 모두에서 24시간까지는 생균수가 증가하다가 이후부터는 감소하는 경향을 나타내었다. *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. casei* 및 *L. plantarum* 균주는 30% 흑마늘 첨가균에 비해 흑마늘의 첨가농도가 낮을 때 probiotics의 생육이 더 좋았다.

L. rhamnosus 균주 접종시 흑마늘 농도가 높을수록 발효 34시간 이후의 생육속도의 감소폭은 오히려 낮아지는 경향이 있었다. 흑마늘 10% 첨가균에서는 24시간 이후에 생육속도가 큰

폭으로 감소하였으나 흑마늘의 첨가 농도가 높아질수록 probiotics의 증식이 더 잘 유지되는 경향이 있었다. *L. paracasei* subsp. *paracasei* 균주는 흑마늘 10% 첨가시에는 발효 24시간에 8.64 log CFU/ml로 다른 농도에 비해 증식율이 높았으며, 흑마늘 30% 첨가시 24시간 이후에 큰 폭으로 생균수가 감소하였으나 20% 흑마늘 첨가균에서는 72시간까지 증식율이 유지되었다. *L. casei* 균주를 접종한 실험군에서는 흑마늘 10% 첨가시 8.22 log CFU/ml로 균의 증식이 우수하였다. 4종류의 균주 중에서 *L. plantarum*이 가장 우수한 증식율을 보였는데, 흑마늘의 첨가 농도에 관계없이 발효 72시간까지 초기 생균수에 비해 높은 생균수를 유지하였다.

pH 및 산도 변화

흑마늘을 농도별로 첨가한 발효물의 pH 및 산도를 비교한 결과는 Fig. 2 및 Table 2와 같다. pH는 흑마늘 10% 첨가균에서도 발효 초기부터 3.9~3.8 부근으로 낮았는데 이는 흑마늘 자체의 pH가 4.5 부근으로 낮기 때문으로 판단된다. 흑마늘의 첨가비율이 적을수록 pH의 저하율이 더 커져 10% 흑마늘 발효물에서는 균을 접종하지 않은 대조균을 제외한 모든 실험군의 pH가 발효 12시간 이후부터 유의적으로 감소하기 시작하여 발효 48시간 이후부터는 3.5이하로 낮아졌다. 반면 흑마늘의 첨가 비율이 가장 높은 30% 첨가균(C)에서는 발효 24시간까지 pH의 차이가 미미하였으며, 발효 72시간 이후에도 3.6 이상의 pH를 유지하였다.

발효기간 동안 산도의 변화는 pH의 변화와 상반되게 증가하는 경향을 나타내었으며, 흑마늘의 첨가량이 많을수록 초기 발효물의 산도가 높았고, 산도의 증가폭도 더 적었다. 즉, 산도가 가장 높았던 *L. plantarum* 균주를 접종한 실험군(#9)의 경우 흑마늘을 10% 첨가하였을 때 산도는 0.85% 이던 것이 발효 72시간에는 1.65%로 약 2배 증가하였으나 흑마늘을 30% 첨가하였을 때는 흑마늘 자체의 pH로 인해 발효물 제조 직후의 산도가 1.52%로 높았으며 발효 72시간 후에는 2.01%로 증가하였으나 증가폭은 1.3배 정도에 불과하였다. 발효물 제조시 흑마늘의 첨가량이 많아질수록 초기 산도는 높았으며, 발효가 진행되면서부터는 흑마늘의 첨가량이 많을수록 미생물의 생육은 오히려 방해받아 산의 생성이 상대적으로 적어지게 되어 산도의 증가폭은 더 적어지는 것으로 판단된다.

SAC 함량변화

흑마늘을 10~30% 첨가하여 발효물을 제조하면서 발효시간에 따른 SAC 함량 변화를 분석한 결과는 Table 3과 같다. 발효물 중의 SAC 함량은 흑마늘로부터 유래하는 것으로 흑마늘의 첨가량이 많을수록 그 함량이 높았는데, probiotics를 접종하지 않은 대조균의 경우 37°C에서 72시간 동안 보관되는 동안 그 함량이 점차 감소하는 경향을 보여 흑마늘 중의 SAC 함량이 일정 온도에서 저장되는 동안에도 자연 감소함을 알 수

