

## Antioxidant Activity and Chemical Characteristics of *Orostachys malacophyllus* and Fermented *Orostachys malacophyllus*

Hee-Young Ahn, Da-Jeong Choe and Young-Su Cho\*

Department of Biotechnology, Dong-A University, Hadan-2dong Sahagu, Busan 604-714, Korea

Received March 25, 2015 / Revised May 18, 2015 / Accepted May 18, 2015

*Orostachys malacophyllus* grow on the old roofing tile or on the rock of mountain and is belong to *Crassulaceae* family. After air drying for *Orostachys malacophyllus* (OM), using the mixture of lactic acid bacteria (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*) was fermented (FOM). OM and FOM extracted using water (W), ethanol (E) and methanol (M) and were measured extracts yield, pH and Brix. Extracted OM and FOM were tested by *in vitro* experimental models of  $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, Fe/Cu reducing power, linoleic acid peroxidation using ferric thiocyanate and thiobarbituric acid (TBA) methods and peroxidation of rat liver homogenate. In addition, the bioactive materials (phenolic compounds, flavonoids and minerals) were measured. The highest phenolic compounds and flavonoids were OME 122.2 mg/100 g and OME 84.0 mg/100 g. OM and FOM's major minerals were K, Ca and Mg. The highest free radical scavenging activity showed in FOMM (93.9%), OMM (93.4%), FOME (92.1%) and OME (91.9%) at 0.5% additional level. Fe reducing powers were strong in FOME and FOMM and Cu reducing powers were strong in OME and FOMM. Antioxidant activities on lipid peroxidation using rat homogenate as measured by TBARS method showed strong in FOME and on lipid peroxidation of linoleic acid as measured by ferric TBA method showed strong in OME and FOME and measured by ferric thiocyanate showed strong in FOME and FOMM.

**Key words** : Ferment, lactic acid bacteria, *Orostachys japonicus*

### 서 론

생물체들은 생체 내 생화학 반응 및 환경적 인자에 의해 활성산소종이 생성되며, 생체 내에서 활성산소종의 생성이 증가된 상태는 산화적 스트레스를 일으켜 세포 내 단백질 및 지질성분 등이 기능적으로 손상되고 노화, 심장병, 당뇨병 관련 질환 등 다양한 질환의 원인이 되기도 한다[8, 25]. 이에, 산화적 스트레스에 의한 세포 구성성분의 산화적 손상을 지연시키거나 억제하는 연구가 진행되고 있으며 최근들어, 천연 항산화 물질과 발효를 이용한 기능성 소재의 개발에 대한 관심이 높아지고 있다.

와송(둥근바위솔, *Orostachys malacophyllus*)은 오래된 기와 지붕이나 산 위의 바위에서 자라나며 기와 지붕에서 자라는 모양이 소나무 잎 또는 꽃을 닮아 와송 또는 바위솔, 기와솔, 옥송, 암송 등으로 불리고, 돌나무과(*Crassulaceae*)의 여러해살이 식물로서, 민간에서는 와송의 뿌리를 제거한 전초를 건조

하여 약용으로 사용되어 왔다[10, 20]. 지금까지 알려진 와송에 대한 연구는 대부분이 *Orostachys japonicus*으로 이에 존재하는 phytochemical으로는 벤조산 유도체인 methyl gallate 등의 페놀산류 4종, kaempferol, quercetin, kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucoside 등의 플라보노이드류 8종 등의 성분이 알려져 있으며[28], fatty acid ester [23], triterpenoid류, sterol류[22] 및 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, gallic acid 등의 aromatic acid [27]류 등의 다양한 생리활성 성분들을 포함하고 있다. *O. japonicus*는 항산화 효과[19], 항균 효과[27], apoptosis 유도 효과[14], 항염증 효과[15], 항암 효과[12] 등의 다양한 생리 활성을 나타내는 것으로 보고되었다. 대부분의 와송에 관한 연구는 *O. japonicus*로 국한되어 있으며, 와송의 수요가 늘어남에 따라 와송 재배종의 연구가 요구된다. 이에 본 연구는 일반 농가에서 재배되는 종인 *O. malacophyllus*를 사용하여 와송 재배종의 기초연구 자료로써 의미가 있다.

한편, 유산균은 인간에게 가장 유익한 미생물의 한 종류로 예로부터 발효 유제품, 장류, 김치 등 생활에서 다양하게 활용되면서 직접적, 간접적으로 인간과 밀접한 관계를 가진다[6]. 또한, 유산균 발효를 통해 젖산을 비롯한 여러 가지 대사산물을 생산하여 각종 발효식품, 건강기능식품, 의약품 등으로 광범위하게 이용되고 있으며[6], 최근에는 체내 유익균 성장을 촉진하는 probiotics 균주로서 위장기능 개선, 체내 콜레스테롤

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7586, Fax : +82-51-200-5746

E-mail : choys@dau.ac.kr

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.

