

발효 전후 구기자열매 추출물의 ADH 및 ALDH 활성인자 분리 및 특성

최지현, 강동희, 김현수*

Separation and Characteristics of ADH and ALDH Activators in Fermented *Lycii fructus* Extract

Ji-Hyun Choi, Dong-Hee Kang, and Hyun-Soo Kim*

Received: 9 May 2016 / Revised: 20 June 2016 / Accepted: 27 June 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: *Lycii fructus* has been traditionally used as a preventive and therapeutic medicine to treat enervation and diverse chronic diseases. In this study, we investigated whether fermentation of *Lycii fructus* extract (LE) increases the enzymatic activity of the alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH). The fermentation of LE by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2376 was shown to increase the enzymatic activity of ADH and ALDH. TLC analysis of LE and fermented LE (FLE) showed that ADH and ALDH activities increased in different spots. Fraction No. 66 of LE and fraction No. 68 of FLE by Silica gel chromatography showed increased ADH activity of 129.1% and 148.9%, respectively. Fractions No. 128 of LE and FLE by Silica gel chromatography showed increased ALDH activity of 134.1% and 148.1%, respectively. The fraction No. 68 of FLE obtained by HPLC showed new peaks at R_f 11.938min, R_f 22.072min and R_f 28.842min, indicating that ADH activity was increased. The LE and FLE fractions with the greatest increases in ADH activity peaked at the same time (R_f 13min), whereas the LE and FLE fractions with the greatest increases in ALDH activity peaked at different times (R_f 16.307min and R_f 36.640min, respectively).

Key words: *Lycii fructus* extract, Fermented *Lycii fructus* extract, Alcohol dehydrogenase, Aldehyde dehydrogenase, Activators

1. INTRODUCTION

국민건강영양조사에서는 1회 평균 음주량이 남성 7잔, 여성 5잔 이상이며 주 2회 이상 음주를 할 때 고위험 음주군이라 한다. 한국인의 음주 습관은 2013년 국민건강영양조사에서 고위험 음주군으로서 주 2회 이상 음주를 하는 경우를 조사한 결과 남성 19.7%, 여성 5.4%로 확인되어 우려할 수준으로 나타났다 [1]. 알코올은 스트레스 해소나 사고 등을 목적으로 애용되는 기호품으로 소량 섭취 시 기분전환을 위해서도 좋고 혈액순환에 도움이 되어 건강에 유익할 수 있지만, 많은 양을 장기간 섭취 시 췌장염, 심근경색, 신경장애, 결핵, 간질환 등이 유발된다 [2]. 체내에 들어온 알코올은 간이나 몸의 다른 기관과 부위로 운반되어 ADH (Alcohol dehydrogenase)에 의해 acetaldehyde로 전환되며, 그 다음 ALDH (Aldehyde dehydrogenase)에 의해 acetic acid로 전환되어 소변이나 CO₂로 배설된다 [3]. 우리 몸에 치명적인 손상을 주는 것은 알코올 그 자체보다도 산화과정에서 생성된 acetaldehyde가 심혈관계에 작용하여 급성 증상을 나타나게 하며, 체내의 거의 모든 기관을 손상시키고 특히 간조직의 구조와 기능에 치명적인 손상을 유발한다 [4,5].

ADH와 ALDH 활성은 미네랄 성분이나 아미노산 성분에 의해 촉진되거나 재활성화되는 것으로 알려져 있다 [6,7]. 아미노산 중 aspartic acid, asparagine, glycine, glutamic acid, methionine이 간 보호 효과 및 알코올 대사에 관련이 있는 것으

계명대학교 자연과학대학 기초과학부 생명과학전공
Major in Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, College of
Natural Science, Keimyung University, Daegu 42601, Korea
Tel: +82-53-580-5284, Fax: +82-53-580-5284
e-mail: hskim@kmu.ac.kr

로 보고되었다 [8,9]. 숙취해소를 위한 제품의 주요 소재로 사용되고 있는 헛개나무 열매 추출물, 숙취해소 식품으로 알려진 콩나물, 복어 추출물의 주요 아미노산인 arginine, aspartic acid 및 glutamic acid가 알코올에 의한 간 손상으로부터 보호 효과가 있다고 보고되었다 [10].

구기자열매 (*Lycii fructus*)는 가지과에 속한 구기자나무의 성숙한 과실로서 항암효과, 면역증진, 간 기능 개선효과, 콜레스테롤 저하작용, 혈당 및 혈압강화작용, 피부미백작용 등에 대한 효능이 보고되었으며 [11-16], Yoon 등은 구기자 추출물 함유 알코올을 실험동물에 응용시켰을 때 알코올에 의하여 생성된 유해산소와 acetaldehyde의 해독효소활성이 증가됨을 관찰하였다 [17].