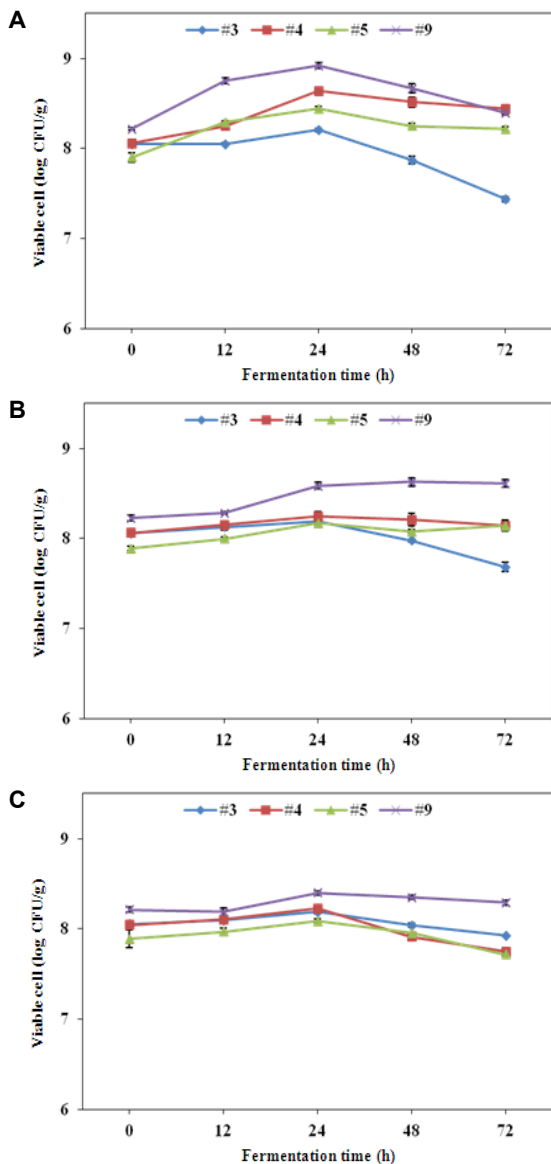


Fig. 1. Growth curve of probiotics in different concentration of black garlic added broth during fermentation times at 37°C for 72 hr. A : 10%, B : 20%, C : 30% black garlic added broth (w/w). Control : no addition probiotic, #3 : *L. rhamnosus* inoculated group, #4 : *L. paracasei* subsp. *paracasei* inoculated group, #5 : *L. casei* inoculated group, #9 : *L. plantarum* inoculated group.

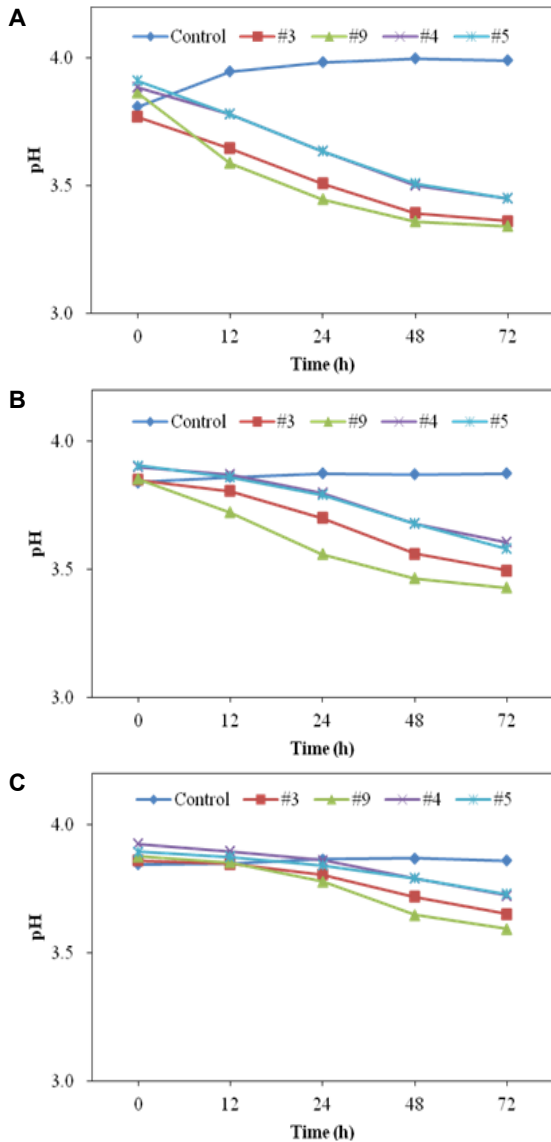


Fig. 2. Changes of pH in different concentration of black garlic added broth during fermentation times at 37°C for 72 hr. A : 10%, B : 20%, C : 30% black garlic added broth (w/w). Control : no addition probiotic, #3 : *L. rhamnosus* inoculated group, #4 : *L. paracasei* subsp. *paracasei* inoculated group, #5 : *L. casei* inoculated group, #9 : *L. plantarum* inoculated group.