를 흡수저해, 면역 조절, 영양소의 흡수를 높이는 등의 다양한 질병 예방과 생리 조절작용을 하는 것으로 보고되어 유산균의 이용도는 증가하고 있다[6, 7]. 따라서 와송 재배종의 건조 분말에 유산균을 이용한 발효를 통해 생성되는 생리활성 기능의 증진이 기대되며, 본 연구에서는 생리활성물질의 개발을 위한 기초 연구의 일환으로 와송 재배종과 유산균 발효 와송의 이화학적 특성과 항산화 활성을 비교 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 발효조건

본 실험에 사용한 와송(등근마위솔, *Orostachys malacophyllus*)은 ㈜풀그린(서울, 한국)으로부터 2014년 4월에 구입하여 자연 건조시킨 후 뿌리와 잎 등 모든 부분을 분쇄하여 시료로 사용하였다. 발효는 시판되고 있는 유산균 starter (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*) (Yogourmet, Quebec city, Canada)를 MRS 배지(Becton, Dickinson & Co., Le Pont de Claix, France)에 접종하여 전배양 한 후 배양액을 제거한 균체를 petri dish에 담은 와송 분말에 5% 접종하였으며, 3일간 37°C에서 고체 발효하여 발효와송을 얻었다. 발효물은 60°C에서 8시간 동안 열풍 건조하였으며, 완전히 건조 후 분말화하여 시료로 사용하였다.

### 시료의 추출 및 수율

와송과 발효와송을 추출하기 위하여 100 g을 각각 취해 10 배의 정제수를 가한 후 37°C 항온수조에서 3시간씩 교반 하면서 3회 반복 추출하였다. 95% 에탄올, 95% 메탄올 용매를 정제수 추출물과 동일한 방법으로 추출한 후 추출액을 모아 Adventec 110 mm 2 여과지(Toyo 2A; Toyo Roshi, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과하였다. 얻은 여과액을 감압 농축(Buchi Rotavapor R-215, Flawil, Switzerland)하여 각각의 용매를 제거 시키고 동결건조(Eyela FUD-2100, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)하여 추출 수율(%)을 구하고 이를 시료로 사용하였다.

### 페놀성 화합물 함량 측정

페놀성 화합물의 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis 법[24]으로 측정하였다. 즉, 각 용매 추출물에 Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합하고 실온에서 반응시킨 후 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 가하여 혼합하고 50°C에서 발색시킨 후 spectrophotometer (Hitachi U-2900, Tokyo, Japan)의 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 페놀성 화합물의 함량은 tannic acid를 0-500 µg/ml 농도로 하여 시료와 동일한 방법으로 측정된 표준곡선으로부터 계산하였다.

### Flavonoid 함량 측정

Flavonoid 함량은 Jia 등의 방법[11]에 따라 측정하였다. 각 용매 추출물에 5% NaNO<sub>2</sub> 용액을 가하고, 10% AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 잘 혼합하고, 이 혼합 용액으로 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 플라보노이드 함량은 표준 물질로서 (+)-catechin hydrate을 20-200 µg/ml 농도로 시료와 동일한 방법으로 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

### 미네랄 함량 측정

와송과 발효와송 분말의 미네랄 함량은 AOAC 분석 방법 [1]에 준하여 측정하였다. 즉, 건조 분말 1 g을 정확히 취해 각 550°C 회화로에서 3시간 회화 시킨 후 3 N HCl에 용해시켜 완전히 산분해시켜 수욕상에서 산을 완전히 제거하고, 이 건고물에 3 N HCl를 가하여 여과한 후 원소 종류에 따라 각각 일정비율로 희석하여 원자 흡광 분광광도계(AAnalyst 300, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

### DPPH에 의한 항산화 활성 측정

항산화 활성 측정은 Blois 방법[3]에 따라 측정하였다. 와송과 발효와송의 각 추출물 분말을 각 0.01%, 0.05%, 0.10%, 0.50%, 1.00%의 농도로 만든 각 시료에 DPPH 반응 용액을 넣어 잘 혼합한 후 실온에서 30분간 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. 이때 활성 대조를 위하여 기존에 항산화제로 많이 사용되고 있는 합성 항산화제 BHT (butylated hydroxytoluene)를 0.05% 농도로 첨가하여 시료와 동일한 방법으로 528 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH를 이용한 항산화 활성은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도차를 백분율(%)로 표시하였다.

### DPPH radical scavenging activity (%)

$$= [1 - (\text{sample absorbance } 528 \text{ nm}) / \text{control absorbance } 528 \text{ nm}] \times 100$$

### Fe/Cu 환원력 측정

Fe 환원력 측정은 Zhu 등의 방법[29]에 따라 측정하였다. 와송과 발효와송의 각 용매 추출물 0.01%, 0.05%, 0.10%, 0.50%, 1.00%의 시료 용액 0.75 ml을 취하고, 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 및 1% (w/v) potassium ferricyanide [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>]을 혼합하여 50 °C에서 진탕반응 시켰다. 이 반응액에 10% trichloroacetic acid (w/v)를 가하여, 상층액을 취하고 증류수 및 0.5% ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>)를 혼합한 후 실온에서 반응 시켜 spectrophotometer (Hitachi U-2900)의 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편, Cu-환원력 측정은 와송과 발효와송의 각 용매 추출물 0.01%, 0.05%, 0.10%, 0.50%, 1.00%의 시료 용액에 0.01 M CuCl<sub>2</sub>, 7.5 mM ethanolic neocupprone solution, 1 M NH<sub>4</sub>OAc buffer를 혼합하고 증류수 넣은 후 상온에서 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 환원력 비교를 위하여 기존에 항산화제로 많

이 사용되고 있는 천연 항산화제 ascorbic acid와 합성 항산화제 BHT를 각각 시료와 동일 농도로 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였다. 환원력은 시료 반응액에서 흡광도가 증가된 만큼 강한 환원력을 나타내어 준다.