미생물을 이용하여 천연물을 발효할 때 천연물의 영양성분은 미생물의 에너지를 제외하고 그대로 보존되며, 미생물이 분비하는 각종 가수분해효소와 세포 내 조직에 결합되어 있던 생리활성 물질들이 유리되기 때문에 발효 전보다 발효 후 천연물의 생체이용률 (bioavailability)이 훨씬 높아지는 것으로 알려져 있다 [18-20]. 천연물 발효에 사용되는 미생물은 곰팡이, 고초균, *Lactobacillus* 속 균주를 포함한 유산균과 효모인 *Saccharomyces* 속 균주 등을 이용하고 있다 [21]. 유산균, 효모, 고초균 등 유익한 미생물을 이용한 발효기술의 진보로 천연물의 생리활성 효능이 증가된 발효산물을 얻거나 상호간의 상승효과에 의해 생리활성 효능이 상승되는 제품들이 개발되고 있다 [22].

본 연구에서는 해독작용이 있다고 알려져 있는 구기자열매를 추출하여 *Bacillus* 속 균주, *Saccharomyces* 속 균주와 *Schizosaccharomyces* 속 균주를 이용하여 발효시킨 후 ADH 및 ALDH의 활성을 증대시키고, 각 효소의 활성을 증대시키는 기능을 가진 활성인자 (activator)로 추정되는 물질을 확인하고자 한다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 구기자열매의 추출

발효에 사용한 한약재는 간 해독작용이 알려진 구기자열매 (*Lycii fructus*)를 선정하였으며, 약재는 대구광역시 약전골목 내 한약방에서 구입하여 사용하였다. 구기자열매의 추출은 methanol, ethanol과 ethyl acetate를 이용한 유기용매 추출과 열수 추출을 통해 수행하였다. 구기자열매의 유기용매 추출은 구기자열매 40 g에 methanol, ethanol과 ethyl acetate를 각각 500 mL 첨가하여 28°C에서 24시간 동안 진탕하여 수행하

였으며, 구기자열매의 열수 추출은 구기자열매 40 g에 물 1 L를 첨가하여 100°C에서 1시간 동안 가열하여 수행하였다. 각 추출물은 filter paper를 이용하여 여과한 후 vacuum rotary evaporator (EYELA, Japan)를 이용하여 농축하였으며, 농축액은 사용할 때까지 4°C 이하에서 냉장 보관하였다.

2.2. 구기자열매 추출물의 발효

2.2.1. 유용미생물의 선정 및 배양

발효를 위해 사용한 미생물은 Table 1에서 보는 바와 같이 고초균인 *Bacillus* 속 균주, 효모인 *Schizosaccharomyces* 속 균주와 *Saccharomyces* 속 3균주를 사용하였다. *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*는 청국장에서 분리하여 한국미생물보존센터에서 16S rDNA 분석 의뢰를 통해 동정된 균주이며, *Schizosaccharomyces pombe* var. *pombe* KCTC 7522와 *Saccharomyces ellipsoideus* KCTC 7243는 생물자원센터에서 분양을 받았으며, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2346와 *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2376은 오사카 발효연구소에서 분양을 받아 사용하였다. *B. subtilis* subsp. *subtilis*는 nutrient 배지 (beef extract 3 g, peptone 3 g/L, pH 6.8, Difco, USA)에, 효모는 YM 배지 (yeast extract 3 g, malt extract 3 g, dextrose 10 g, peptone 5 g/L, pH 7.6, Difco, USA)에 각각 계대배양한 후 균체를 20% glycerol이 포함된 저장액에 넣어 -70°C에 보관하였으며, 실험에 사용하기 전 계대배양을 실시하였다.

2.2.2. 구기자열매 추출물의 발효

구기자열매 추출물의 발효는 단일배양을 통하여 유용균주를 선정 후 복합배양을 수행하였다. 구기자열매 추출물은 nutrient 배지와 YM 배지에 5 mg/mL 농도로 첨가하였으며, 단일배양 및 복합배양은 구기자열매 추출물을 첨가한 각 배지를 멸균하여 수행하였다. 발효 시 사용한 *Bacillus* 속 균주, *Schizosaccharomyces* 속 균주와 *Saccharomyces* 속 균주는 1×10⁸ cells/mL로 stock액을 제조한 후 멸균된 생육배지에 각각 0.4% (v/v)를 접종하였다. 단일배양 시 온도는 각 균주의 최적 생육 온도를 기준으로 설정하여 *Bacillus* 속 균주는 37°C에서, 효모는 28°C에서 7일간 배양한 후 배양일수별로 sampling을 하였다. 배양액은 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리 후 상등액을 분리하여 실험에 사용하였다. 복합배양은 구기자열매 추출물을 5 mg/mL 농도로 첨가한 nutrient 배지와 YM 배지를 각각 사용하였으며, *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *S. cerevisiae* IFO 2376을 0.4% (v/v)의 농도로 접종하여 수행하였다. 복합배양 시 조건은 28°C에서 7일간 배양하였으며 배양일수별로 sampling을 하였다. 배양액은 4°C, 3,000 rpm에서 10분

Table 1. Strains used for fermentation

Strains	Sources
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	Cheonggukjang
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2346	Sake yeast Kyokai No. 6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2376	Sake yeast Kyokai No. 8
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> var. <i>pombe</i> KCTC 7522	Listan grapes, Spain
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> KCTC 7243	Wine

간 원심 분리 후 상등액을 분리하여 실험에 사용하였다.