있었다.

Probiotics를 접종한 발효물에서도 흑마늘의 첨가 농도가 많을수록 SAC 함량도 높았는데, *L. rhamnosus* 균주로 발효한 발효물에서는 흑마늘의 첨가량에 관계없이 발효기간이 경과할수록 SAC 함량은 증가하였다. 반면, 여타 균주를 접종한 발효물에서는 일정 조건을 제외하고는 발효초기에 비해 발효 72시간 후에 발효물 중의 SAC 함량은 미량씩 감소하는 경향이 있었다. 즉, *L. paracasei* subsp. *paracasei* 균주는 흑마늘 30% 첨가군, *L. casei*와 *L. plantarum* 접종 발효물은 흑마늘 20% 첨

가군에서만 SAC 함량이 감소하지 않거나 증가하였다. 이러한 경향은 발효 균주의 생육 및 대사특성과 상관성이 있을 것으로 추정되며, 흑마늘 발효 제품 중의 SAC 함량 감소를 방지하기 위해서는 복합균주를 이용한 발효조건을 설정하기 위한 연구가 추가로 진행되어야 할 것으로 판단된다.

세포 생존율

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에 대한 흑마늘 발효물의 세포독성을 확인하기 위하여 LPS 단독 처리군에서 세포의 독성을 나타내지 않는 농도(1 µg/ml)로 LPS를 처리하고, 예비 실험을 통해 흑마늘 발효물의 농도를 100 µg/ml로 정하여 병용처리 하였을 때 세포 독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다(Fig. 3). 발효 전 시료의 경우 93~103%의 세포생존율을 나타내었으며, 72시간 발효시켰을 때는 91~99%의 세포생존율을 나타내었다. 따라서 흑마늘 발효물은 100 µg/ml의 농도에서는 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였고, 실험 농도로 설정하였다.

NO 생성 억제활성

마우스 대식세포인 RAW 264.7 대식세포에서 LPS로 산화적 스트레스를 유발하여 발효 흑마늘 추출물이 NO 생성에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 4). NO는 면역기능에 관여하므로 염증유발에 중요한 역할을 하고, L-arginine이 L-citrulline으로 변화되는 과정에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생성되는 활성산소의 일종이다[15, 20]. NO는 superoxide 음이온과도 쉽게 반응하여 peroxyntirite와 같은 반응성이 높고 독성이 강한 산화제를 생성하므로[30] 생체 내에서 과도한 NO의 생성 증가는 혈관확장, 세포의 염증 및 자멸을 유발하여 조직손상을 초래한다고 보고되고 있다[12, 27].

LPS 단독 처리군에서 NO 생성량은 18.37 µM이었는데, 흑마늘을 혼합함으로써 NO 생성량은 감소하여 발효 전 시료에서 10.24~17.66 µM로 일부 시료에서는 유의적으로 생성량이 감소하였다. 72시간 발효물의 NO 생성은 13.22~18.58 µM로 일부 시료에서는 NO 생성량 저해 효과가 없었다. 흑마늘의 첨가량이 많을수록 NO 생성 억제효과도 낮았는데, 이는 발효되는 동안 생성된 대사체와 대사과정에서 생성된 라디칼이 산화적 스트레스를 가중시키는 효과를 나타내었기 때문으로 추정된다.

Choi 등[5]은 *L. bifermens* 균주를 이용하여 율피 발효추출물을 제조하였을 때 발효하지 않은 추출물에 비해 NO 생성량이 약 18.54%로 유의적인 감소를 보인다고 하였는데, 이는 본 연구의 결과와는 다소 상반되는 경향이였다.

Intercellular ROS 생성 억제활성

RAW 264.7 대식세포에 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유발시킨 후 발효 흑마늘 추출물이 ROS 생성에 미치는 영향을

Table 2. Changes of acidity in different concentration of black garlic added broth during fermentation times at 37°C for 72 hr (%)