**간 microsome의 지질 과산화 억제 활성 측정**

간 microsome 분획을 이용한 지질 과산화 억제 활성은 Wong등의 방법[26]에 따라 50 mM Tris-HCl buffer (pH7.5), 간 microsome 분획(1 ml 중 1 mg의 단백질 함유), 0.1 mM ascorbate와 5 mM FeSO<sub>4</sub> 반응액을 잘 혼합한 후 37°C에서 반응 시켜 과산화를 유도시켰다. 대조구는 시료를 첨가하지 않고 위와 동일한 방법으로 실시하였다. 반응액에 3 M trichloroacetic acid와 2.5 N HCl의 혼합용액을 가하고 원심분리 후 상등액에 0.67% 2-thiobarbituric acid (TBA)를 넣고 가열하여 발색시켰다. 반응액은 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 지질과산화의 억제율을 대조구 흡광도에 대한 저해율(%)로 나타내었다.

**TBA에 의한 항산화 활성 측정**

Ohkawa의 방법[21]에 따라 linoleic acid (25 mg/ml in EtOH) 1.0 ml과 시료용액 1.0 ml을 시험관에 넣고 혼합한 후 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 2 ml와 증류수 1.0 ml를 가하여 stock을 제조하고, 40°C에서 incubation 하면서 반응 1일, 3일, 4일, 6일, 7일째 일정한 시간에 측정하였다. 측정 방법 [4]은 시료액 0.5 ml를 tube에 넣고 35% trichloroacetic acid 0.25 ml와 0.75% aqueous TBA 0.5 ml를 가하여 혼합한 후 boiling water bath에서 5분마다 shaking 하면서 15분간 처리하여 흐르는 물에 냉각시키고, 70% trichloroacetic acid 0.5 ml를 가한 다음 20분 반응하고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 그 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Thiocyanate에 의한 항산화 활성 측정**

Linoleic acid (25 mg/ml in EtOH) 1.0 ml과 시료용액 1.0 ml을 시험관에 넣고 혼합한 후 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 2 ml와 증류수 1.0 ml를 가하여 stock을 제조하고, 40°C에서 incubation 하면서 반응 1일, 3일, 4일, 6일, 7일째 일정한 시간에 측정하였다. 측정방법[4, 21]은 stock 용액에서 0.1 ml을 취하여 시험관에 넣고 70% ethanol 3 ml과 ammonium thiocyanate (0.3 g/ml in water) 용액 0.1 ml, ferrous chloride (2.45 mg/ml in 3.5% hydrochloric acid) 용액 0.1 ml을 혼합한 후 3분 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**통계 처리**

실험으로부터 얻어진 결과는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차(mean ± SE)로 표시하였고, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 나타내

었다[5].

**결과 및 고찰**

**와송과 발효 와송의 용매별 추출 수율과 pH 변화**

와송(OM)과 발효와송(FOM)의 수율은 전체적으로 정제수 추출물이 에탄올과 메탄올 추출물에 비해 높았고, 발효와송 추출물이 28.96%로 가장 높았다(Table 1). 와송과 발효와송의 정제수 추출물에서의 pH 변화는 와송 정제수 추출물에서 5.26이고, 발효와송 정제수 추출물에서 4.75로 발효시킴으로써 와송의 pH가 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 이는 유기산을 생성하는 균인 유산균의 특성으로 사료된다. 발효와송의 에탄올과 메탄올 추출물 또한 와송의 에탄올과 메탄올 추출물에 비해 pH가 감소된 것을 확인할 수 있었다.

**총 페놀성 화합물 함량 및 flavonoid 함량**

페놀성 화합물은 자연계에 널리 존재하는 2차 대사산물의 하나로서 phenolic hydroxy기를 가지고 있어 단백질 등의 거대분자들과 결합하는 성질을 가지고, 항산화 효과, 항균 효과 등의 생리활성 기능을 가진다[17]. OM과 FOM의 정제수 추출물은 수율이 높았던 결과에 반해 정제수 추출물로 용출된 총 페놀성 화합물이 OM과 FOM의 에탄올 및 메탄올 추출물의 총 페놀성 화합물보다 낮은 수치를 나타내었다(Table 2). OM과 FOM의 에탄올 및 메탄올 추출물의 총 페놀성 화합물은 OM 에탄올 추출물에서 122.27 mg/100 g이고, FOM 에탄올 추출물에서 94.88 mg/100 g으로 발효를 함으로써 함량이 낮아진 것을 확인하였고, 또한 OM 메탄올 추출물에서 87.75 mg/100 g이고, FOM 메탄올 추출물에서 81.02 mg/100 g으로 FOM의 총 페놀성 화합물이 더 낮게 측정되었고, 페놀성 화합물에 속하는 대표적인 화합물인 flavonoid 함량은 발효 전과 발효 후 약간의 수치적 차이는 있으나 유의적인 차이는 없었다.