2.2.3. 생육도 확인

발효 구기자열매 추출물에서 공시균주의 생육은 1일, 3일, 5일과 7일에 sampling을 한 배양액의 생균수 측정을 통해 확인하였다. 생균수 측정을 위해 발효 구기자열매 추출물은 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리를 하였다. 침전물은 멸균수에 현탁하여 희석을 한 후 nutrient 평판배지와 YM 평판배지에 도말하였으며, 28°C에서 3일간 정지배양 한 후 생균수를 확인하였다.

2.3. 효소활성 촉진 효과 측정

2.3.1. ADH 활성 촉진 효과 측정

ADH 활성측정은 Bergmeyer [23]의 방법을 약간 변형하여 흡광도 340 nm에서 NADH의 생성 양을 측정하여 대조군에 대한 상대적 활성으로 비교하였다. 시료의 ADH 활성 촉진 효과는 시료 50 µL에 증류수 700 µL, 1 M Tris-HCl buffer (pH 8.8) 375 µL, 20 mM NAD (Sigma-Aldrich) 150 µL, ethanol 150 µL와 standard enzyme인 ADH (Sigma-Aldrich) 75 µL (1 unit/mL)를 넣어 혼합 후 30°C에서 5분간 방치한 후 340 nm에서 측정하여 확인하였다. 결과는 대조구로서 시료를 첨가하지 않은 ADH 자체 활성을 100%로 하여 실험구의 상대 활성 (%)을 나타내었다.

$$\text{ADH activity (\%)} = (B / A) \times 100$$

A : 대조구의 흡광도, B : 실험구의 흡광도

2.3.2. ALDH 활성 촉진 효과 측정

ALDH 활성측정은 Koivula 및 Koivusalo [24]의 방법을 약간 변형하여 acetaldehyde에서 acetate를 생성하는 효소로 NAD로부터 NADH를 생성하는 원리를 이용하였다. 시료의 ALDH 활성 촉진 효과는 시료 50 µL에 증류수 1,050 µL, 1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 150 µL, 20 mM NAD (Sigma-Aldrich) 50 µL, 0.1 M acetaldehyde 50 µL, 3 M KCl 50 µL, 0.33 M 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) 50 µL와 standard enzyme인 ALDH (Sigma-Aldrich) 50 µL (1 unit/mL)를 넣어 혼합하여 30°C에서 5분간 방치한 후 340 nm에서 측정하여 확인하였다. 결과는 대조구로서 시료를 첨가하지 않은 ALDH 자체 활성을 100%로 하여 실험구의 상대 활성 (%)을 나타내었다.

$$\text{ALDH activity (\%)} = (B / A) \times 100$$

A : 대조구의 흡광도, B : 실험구의 흡광도

2.4. 발효 전후 구기자열매 추출물의 비교

2.4.1. TLC

TLC 분석은 발효 전후 구기자열매 추출물의 물질을 비교하기 위해 수행하였다. 발효 전후 구기자열매 추출물은 30°C의

건조기 (Sanyo Electric Co.)에 두어 수분을 증발시킨 후 methanol을 이용하여 5 mg/mL의 농도로 조정하여 TLC 분석에 사용하였다. 5 mg/mL의 발효 전후 구기자열매 추출물은 TLC plate (Silica gel 60 F254, Merck, Germany)에 5 µL를 spotting 하고 methylene chloride, ethanol과 증류수를 3:5:2로 혼합한 전개용매를 포화시킨 TLC chamber에 넣어 전개하였다. 검출은 UV lamp를 사용하여 254 nm와 365 nm에서 조사한 후 확인하였다. Silica gel plate 상에서 UV로 확인된 spot은 R_f를 산출하고, 회수하여 methanol로 추출한 후 농축하여 ADH 및 ALDH 활성 측정 시 첨가하여 활성변화를 비교하였다.

2.4.2. Silica gel column chromatography

발효 전후의 구기자열매 추출물은 methylene chloride로 평형화시킨 silica gel column (=3.7×30 cm, 70~230 mesh, Merck, Germany)에 100 mg/mL로 첨가한 후 용출 용매로서 methylene chloride, ethanol과 증류수를 3:5:2, 2:5:2, 2:6:2, 2:6:3으로 혼합한 후 순차적으로 용출하여 5 mL씩 분획하였다. 각 분획은 vacuum rotary evaporator (EYELA, Japan)로 10 mg/mL로 농축하여 ADH 및 ALDH 활성 측정 시 첨가하여 활성변화를 비교하였다.