Black garlic addition ratio	Fermentation time (hr)	Sample code				
		Control	#3	#4	#5	#9
10%	0	0.79±0.01 ^{aA}	0.85±0.02 ^{aB}	0.81±0.001 ^{aA}	0.81±0.007 ^{aA}	0.85±0.01 ^{aB}
	12	0.80±0.02 ^{aA}	0.95±0.01 ^{bC}	0.88±0.01 ^{bB}	0.88±0.004 ^{bB}	1.05±0.01 ^{bD}
	24	0.82±0.01 ^{aA}	1.12±0.02 ^{cC}	1.00±0.003 ^{cB}	1.02±0.01 ^{cB}	1.31±0.02 ^{dD}
	48	0.82±0.01 ^{aA}	1.35±0.06 ^{eC}	1.21±0.05 ^{eB}	1.18±0.02 ^{eB}	1.56±0.05 ^{eD}
	72	0.81±0.01 ^{aA}	1.55±0.01 ^{gC}	1.31±0.05 ^{fB}	1.30±0.01 ^{gB}	1.65±0.03 ^{gD}
20%	0	1.14±0.03 ^{bA}	1.14±0.01 ^{cA}	1.11±0.03 ^{dA}	1.14±0.02 ^{dA}	1.15±0.02 ^{cA}
	12	1.18±0.02 ^{cB}	1.25±0.01 ^{dC}	1.13±0.02 ^{dA}	1.17±0.02 ^{eB}	1.32±0.01 ^{dD}
	24	1.19±0.02 ^{cA}	1.35±0.01 ^{eB}	1.22±0.03 ^{eA}	1.25±0.02 ^{fA}	1.56±0.06 ^{eD}
	48	1.19±0.03 ^{cA}	1.53±0.07 ^{gC}	1.34±0.02 ^{fB}	1.36±0.01 ^{hB}	1.90±0.02 ^{hD}
	72	1.20±0.01 ^{cA}	1.71±0.05 ^{hD}	1.45±0.05 ^{gB}	1.52±0.01 ^{iC}	2.00±0.04 ^{iE}
30%	0	1.44±0.03 ^{dA}	1.49±0.04 ^{fB}	1.53±0.01 ^{hBC}	1.56±0.01 ^{iC}	1.52±0.01 ^{eBC}
	12	1.48±0.01 ^{eA}	1.52±0.02 ^{fB}	1.59±0.02 ^{iC}	1.57±0.01 ^{iC}	1.54±0.003 ^{eB}
	24	1.53±0.05 ^{fA}	1.57±0.02 ^{gAB}	1.62±0.02 ^{iAB}	1.64±0.02 ^{kB}	1.61±0.09 ^{gAB}
	48	1.55±0.03 ^{fA}	1.69±0.04 ^{hB}	1.72±0.01 ^{jB}	1.69±0.01 ^{lB}	1.90±0.05 ^h
	72	1.57±0.02 ^{fA}	1.80±0.01 ^{iC}	1.75±0.03 ^{jB}	1.78±0.01 ^{mBC}	2.01±0.02 ^{iD}

Values are mean ± SD of three replications.

Control : no addition probiotic, #3 : *L. rhamnosus* inoculated group, #4 : *L. paracasei* subsp. *paracasei* inoculated group, #5 : *L. casei* inoculated group, #9 : *L. plantarum* inoculated group.

^{A-D}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

^{a-m}Means with different superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

Table 3. Contents of SAC in different concentration of black garlic added broth during fermentation times at 37°C for 72 hr (mg/l)

Black garlic addition ratio	Fermentation time (hr)	Sample code				
		Control	#3	#4	#5	#9
10%	0	79.3±5.4 ^{baB}	70.0±4.6 ^{aA}	71.7±0.8 ^{aA}	75.7±2.1 ^{aAB}	74.3±4.1 ^{abAB}
	12	85.5±4.9 ^{bB}	68.2±2.5 ^{aA}	88.4±3.6 ^{bB}	97.2±6.4 ^{bC}	74.2±3.5 ^{abA}
	24	72.6±2.8 ^{aA}	70.9±3.9 ^{abA}	87.8±2.4 ^{bC}	99.0±1.9 ^{bC}	79.1±3.2 ^{bB}
	48	72.2±3.2 ^{aA}	75.7±2.6 ^{bcA}	96.6±3.5 ^{bB}	102.5±0.9 ^{cB}	76.3±5.1 ^{abA}
	72	68.1±3.9 ^{aA}	78.5±1.8 ^{cB}	89.0±5.1 ^{bC}	97.6±2.4 ^{bD}	73.0±2.4 ^{aAB}
20%	0	137.3±3.9 ^{dA}	137.1±3.2 ^{dA}	136.6±4.0 ^{dA}	133.9±3.0 ^{dA}	135.1±4.1 ^{cA}
	12	141.1±2.7 ^{dA}	136.5±4.8 ^{dA}	164.7±3.0 ^{eB}	162.5±2.7 ^{eB}	138.1±2.6 ^{cA}
	24	133.0±3.4 ^{cA}	140.8±3.3 ^{dB}	169.9±0.9 ^{fC}	187.2±2.2 ^{hD}	137.1±1.3 ^{cAB}
	48	134.0±6.8 ^{cA}	140.9±1.7 ^{dB}	164.7±1.5 ^{eC}	179.2±1.4 ^{gD}	137.7±1.5 ^{cAB}
	72	131.4±0.1 ^{cA}	149.1±5.5 ^{eC}	165.2±0.1 ^{gB}	168.9±1.6 ^{fD}	140.6±1.9 ^{cB}
30%	0	196.2±4.7 ^{fA}	209.9±0.1 ^{fC}	204.3±2.9 ^{fE}	201.2±0.5 ^{iAB}	201.1±2.4 ^{eAB}
	12	187.4±2.9 ^{eA}	213.7±2.0 ^{gC}	237.3±2.3 ^{hD}	228.8±1.4 ^{kD}	206.6±3.5 ^{fB}
	24	198.9±2.4 ^{fA}	212.4±1.9 ^{gC}	230.7±0.7 ^{fE}	232.9±0.2 ^{kD}	207.0±3.9 ^{fB}
	48	187.3±3.5 ^{eA}	216.5±1.9 ^{gC}	235.9±2.9 ^{eE}	231.4±0.8 ^{kD}	201.9±0.5 ^{eB}
	72	186.1±2.3 ^{eA}	215.2±0.4 ^{gC}	238.2±2.4 ^{fE}	224.2±3.6 ^{jD}	194.9±1.2 ^{dB}