**미네랄 함량**

OM과 FOM의 미네랄 함량 측정 결과는 Table 3와 같다.

Table 1. Extract yield and pH in the water, ethanol and methanol extracts from *Orostachys malacophyllus* (OM) and fermented *Orostachys malacophyllus* (FOM)

		Extract yield (%)	pH
OM	W	24.49	5.26
	E	11.53	5.38
	M	16.84	5.92
FOM	W	28.96	4.75
	E	10.67	5.25
	M	16.39	5.70

OM : *Orostachys malacophyllus*, FOM : Fermented *Orostachys malacophyllus*, W : Water extracts, E : Ethanol extracts, M : Methanol extracts.

Table 2. The concentrations of total phenolic compounds and flavonoids in the water, ethanol and methanol extracts from *Orostachys malacophyllus* (OM) and fermented *Orostachys malacophyllus* (FOM)

	Total phenolic compounds concentrations (mg/ 100g dry weight)		Flavonoids concentrations (mg/ 100g dry weight)	
	OM	FOM	OM	FOM
Water	35.42±0.26 <sup>a</sup>	39.56±0.38 <sup>a</sup>	23.47±0.15 <sup>a</sup>	19.96±0.29 <sup>a</sup>
Ethanol	122.27±8.37 <sup>b</sup>	94.88±1.86 <sup>c</sup>	84.03±3.97 <sup>b</sup>	81.25±1.10 <sup>b</sup>
Methanol	87.75±1.55 <sup>cd</sup>	81.02±0.00 <sup>d</sup>	73.44±0.66 <sup>d</sup>	67.63±0.59 <sup>d</sup>

Values are mean ± S.E., n=3.

Abbreviations are the same as in Table 1.

Values with different letters are significantly different at p<0.05.

Table 3. Mineral concentrations in *Orostachys malacophyllus* (OM) and fermented *Orostachys malacophyllus* (FOM)

Minerals	Mineral concentrations (ppm)	
	OM	FOM
Potassium	160.60±1.30	184.00±1.50
Calcium	115.50±0.70	130.30±2.60
Magnesium	22.10±0.20	25.50±0.20
Manganese	4.44±0.10	4.90±0.05
Zinc	3.50±0.70	4.30±0.70
Iron	2.57±0.02	3.17±0.05
Sodium	1.57±0.02	2.52±0.05

Values are mean ± S.E., n=3.

Abbreviations are the same as in Table 1.

OM과 FOM은 K, Ca, Mg, Mn이 주성분으로, 이중 K가 OM에서 160.60 ppm이고, FOM에서 184.00 ppm으로 가장 많이 함유되어 있었다. Ca은 OM이 115.50 ppm, FOM이 130.30 ppm이었고, Mg은 OM이 22.10 ppm, FOM이 25.50 ppm 그 다음으로 Mn은 OM이 4.44 ppm, FOM이 4.90 ppm으로 측정되었다. 특히, 측정된 원소들은 FOM이 OM보다 증가한 수치를 나타내었는데, 유산균으로 발효됨으로써 OM의 미네랄 함량을 높인 것으로 사료된다[6, 7].

**DPPH free radical에 의한 전자공여 활성**

안정한 라디칼인 DPPH는 산화방지물질로부터 전자나 수소를 제공 받으면 비라디칼로 전환되면서 흡광도가 변화하는 원리로, 천연물의 정제수 혹은 유기용매 추출물의 항산화 활성 측정법으로 많이 이용되고 있다[16]. 대조구로 쓰인 합성 항산화제 BHT 0.05%는 92.49%의 항산화 활성을 나타내었는데, OM 메탄올 추출물 0.5%와 FOM 메탄올 추출물 0.5%에서 각각 93.47%, 93.99%으로 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1). 또, OM 에탄올 추출물 0.5%에서 91.97%, FOM 에탄올 추출물 0.5%에서 92.19%의 활성이 나타나 각각 유기 용매의 추출물에서 BHT와 가까운 활성으로 측정되었다. DPPH에 의한 항산화 활성 측정은 대부분의 식물 추출물에서 페놀성 화합물의 증가와 함께 활성도 증가하는 경향을 보인다고 알려져 있는데

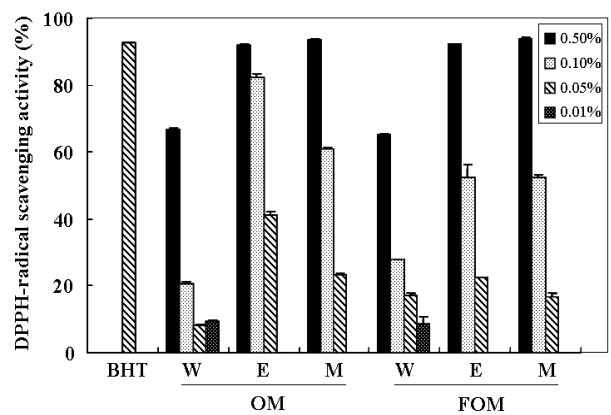


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of water, ethanol and methanol extracts from *Orostachys malacophyllus* (OM) and fermented *Orostachys malacophyllus* (FOM). BHT : butylated hydroxytoluene (0.05%), Values are mean ± S.E., n=3. Abbreviations are the same as in Table 1.