2.4.3. HPLC

Silica gel column chromatography를 수행한 후 각 효소활성의 증가가 가장 높은 발효 전후 구기자열매 추출물의 분획은 C₁₈ column (HAIsil C₁₈ 5micron, Higgins Analytical, Inc., USA)을 이용한 HPLC (Shimadzu LC 10-A, Japan)에 10 µL를 주입하여 분석하였다. 유속은 0.8 mL/min, 검출은 UV-visible detector (SPD-10A)를 사용하여 245 nm에서 측정하였으며, 이동상은 60% methanol을 사용하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 구기자열매 추출물이 효소활성에 미치는 영향

구기자열매는 동물실험을 통하여 간 손상 보호 작용이 있으며 [25], 구기자열매 함유 알코올을 동물에 음용시켰을 때 알코올에 의하여 생성된 유해산소와 acetaldehyde의 해독효소 활성이 증가함을 확인한 선행연구가 보고되었다 [17]. 또한 Lee 등은 본 연구와 다르게 25종 한약재에서 ADH 활성을 Choi 등 [26]과 Racker [27]의 방법을 변형하여 저해 정도를 측정하고, ALDH 활성을 Hwang 등 [28]과 Totmar 등 [29]의 방법을 변형하여 증가 정도를 확인한 결과 구기자열매가 뛰어난 ADH 활성 저해와 ALDH 활성 증가를 보였다고 보고하였다 [30].

본 연구에서 ADH 및 ALDH의 활성을 높이는 물질의 분리를 위해 구기자열매의 추출은 유기용매인 methanol, ethanol, ethyl acetate와 열수를 이용하여 수행하였다. 구기자열매의 유기용매 추출물과 열수 추출물은 5 mg/mL 농도로 조정하여 ADH 및 ALDH 활성을 측정하였다. 각 추출물을 첨가하여

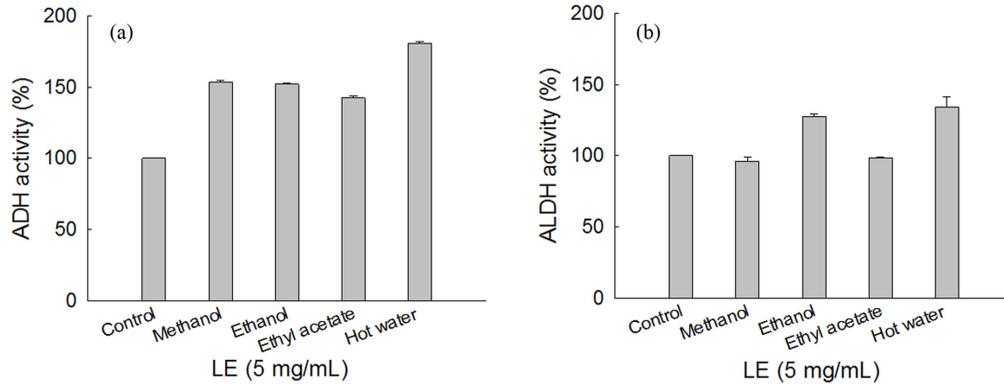


Fig. 1. Effect of solvent for extraction of LE on ADH (a) and ALDH (b) activities. Each extract (5 mg/mL) from LE was used for ADH and ALDH activities. The percentage of ADH and ALDH activities was defined relative to the activity of standard enzyme (control). LE: *Lycii fructus* extract.

효소활성을 측정을 한 결과, Fig. 1(a)에서 보는 바와 같이 ADH 활성은 구기자열매 추출물을 첨가하지 않은 대조구인 control을 100%로 하였을 때 methanol 추출물은 153.6%, ethanol 추출물은 152%, ethyl acetate 추출물은 142.3%, 열수 추출물이 180.7%로 활성 증가가 확인되었다. 각 추출물의 ALDH 활성은 Fig. 1(b)에서 보는 바와 같이 구기자열매 추출물을 첨가하지 않은 대조구인 control을 100%로 하였을 때 methanol 추출물은 96.1%, ethanol 추출물은 127.3%, ethyl acetate 추출물은 98.3%, 열수 추출물은 134.3%로 활성 증가가 확인되었다. 구기자열매는 열수 추출을 하였을 때 ADH 및 ALDH 활성 증가가 가장 높게 확인되어 발효 전후 구기자열매 추출물의 비교와 ADH 및 ALDH의 활성을 증대시키는 활성인자 분리를 위해 열수 추출 방법을 이용하여 수행하였다.