Values are mean ± SD of three replications.

Control : no addition probiotic, #3 : *L. rhamnosus* inoculated group, #4 : *L. paracasei* subsp. *paracasei* inoculated group, #5 : *L. casei* inoculated group, #9 : *L. plantarum* inoculated group.

^{A-D}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

^{a-m}Means with different superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

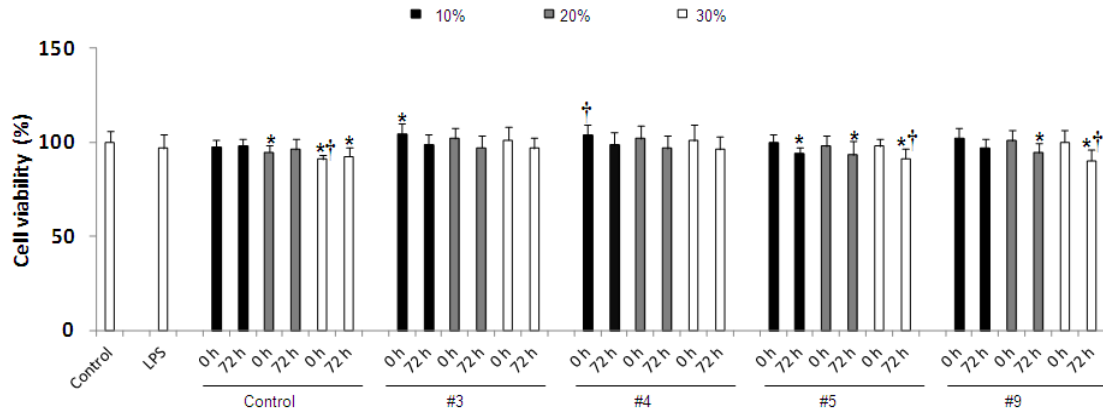


Fig. 3. Effect of black garlic in cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cell viability was evaluated by MTT assay. Raw 264.7 cells were pretreated with black garlic for 1 hr before being incubated with 1 µg/ml LPS for 24 hr. Result are presented as mean ± S.D of three independent experiments. Control : no addition probiotic, #3 : *L. rhamnosus* inoculated group, #4 : *L. paracasei* subsp. *paracasei* inoculated group, #5 : *L. casei* inoculated group, #9 : *L. plantarum* inoculated group. * $p < 0.05$ compared with corresponding control. † $p < 0.05$ compared with corresponding LPS.