[13], FOM에서는 페놀성 화합물이 OM보다 감소하였지만 항산화 활성은 OM과 거의 비슷한 수치를 유지하고 있어 위의 보고와 차이를 보이는 것으로 사료된다. OM과 FOM 에탄올 및 메탄올 추출물 1%에서는 각각 0.5%보다 감소한 경향을 나타내었다. DPPH 발색법은 시료에 존재하는 발색 입자에 의한 반응으로 자색에서 황색으로 변화하는 반응이며, 황색으로 변화될수록 흡광도의 수치가 낮아지는 반응이다[16]. 따라서, OM과 FOM의 에탄올 및 메탄올 추출물 0.5%의 활성을 미루어 보았을 때 추출물 1%에서는 발색입자가 많아 오히려 혼탁을 일으키게 되어, 흡광도의 수치가 올라가 활성이 상대적으로 낮게 측정된 것으로 추측된다.

**Fe/Cu 환원력 측정**

Fe<sup>3+</sup>와 Cu<sup>2+</sup>는 hydroxyl radical(-OH)과 superoxide radical(O<sup>2-</sup>) 등의 생성을 촉진하며, 이러한 금속이온자에 대한 chelating 활성이 높을수록 산화 반응에 촉매작용을 감소시킬 수 있으며, free radical의 생성을 억제함으로써 과산화 반응을 방지할 수 있는 능력을 측정하는 지표로 이용되고[2], 환원력 효과는 반응 물질의 흡광도 수치가 높을수록 환원력의 세기가

높다는 것을 나타낸다. 모든 군에서 농도 의존적으로 환원력의 세기가 증가하는 경향을 보였고, OM과 FOM의 정제수 추출물보다 OM과 FOM의 에탄올 및 메탄올 추출물에서 높은 환원력을 나타내었다(Table 4). OM과 FOM의 에탄올 및 메탄올 추출물에서 대부분 각 군간의 큰 차이는 나타나지 않았지만, Cu 환원력 측정 결과 FOM의 메탄올 추출물 1%가 2.85이었고, OM의 메탄올 추출물 1%가 2.63의 환원력을 나타내 환원력의 세기가 발효로 인해 증가한 것을 알 수 있었다. 또한 FOM 추출물 1%에서 OM보다 약간의 증가를 보이거나 비슷한 수치를 나타내었다. Fe 환원력 측정 결과 OM과 FOM 에탄올 및 메탄올 추출물 1%에서 양성 대조구인 BHT 1%와 ascorbic acid 1%의 결과와 비슷한 수준으로 높게 측정되었으며, 특히 FOM의 에탄올 추출물에서는 0.1%의 농도에서 측정 결과 2.79이고, ascorbic acid 0.1%가 2.76을 나타내어 FOM의 에탄올 추출물은 0.1%에서도 높은 환원력을 나타내었다.

**간장 microsome을 이용한 지질 과산화 억제활성**

과산화 지질은 oxygen radical이 세포막의 불포화지방산

에 작용하여 생성되고, 세포막의 손상이나 세포괴사 등의 독성을 일으키며, 암, 염증 및 노화 등 여러 질병들의 원인이 될 수 있다[9]. 동물 체내에서 생체막 지질의 과산화물 생성 정도를 나타내는 TBARS 함량은 각 조직 세포의 microsome에 Fe<sup>++</sup>/ascorbate을 첨가하여 비효소적으로 유도된다[26]. 지질 과산화 억제능(%)은 OM과 FOM의 에탄올 추출물, 정제수 추출물 및 메탄올 추출물 순이었고, 각군 모두 농도 의존적으로 높았다(Fig. 2). OM과 FOM의 에탄올 추출물 1.00%과 0.50%에서 대조구인 BHT의 지질 과산화 억제능보다 높은 활성을 나타내었고, 0.10%, 0.05% 0.01%에서는 BHT보다 약간 높거나 비슷한 활성을 나타내었다. 이를 바탕으로 OM과 FOM의 에탄올 추출물에서 우수한 항산화능을 기대할 수 있다.