3.2. 발효 구기자열매 추출물이 효소활성에 미치는 영향

3.2.1. 단일배양을 통한 효소활성 측정

약용 식물의 발효를 통한 숙취해소효과는 보고된 바가 많지 않으나, *Monascus* 속을 백미에 발효시켜서 얻어진 홍곡이 알코올 대사를 촉진시켜 알코올의 체외 배설을 촉진시킨다는 보고가 있다 [31]. ADH 및 ALDH 활성을 증대시키기 위한 일환으로 구기자열매 추출물은 *Bacillus* 속 균주, *Saccharomyces* 속 균주 및 *Schizosaccharomyces* 속 균주를 이용하여 발효를 수행하였다. 단일배양은 각 균주를 이용하여 구기자열매 추출물을 발효시킨 후 효소 반응액에 첨가하여 ADH 및 ALDH의 활성 변화를 확인하고, 복합배양을 위한 균주를 선정하기 위해 수행하였다. Fig. 2(a)와 (b)에서 보는 바와 같이 균주 배양에 사용한 배지와 구기자 추출물이 첨가되지 않은 발효균주의 배양액은 배양일수에 따라서 모두 ADH 및 ALDH 활성의 증가에 영향을 주지 않았다. 구기자열매 추출물은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 열수 추출을 통해 농축 후 ADH 활성을 측정하였을 때 약 180%로 확인되었으나, 발효를 위해 배지와 혼합된 구기자열매 추출물은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 ADH 활성을 측정하였을 때 약 150%로 감소하는 것으로 확인되었

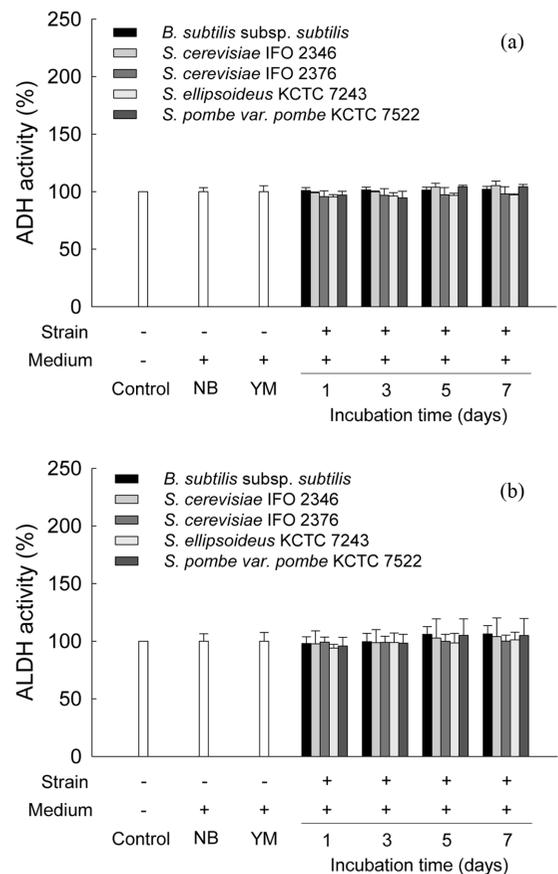


Fig. 2. Effect of medium and culture broth on ADH (a) and ALDH (b) activities. The percentage of ADH and ALDH activities was defined relative to the activity of standard enzyme (control).

다. 이러한 결과는 구기자열매 추출물과 배지를 혼합 후 다른 균주의 오염을 방지하기 위한 멸균과정에서 ADH 활성을 증가시키는 물질의 일부 변화에 의해 감소한 것으로 사료된다.

B. subtilis subsp. *subtilis*로 발효한 구기자열매 추출물에 대한 ADH 활성은 Fig. 3(a)에서 보는 바와 같이 구기자 추출물과 발효균주가 포함되지 않은 control을 100%로 하였을 때 활성 증가가 배양일수에 따라 증가하여 발효 5일째 176.1%, 7일째 188.6%로 확인되었으며, 발효 전 구기자열매 추출물의 ADH 활성 증가는 150%로 확인되어 *B. subtilis* subsp. *subtilis*로 구기자열매 추출물을 발효하였을 때 ADH 활성이 증가하는 것으로 나타났다. *Saccharomyces* 속 균주 및 *Schizosaccharomyces* 속 균주로 7일간 발효 시 구기자열매 추출물에 대한 ADH 활성은 발효 전 구기자열매 추출물과 비교하여 활성이 증가하지 않았다. Fig. 3(b)에서 보는 바와 같이 ALDH 활성은 *B. subtilis* subsp. *subtilis*로 발효한 구기자열매 추출물의 경우 발효 전 구기자열매 추출물의 ALDH 활성과 비교하여 활성이 크게 증가하지 않았으며, *Saccharomyces* 속 균주 및 *Schizosaccharomyces* 속 균주로 7일간 발효한 구기자열매 추출물의 경우 시료 미첨가 대조군으로서 control을 100%로 하였을 때 *S. cerevisiae* IFO 2376으로 7일간 발효한 구기자열매 추출물의 ALDH 활성 증가가 약 158.8%로 확인되었다. 발효 전 구기자열매 추출물의 ALDH 활성 증가는 132.1%로 확인되어 *S. cerevisiae* IFO 2376로 구기자열매 추출물을 발효하였을 때 ALDH 활성이 증가하는 것으로 나타났다.