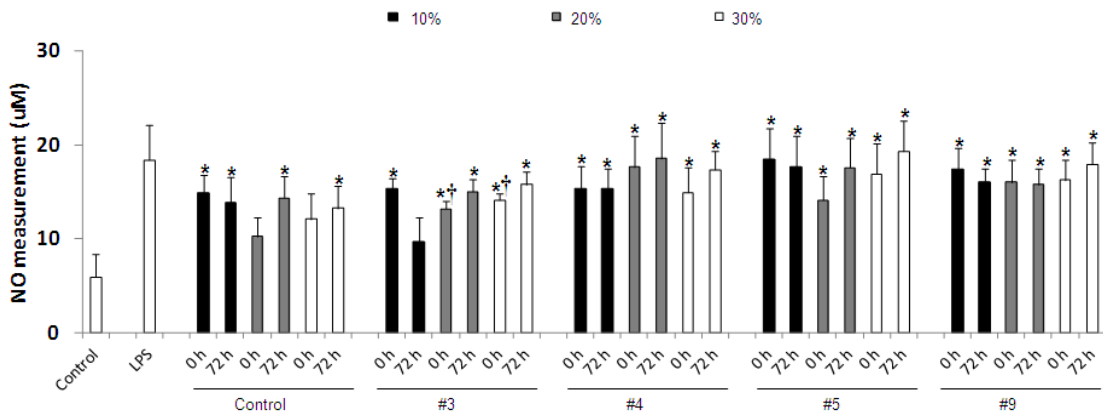


Fig. 4. Effect of black garlic on NO synthesis in LPS-induced RAW 264.7 cells. Raw 264.7 cells were pretreated with black garlic for 1 hr before being incubated with 1 µg/ml LPS for 24 hr. The culture supplements were subsequently isolated and analyzed for nitrite levels. Result are presented as mean ± S.D of three independent experiments. Control : no addition probiotic, #3 : *L. rhamnosus* inoculated group, #4 : *L. paracasei* subsp. *paracasei* inoculated group, #5 : *L. casei* inoculated group, #9 : *L. plantarum* inoculated group. * $p < 0.05$ compared with corresponding control. † $p < 0.05$ compared with corresponding LPS.

DCFH-DA assay로 확인하였다(Fig. 5). DCFH-DA는 세포에 처리하면 세포 안으로 침투하여 H₂O₂와 결합하여 형광을 발하는 DCF를 생성하게 되므로 그 정도를 측정하여 intercellular ROS를 측정 할 수 있다[10].

생체내에 ROS가 증가하게 되면 세포 및 조직에 산화적 스트레스로 작용하여 세포와 조직에 손상을 초래하게 되면 염증, 노화 관련 변성, 종양의 생성, 당뇨병 등 만성질환에 직간접적으로 영향 미치게 되므로 세포내 대사과정에서 ROS의 충분한 제거가 요구된다[8, 19]. 본 연구에서 정상 세포에 비해 H₂O₂ 단독 처리시 intercellular ROS 생성은 4배 증가하였으며, *L. casei* 와 *L. plantarum*을 접종하여 발효한 시료들에서 유의적으로 H₂O₂ 처리군에 비해 ROS 생성이 감소되어 흑마늘 뿐만 아니라 흑마늘 발효물도 intercellular ROS의 제어에

유효한 것으로 판단된다.

버섯 종균으로 발효한 진피 발효물의 항산화 활성을 평가한 결과 배양시간과 시료의 농도에 의존적으로 항산화 효과가 증가한다고 보고되어 있는데[25], 본 실험의 결과에서는 일부 시료를 제외하고는 균주 접종 초기에 비해 72시간 발효 후 ROS 생성이 오히려 증가하였다. 이는 균주를 접종하지 않고, 동일한 조건에서 보관한 대조군과 비교 할 때 발효에 사용된 균주뿐만 아니라 흑마늘의 농도에 따라서도 ROS 생성이 영향을 받을 수 있었다. 이러한 결과는 발효 전 시료에서는 흑마늘 자체의 항산화 활성으로 인하여 intercellular ROS 생성 억제능이 우수하나, 발효과정을 거치면서 흑마늘의 유효성분들이 미생물의 생육과정에서 생성되는 산화물의 소거에 활용되며, 미생물 대사로 인해 분해되거나 저분자화됨으로써 항