**Linoleic acid 산화 실험계를 이용한 항산화 활성**

불포화 지방산인 linoleic acid와 OM과 FOM의 각 추출물 1.00%를 일정한 온도에서 일주일 동안 저장하였고, 이 과정에서 나타나는 지질 과산화를 TBA 방법으로 측정하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 Control 에서는 지질 산화반응

Table 4. Reducing power of water, ethanol and methanol extracts from *Orostachys malacophyllus* (OM) and fermented *Orostachys malacophyllus* (FOM)

Composition	Conc.(%)	Fe-Reducing power		Cu-Reducing power	
		OM	FOM	OM	FOM
BHT	1.00	2.92±0.04		4.00±0.00	
	0.50	2.87±0.00		3.46±0.09	
	0.10	2.85±0.02		2.62±0.02	
	0.05	2.19±0.00		2.16±0.00	
	0.01	0.54±0.01		0.85±0.04	
AA	1.00	2.90±0.03		3.54±0.04	
	0.50	2.88±0.05		2.37±0.02	
	0.10	2.76±0.20		2.09±0.03	
	0.05	2.14±0.02		1.74±0.02	
	0.01	1.46±0.03		0.52±0.00	
Water	1.00	2.65±0.01	2.73±0.01	1.57±0.01	1.34±0.01
	0.50	1.59±0.01	1.94±0.01	1.01±0.01	0.94±0.01
	0.10	0.35±0.01	0.44±0.01	0.32±0.02	0.28±0.00
	0.05	0.18±0.01	0.22±0.01	0.16±0.00	0.16±0.00
	0.01	0.04±0.00	0.05±0.00	0.05±0.00	0.05±0.00
Ethanol	1.00	2.90±0.03	2.93±0.03	2.8±0.05	2.80±0.04
	0.50	2.78±0.03	2.87±0.00	2.50±0.01	2.52±0.03
	0.10	1.15±0.04	2.79±0.02	1.07±0.03	0.85±0.02
	0.05	0.61±0.01	0.84±0.01	0.60±0.03	0.46±0.01
	0.01	0.13±0.00	0.42±0.00	0.14±0.00	0.01±0.01
Methanol	1.00	2.90±0.03	2.96±0.00	2.63±0.02	2.85±0.02
	0.50	2.85±0.01	2.79±0.00	2.24±0.02	2.39±0.02
	0.10	0.88±0.03	0.73±0.00	0.79±0.03	0.78±0.02
	0.05	0.48±0.02	0.36±0.00	0.43±0.02	0.37±0.03
	0.01	0.08±0.00	0.06±0.00	0.08±0.00	0.08±0.00

BHT : butylated hydroxytoluene, AA : Ascorbic acid, Values are mean ± S.E., n=3.

Abbreviations are the same as in Table 1.

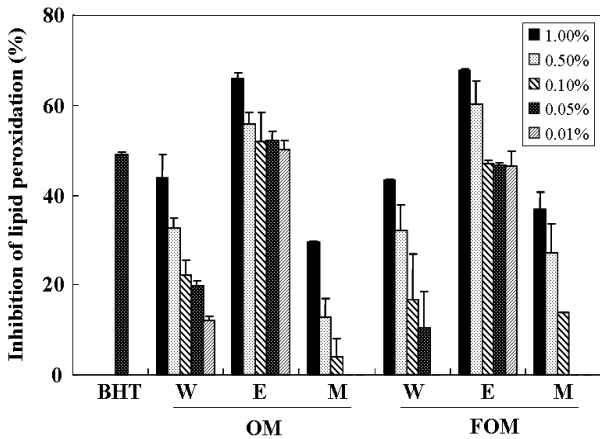


Fig. 2. Antioxidant activities of water, ethanol and methanol extracts from *Orostachys malacophyllus* (OM) and fermented *Orostachys malacophyllus* (FOM) on lipid peroxidation using rat liver homogenate as measured by TBARS method. BHT : butylated hydroxytoluene (0.05%), Values are mean  $\pm$  S.E., n=3. Abbreviations are the same as in Table 1.

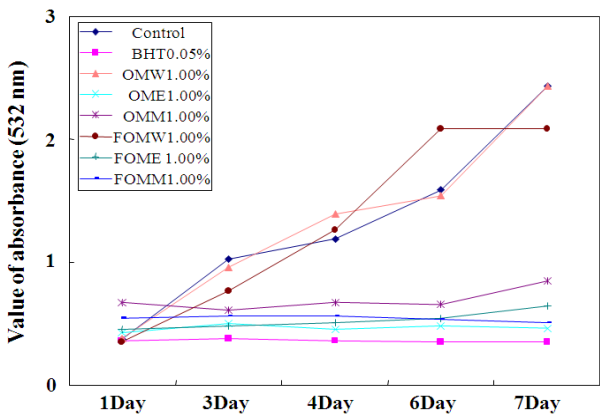


Fig. 3. Antioxidant activities of water, ethanol and methanol extracts from *Orostachys malacophyllus* (OM) and fermented *Orostachys malacophyllus* (FOM) on linoleic acid oxidation as measured by ferric TBA method. Control : Distilled water, BHT : butylated hydroxytoluene (0.05%), Values are mean  $\pm$  S.E., n=3. Abbreviations are the same as in Table 1.

이 일어나 7일 동안 꾸준히 증가하였고, 대조구인 BHT는 반응 첫째 날부터 실험종료일까지 산화를 억제시켜 낮은 수치로 유지시켜 항산화 효과를 나타내었다. OM과 FOM의 정제수 추출물은 Control과 마찬가지로 지질 과산화물을 거의 억제하지 못하였다. OM과 FOM의 에탄올, 메탄올 추출물은 대조구인 BHT와 비슷한 경향을 나타내었고, 특히 OM의 에탄올 추출물과 FOM의 메탄올 추출물은 BHT와 비슷한 경향으로 높은 수치의 지질 과산화 억제를 보였다.