3.2.2. 복합배양을 통한 효소활성측정

복합배양은 단일배양 시 높은 ADH 활성 증가를 보였던 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 높은 ALDH 활성 증가를 보였던 *S. cerevisiae* IFO 2376을 복합배양하여 ADH와 ALDH 활성의 증가를 증대시키기 위해 수행하였다. Fig. 4(a)에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *S. cerevisiae* IFO 2376로 7일간 발효한 구기자열매 추출물에 대한 ADH 활성은 nutrient 배지를 이용하였을 때 160%, YM 배지를 이용하였을 때 178.2%로 확인되어, 복합배양을 통한 구기자열매 추출물의 발효는 시료 미첨가 대조군으로서 control을 100%로 하였을 때 ADH 활성 증가가 확인되었다. 발효 전 구기자열매 추출물에 대한 ADH 활성 증가는 150%로 확인되어 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *S. cerevisiae* IFO 2376로 발효하였을 때 ADH 활성이 증가하였으며, YM 배지에서 7일간 발효하였을 때 ADH 활성이 가장 높게 증가하였다. Fig. 4(b)에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *S. cerevisiae* IFO 2376로 7일간 발효한 구기자열매 추출물에 대한 ALDH 활성은 nutrient 배지를 이용하였을 때 감소하였으며, YM 배지를 이용하였을 때 155.8%로 확인되어, 시료 미첨가 대조군으로서 control을 100%와 비교하였을 때 활성 증가가 확인되었다. 발효 전 구기자열매 추출물에 대한 ALDH 활성 증가는 132.1%로 확인되어 YM 배지를 이용하여 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *S. cerevisiae* IFO 2376로 구기자열매 추출물을 7일간 발효하였을 때 ALDH 활성이 증가하는 것으로 나타났다.

3.2.3. 생육도 확인

발효 후 구기자열매 추출물에서 공시균주의 생육은 YM 배

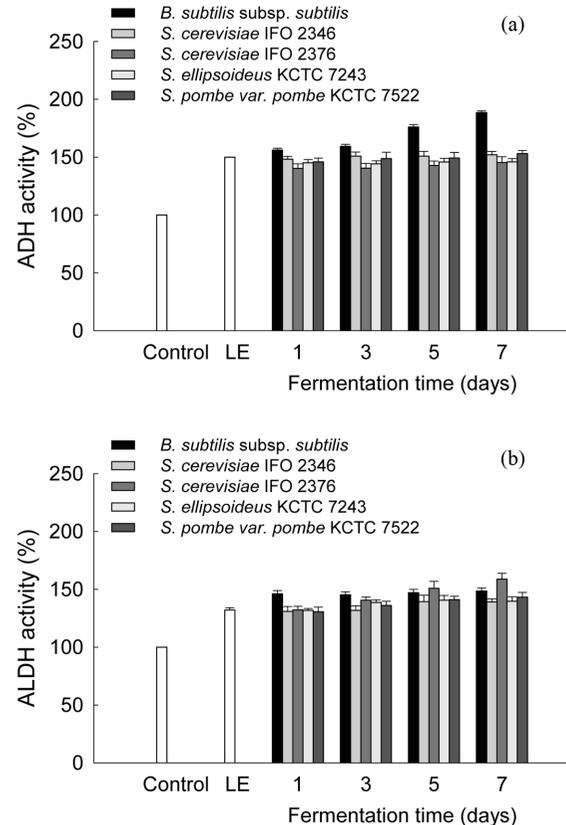


Fig. 3. ADH (a) and ALDH (b) activities of LE and FLE. *B. subtilis* subsp. *subtilis* was incubated in nutrient medium containing 5 mg/mL LE for 7 days. *Saccharomyces* sp. and *S. pombe* var. *pombe* were incubated in YM medium containing 5 mg/mL LE for 7 days. The percentage of ADH and ALDH activities was defined relative to the activity of standard enzyme (control). FLE: fermented *Lycii fructus* extract.

지에 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *S. cerevisiae* IFO 2376을 복합배양한 후 배양일수별로 sampling을 하여 생균수 측정을 통해 확인하였다. 그 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 접종한 두 균주가 생육하여 발효 7일째에도 지속적으로 증식이 유지되었다.