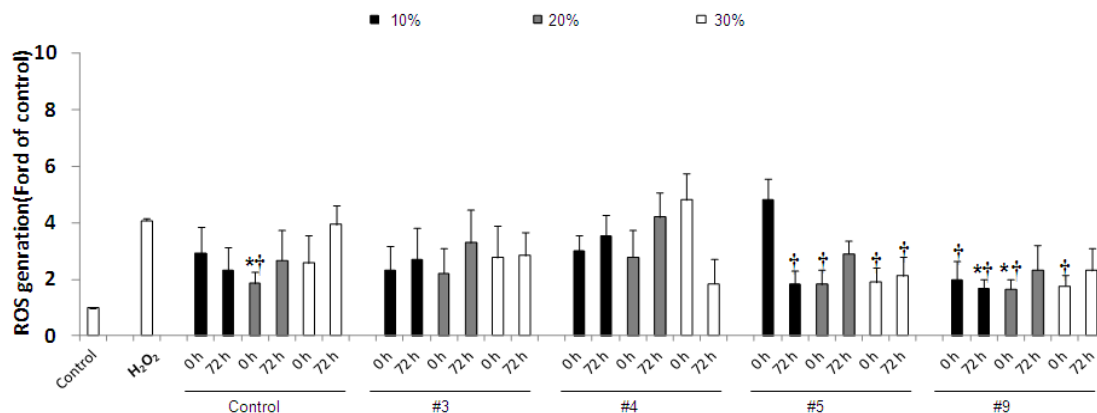


Fig. 5. Effect of black garlic in H₂O₂-induced intracellular ROS generation in RAW 264.7 cells. Raw 264.7 cells were pretreated with black garlic for 1 hr before being incubated with 1 µg/ml H₂O₂ for 24 hr. In the last 1 hr of treatment, 1XDCFH-DA was added. Result are presented as mean ± S.D of three independent experiments (n=3). Control : no addition probiotic, #3 : *L. rhamnosus* inoculated group, #4 : *L. paracasei* subsp. *paracasei* inoculated group, #5 : *L. casei* inoculated group, #9 : *L. plantarum* inoculated group. **p*<0.05 compared with corresponding control. †*p*<0.05 compared with corresponding H₂O₂.

산화 활성이 감소하기 때문에 발효 전 시료에 비해 상대적 ROS 생성량이 더 높아졌기 때문으로 추정된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지역특화기술융복합연구지원사업(과제번호: R0002043)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 7915-7922.
- Bong, Y. J., Jeong, J. K. and Park, K. Y. 2013. Fermentation properties and increased health functionality of kimchi by kimchi lactic acid bacteria starters. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **42**, 1717-1726.
- Brune, B., Zhou, J. and Knethen, A. V. 2003. Nitric oxide, oxidative stress and apoptosis. *Kidney Int Suppl* **84**, 4-22.
- Choi, S. H., Jun, C. D., Lee, B. S., Park, S. D., Oh, J. S. and Chung, H. T. 1993. Effect of various extrinsic and intrinsic factors on the nitric oxide production of murine macrophage. *Korean J BRM* **3**, 15-22.
- Choi, M. O., Kim, B. J., Jo, S. K., Jung, H. K., Lee, J. T., Kim, H. Y. and Kweon, D. J. 2013. Anti-allergic activities of *Castanea crenata* inner shell extracts fermented by *Lactobacillus bifementans*. *Korean J Food Preserv* **20**, 583-591.
- Delanty, N. and Dichter, M. A. 1998. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand* **98**, 145-153.
- Fridovich, I. 1989. Superoxide dismutase an adaption to paramagnetic gas. *J. Biol. Chem* **264**, 7761-7762.
- Forman, H. J. and Torres, M. 2001. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* **22**, 189-216.
- Ginn-Pease, M. E. and Whisler, R. L. 1998. Redox signals and NF-B activation in T cells. *Free Radic Biol Med* **25**, 346-361.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. 1990. Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview. *Method Enzymol* **186**, 1-85.
- Jiang, W. Y. 2005. Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: a perspective from modern science. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 558-563.
- Kikuchi, G., Yoshida, T. and Noguchi, M. 2005. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 558-567.
- Kim, K. A., Yi, H. S., Yun, H. J. and Park, S. D. 2009. Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of fractionated extracts of *Cynomorium Songaricum*. *Korean J Ori Med Physiol Pathol* **23**, 1320-1331.
- Kim, R. J., Lee, S. J., Kim, M. J., Hwang, C. R., Kang, J. R., Jung, W. J. and Sung, N. J. 2010. Effects of fresh, red and black garlic powder on lipid metabolism of obese rats induced by high fat diet. *J Agri Life Sci* **44**, 159-170.
- Kubo, M., Sasaki, M., Namba, K., Naruto, S. and Nishimura, H. 1975. Isolation of a new isoflavone from *Chinese Pueraria* flowers. *Chem Pharm Bull* **23**, 2449-2451.
- Lee, D. H., Sohn, D. S., Cho, D. Y., Kim, B. J., Lim, Y. Y. and Kim, Y. H. 2010. Anti-inflammatory and anti-oxidant effects of *Sophora flavescens* root extraction in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. *Korean J Med Mycol* **15**, 39-50.
- Liang, Y. C., Huang, Y. T., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F. and Lin, J. K. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* **20**, 1945-1952.
- Lin, Y. L. and Lin, J. K. 1997. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regu-