위의 TBA 측정과 같이 불포화 지방산인 linoleic acid를 이용하여 thiocyanate 방법으로 측정할 결과는 Fig. 4에 나타나

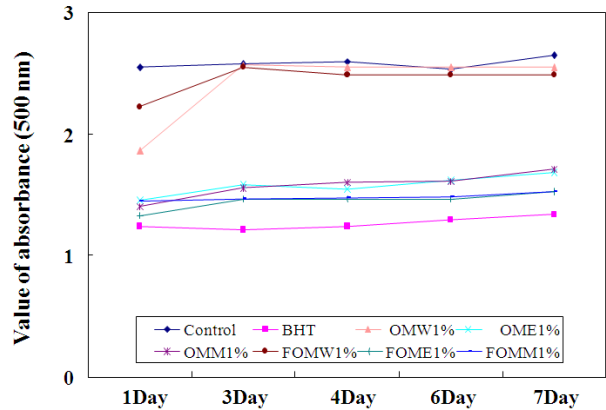


Fig. 4. Antioxidant activities of water, ethanol and methanol extracts from *Orostachys malacophyllus* (OM) and fermented *Orostachys malacophyllus* (FOM) on linoleic acid oxidation as measured by ferric thiocyanate method. Control : Distilled water. BHT: butylated hydroxytoluene (0.05%), Values are mean  $\pm$  S.E., n=3. Abbreviations are the same as in Table 1.

었다. OM과 FOM의 정제수 추출물은 1일차에만 약간의 지질 과산화 억제를 보이고 3일차부터는 Control과 같은 수치를 보이며 낮은 지질 과산화 억제능을 나타내었다. OM과 FOM의 에탄올, 메탄올 추출물은 대조구인 BHT와 유사한 경향을 나타내었으며, 지질 과산화 수치 또한 BHT보다 높기는 했지만 많은 차이는 보이지 않았다. 특히, FOM의 메탄올 추출물은 BHT와 유사한 경향을 나타낸 것은 물론 BHT에 상응할 만큼 낮은 지질 과산화 수치를 보였다. OM과 FOM의 각 추출물의 결과는 Lee 등의 연구[18]에서 건조 방법에 따른 와송(*Orostachys japonicus*) 각 추출물의 linoleic acid를 이용한 지질 과산화 억제능을 측정할 결과, 에탄올과 메탄올 추출물이 정제수 추출물보다 더 높은 항산화 효과를 나타낸 것으로 보고된 결과와 유의한 결과를 나타내었다. 이를 토대로, 앞의 TBA 측정 결과에서도 좋은 결과를 나타낸 FOM의 메탄올 추출물은 항산화 소재의 가능성이 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 2015년 동아대학교 연구비 지원에 의해 수행된 연구결과입니다.

### References

- A.O.A.C. 1975. Official methods of analysis. 12th ed., Association of official analytical chemist. Washington, D.C., U.S.A.
- Ai, S., Soichi, T. and Toshihide, N. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.* **51**(12), 3661-3667.

3. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1204.
4. Cha, J. Y., Kim, H. J., Chung, C. H. and Cho, Y. S. 1999. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 1310-1315.
5. Duncan, D. B. 1959. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **13**, 11-42.
6. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
7. Goldin, B. R. Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.* **80**, 203-207.
8. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York, U.S.A., pp.105-350.
9. Hur, J. M., Lee, J. H., Choi, J. W., Hwang, G. W., Chung, S. K., Kim, M. S. and Park, J. C. 1998. Effect of methanol extract and kaempferol glycosides from *Armoracia rusticana* on the formation of lipid peroxide in bromobenzene-treated rats *in vitro*. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**, 231-236.
10. Jeong, K. J., Chon, Y. S., Ha, S. H. and Yun, J. G. 2013. Optimum light intensity, media and fertilization for potted *Orostachys malacophyllus* from Taebaek. *Flower Res. J.* **21(2)**, 46-51.
11. Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.
12. Kim, C. H., Park, J. H., Lim, J. K., Lee, K. J., Chung, G. Y. and Jeong, H. J. 2003. The activity of antioxidants of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Kor. J. Medicinal Corp. Sci.* **11**, 31-39.
13. Kim, E. Y., Baik, I. H., Kim, J. H., Kim, S. R. and Rhtu, M. R. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **36**, 333-338.
14. Kwon, J. and Han, K. S. 2004. Effects of *Orostachys japonicus* A. Berger in the immune system. *Kor. J. Medicinal Corp. Sci.* **12**, 315-320.
15. Lee, H. S., Ryu, D. S., Lee, G. S. and Lee, D. S. 2012. Anti-inflammatory effects of dichloromethane fraction from *Orostachys japonicus* in RAW 264.7 cells: suppression of NF-kB activation and MAPK signaling. *J. Ethnopharmacol.* **140(2)**, 271-6.
16. Lee, J. M., Chung, H., Chang, P. S. and Lee, J. H. 2007. Development of a methods predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food Chem.* **103**, 662-669.
17. Lee, J. and Lee S. R. 1994. Some physiological activity of phenolic substances in plant foods. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**, 317-323.
18. Lee, S. J., Cha, J. Y., Shin, J. H., Chung, M. J. and Sung, N. J. 2008. Antioxidant effect of Wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) extracts on edible oil and fat. *J. Life Sci.* **18(8)**, 1106-1114.
19. Lee, S. J., Seo, J. K., Shin, J. H., Lee, H. J. and Sung, N. J. 2008. Antioxidant activity of Wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) according to drying methods. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37(5)**, 605-611.
20. Lee, S. J., Song, E. J., Lee, S. Y., Kim, K. B. W. R., Kim, S. J., Yoon, S. Y., Lee, C. J. and Ahn, D. H. 2009. Antioxidant activity of leaf, stem and root extracts from *Orostachys japonicus* and their heat and pH stabilities. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38(11)**, 1571-1579.
21. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
22. Park, H. J., Lim, S. C., Lee, M. S. and Young, H. S. 1994. Triterpene and steroids from *Orostachys japonicus*. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**, 20-24.
23. Park, H. J., Young, H. S., Kim, J. O., Rhee, S. H. and Choi, J. S. 1991. A study on the chemical constituents of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Kor. J. Pharmacogn.* **22**, 78-84.
24. Swain, T., Hillis, W. and Oritegam M. 1959. Phenolic constituents of *Ptunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **10**, 83-88.
25. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44-84.
26. Wong, S. F., Holliwell, B., Richmond, R. and Skowroneck, W. R. 1981. The role of superoxide and hydroxyl radical in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid. *J. Inorg. Biochem.* **14**, 127-134.
27. Yoon, S. Y., Lee, S. Y., Kim, K. B. W. R., Song, E. J., Kim, S. J., Lee, S. J., Lee, C. H. and Ahn, D. H. 2009. Antimicrobial activity of the solvent extract from different parts of *Orostachys japonicus*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38(1)**, 14-18.
28. You, E. A., Lee, S. J., Lee, S. K., Kang, J. H. and Shin, J. C. 2006. Total phenol contents and antioxidant activity in *Orostachys japonicus* A. Berger grown under various cultivation conditions. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **14(4)**, 234-238.
29. Zhu, Q. V., Hackman, R. M., Jodilensunsa, X. X., Holt, R. R. and Keen, C. L. 2002. Antioxidative activities of Oolong tea. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 6229-6934.

## 초록 : 와송과 발효 와송 추출물의 이화학적 특징 및 항산화 활성

안희영 · 최다정 · 조영수\*

(동아대학교 생명공학과)

본 연구는 와송(등근마위솔, *Orostachys malocophyllus*)에 대한 기초 연구의 일환으로 와송(OM)과 유산균(*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*)으로 발효된 와송(FOM)의 건조 분말을 각각 정제수, 에탄올 및 메탄올로 추출하여 각각의 수율과 pH를 측정된 뒤, 총 페놀성 화합물과 이에 속하는 flavonoid 함량, 미네랄 함량을 측정하고 DPPH free radical scavenging 활성, Cu/Fe 환원력, 간 조직의 microsome 생체막의 지질과산화 억제능 및 linoleic acid를 이용한 지질과산화 정도를 비교 검토하였다. 총 페놀성 화합물과 이에 속하는 대표적인 화합물인 flavonoid 함량은 와송의 정제수 추출물에서 가장 높은 함량을 나타내었고, 미네랄 함량은 K, Ca, Mg, Mn, Zn, Fe, Na의 순으로 높게 측정되었으며, 7원소 모두 발효 전에 비해 발효 후 함량이 증가하였다. DPPH를 이용한 radical 소거능을 측정한 결과, 와송과 발효와송의 에탄올 및 메탄올 추출물 0.5%에서 대조구인 합성항산화제 BHT 0.05%에 가까운 활성을 나타내었다. Fe와 Cu의 환원력은 모든 군에서 농도 의존적으로 증가하였고, 와송과 발효와송의 에탄올 및 메탄올 추출물 1%에서 대조구인 BHT 1%와 ascorbic acid 1%에 가까운 높은 환원력을 나타내었다. 간 조직을 이용하여 측정한 지질과산화 억제활성은 모든 군에서 농도 의존적으로 증가하였고, 와송과 발효와송의 에탄올 추출물은 0.01%에서부터 BHT와 비슷한 활성 나타내었으며 1%에서는 BHT보다도 높은 활성을 나타내었다. TBA법과 thiocyanate법으로 지질과산화를 측정한 결과, 와송과 발효와송의 에탄올 및 메탄올 추출물 1%에서 지질과산화 억제능을 보였으며 발효와송의 메탄올 추출물은 두 가지 방법 모두에서 높은 지질과산화 억제능을 나타내었다. 따라서, 유산균 발효 와송은 천연 항산화제 소재로서 활용될 가능성이 보이며 이에 대한 심층적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.