3.3. 발효 전후 구기자열매 추출물의 비교

3.3.1. TLC

TLC 분석은 구기자열매 추출물의 발효에 의한 물질의 변화를 검토하기 위해 발효 전후 구기자열매 추출물을 대상으로 수행하였다. Fig. 6(a)는 발효 전후 구기자열매 추출물을 5 mg/mL의 농도로 조정하여 5 μ L를 점적 후 TLC 분석을 한 결과이며, 각 spot은 R_f를 산출하여 회수 후 ADH 및 ALDH 활성 증가를 확인하였다. Fig. 6(b)에서 보는 바와 같이 발효 전 구기자열매 추출물의 ADH 활성은 시료 미첨가 대조군인 control을 100%로 하였을 때 R_f값이 0.68인 spot No. 4에서 118.6%로 가장 높게 확인되었으며, 발효 후 구기자열매 추출

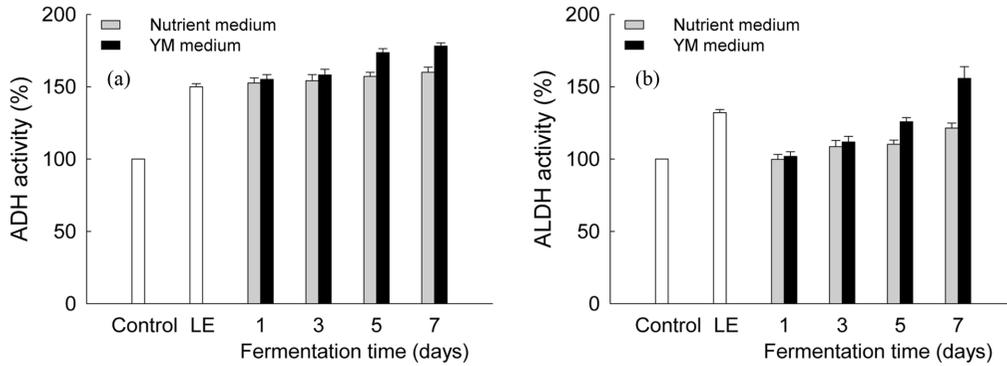


Fig. 4. ADH (a) and ALDH (b) activities of FLE by co-culture of *B. subtilis* subsp. *subtilis* and *S. cerevisiae* IFO 2376 in nutrient and YM medium containing 5 mg/mL LE for 7 days. The percentage of ADH and ALDH activities was defined relative to the activity of standard enzyme (control).

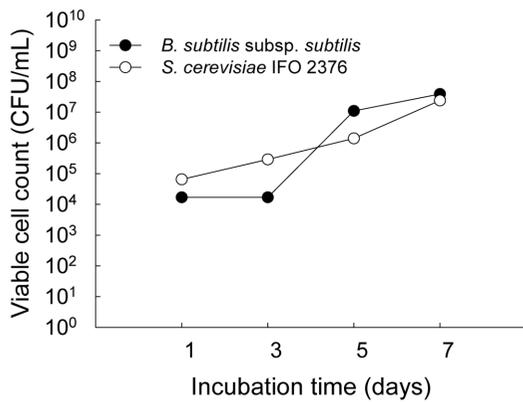


Fig. 5. Viable cell count of strains from FLE by co-culture of *B. subtilis* subsp. *subtilis* and *S. cerevisiae* IFO 2376 in YM medium for 7 days.

물의 ADH 활성은 R_f 값이 0.74인 spot No. F4에서 120.9%로 가장 높게 확인되었다. ALDH 활성은 Fig. 6(c)에서 보는 바와 같이 발효 전 구기자열매 추출물의 경우 R_f 값이 0.55인 spot No. 2에서 114.2%로 가장 높게 확인되었으며, 발효 후 구기자열매 추출물의 경우 R_f 값이 0.36인 spot No. F1에서 120.6%로 가장 높게 확인되었다. 이러한 결과를 토대로 발효 후 구기자열매 추출물에서 ADH 및 ALDH 활성을 증가시키는 물질은 발효 전보다 증가하였으며 각각 새롭게 검출된 R_f 값이 0.74인 spot No. F4와 R_f 값이 0.36인 spot No. F1으로 확인되어 발효에 따른 물질의 전환 가능성을 나타내었다.

3.3.2 Silica gel column chromatography

Silica gel column chromatography는 발효 전후 구기자열매 추출물로부터 ADH 및 ALDH 활성인자로 추정되는 물질을 분리하기 위해 수행하였으며, 발효 전후 구기자열매 추출물로부터 각각 135 분획을 분취하였다. 각 분획의 ADH 활성 증가

를 확인한 결과, Fig. 7(a)에서 보는 바와 같이 발효 전 구기자열매 추출물은 50번~100번 분획까지 ADH 활성 증가가 확인되었으며, 그 중 66번 분획의 ADH 활성 증가가 129.6%로 확인되어 가장 높았다. 발효 후 구기자열매 추출물은 50번~110번 분획까지 ADH 활성 증가가 확인되었으며, 그 중 68번 분획의 ADH 활성 증가가 148.9%로 확인되어 가장 높았다. ALDH 활성 증가는 Fig. 7(b)에서 보는 바와 같이 발효 전 구기자열매 추출물로부터 용출된 100번~133번 분획과 발효 후 구기자열매 추출물로부터 용출된 100번~134번 분획에서 확인되었다. 발효 전 구기자열매 추출물로부터 용출된 128번 분획이 134.1%로 확인되어 가장 높은 ALDH 활성 증가를 나타내었으며, 발효 후 구기자열매 추출물로부터 용출된 128번 분획이 148.1%로 확인되어 가장 높은 ALDH 활성 증가를 나타내었다.