- lating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol* **52**, 465-472.
19. Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109-142.
 20. Nguyen, T. K., Shin, D. B., Lee, S. M., Im, K. H., Lee, T. S. and Lee, U. Y. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol and hot water extracts of *Pholiota nameko* fruiting bodies. *Korean J Mycol* **41**, 97-103.
 21. Park, D. J., Kim, S. G., Yoon, M. K., Park, S. Y., Kim, Y. H., Lee, S. J. and Choi, Y. W. 2010. Effect of extracts from raw and black garlic on anticancer, antioxidant, anti-inflammatory and whitening. *Korean J Hort Sci Technol* **28**, 39-40.
 22. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26**, 1231-1237.
 23. Shin, D. H., Yoon, M. K., Choi, Y. W., Gweon, O. C., Kim, J. I., Choi, T. H. and Choi, Y. H. 2010. Effects of aged black garlic extracts on the tight junction permeability and cell invasion in human gastric cancer cells. *J Life Sci* **20**, 528-534.
 24. Shin, J. H., Choi, D. J., Lee, S. J., Cha, J. Y. and Sung, N. J. 2008. Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* **37**, 965-971.
 25. Song, M. H., Bae, J. T., Ko, H. J., Jang, Y. M., Lee, J. D., Lee, G. S. and Pyo, H. B. 2011. Anti-oxidant effect and anti-inflammatory of fermented citrus unshiu peel extract by using schizophyllum commune. *J Soc Cosmet Scientists Korea* **37**, 351-356.
 26. Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y. and Lin, J. K. 1999. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF κ B in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol* **126**, 673-680.
 27. Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y. and Koizumi, S. 1999. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* **103**, 129-135.
 28. Yang, S. T. 2010. Effects of aged black garlic extract on ethanol induced hangover in rats. *J Life Sci* **20**, 225-230.
 29. Yi, H. S., Heo, S. K., Yun, H. J., Choi, J. W., Jung, J. H. and Park, S. D. 2008. Anti-oxidative and Anti-inflammatory effects of *Draconis Resina* in mouse macrophage cells. *Korean J Herbol* **23**, 179-192.
 30. Yoon, J. H., Park, S. G., Lee, M. J., Park, J. Y., Seo, K. S., Woo, K. C. and Lee, C. E. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Bletilla striata Reichenbach* fil. fractions as cosmetic. *J Life Sci* **23**, 1073-1078.

초록 : Probiotics를 이용한 흑마늘 발효물의 품질특성 및 생리활성

탁현민 · 김경민 · 김중수 · 황초롱 · 강민정 · 신정혜*

((재)남해마늘연구소)

본 연구는 probiotics를 이용해 흑마늘 발효물을 제조하고 그 품질특성 및 생리활성을 확인하기 위하여 흑마늘을 20% 첨가한 배지에 9종의 probiotics를 각각 접종하여 생육정도를 분석한 결과 *L. rhamnosus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. casei*, *L. plantarum* 균주가 흑마늘 혼합 배지에서 성장이 우수하였다. 선발된 4종의 균주 각각을 이용하여 흑마늘이 10, 20 및 30% 첨가된 흑마늘 발효물을 제조하여 제조 직후와 발효 12, 24, 48 및 72시간에 시료를 취하여 생균수, pH, 산도, S-allyl cysteine (SAC) 함량을 측정하였으며, 발효전과 발효 72시간 후 발효물을 동결 건조한 시료를 이용하여 RAW 264.7 세포에서 nitric oxide (NO)와 reactive nitrogen species (ROS) 생성억제능을 통해 생리활성을 확인하였다. *L. Plantarum*으로 발효하였을 때 흑마늘의 첨가량이 증가하여도 높은 생균수를 유지하였다. 발효시간이 경과할수록 pH는 낮아졌고, 산도는 증가하는 경향을 나타내었다. SAC의 함량은 흑마늘의 첨가 비율이 높을수록 더 높았으며, 발효 24~48시간에 증가하였다가 이후에는 감소하는 경향이었는데, 흑마늘을 30% 첨가하여 *L. paracasei* subsp. *paracasei* 균주로 72시간 발효하였을 때 238.2 mg/l로 가장 SAC 함량이 높았다. RAW 264.7 세포에 LPS로 염증을 유발하여 NO 생성 억제능을 확인한 결과 *L. rhamnosus*로 발효하였을 때 다른 균주 발효물에 비해 활성이 높았는데, 흑마늘을 10% 첨가하여 72시간 발효하였을 때 LPS 처리구에 비해 약 53%의 NO 생성 억제능을 보여 가장 활성이 우수하였다. 생체내 항산화활성 평가를 위하여 과산화수소로 유발된 ROS 생성 억제능을 확인한 결과 *L. plantarum* 균주로 발효한 발효물에서 유의적으로 활성이 높았다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 발효균주에 따라 흑마늘 발효물의 특성이 서로 상이하므로, 원하는 활성에 부합하는 균주를 사용하거나 혼합균주를 사용하여 발효물을 제조하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.