3.3.3. HPLC

HPLC의 분석은 발효 전후 구기자열매 추출물의 silica gel column chromatography를 통해 분리한 ADH 및 ALDH 활성의 증가가 가장 높은 분획으로 수행하였다. HPLC의 분석 파장을 결정하기 위해 각 분획의 흡수 파장은 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 200~500 nm에서 확인하였다. 그 결과, Fig. 8에서 보는 바와 같이 발효 전후 구기자열매 추출물의 ADH 및 ALDH 활성의 증가가 가장 높은 분획은 모두 245 nm에서 최대흡수를 보였다. 따라서 발효 전후 구기자열매의 ADH 및 ALDH 활성 증가가 높은 분획은 각각 10 mg/mL의 농도로 조정하여 HPLC에 10 μ L를 주입 후 최대흡수 파장인 245 nm에서 분석하였다. 발효 전후 구기자열매 추출물의 ADH 활성 증가가 가장 높은 분획은 발효 전이 66번 분획, 발효 후가 68번 분획으로 확인되어 HPLC를 통해 분석하였다. 분석한 결과, Fig. 9(a)에서 보는 바와 같이 발효 전 구기자열매 추출물의 66번 분획은 R_t 13.452분에 하나의 peak가 확인되었으며, Fig. 9(b)에서 보는 바와 같이 발효 후 구기자열매 추출물의 68번 분획은 R_t 11.938분, R_t 13.014분, R_t 22.072분과

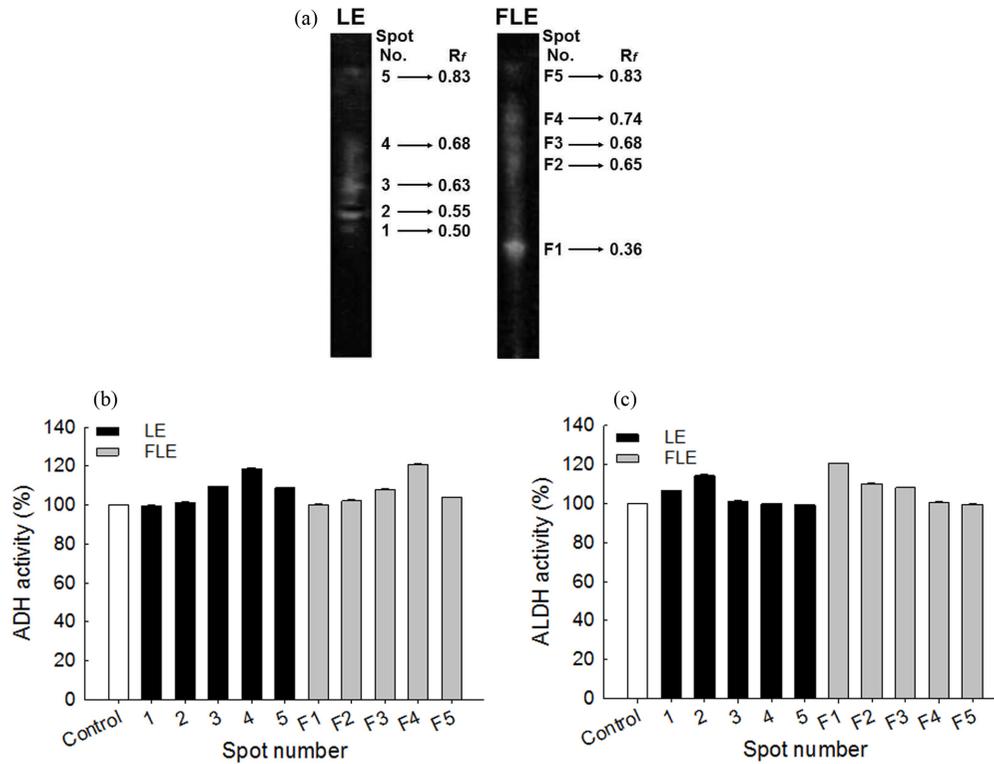


Fig. 6. ADH and ALDH activities of spots by TLC analysis of LE and FLE. TLC analysis (a) was performed on aluminium plates precoated with silica gel 60F₂₅₄ as the stationary phase using CH₂Cl₂ - C₂H₅OH - H₂O (3:5:2) as mobile phase. 5 μL of LE (5 mg/mL) and FLE (5 mg/mL) were spotted at the base line of TLC plate. The spots were visualized with ultraviolet lamp at 365 nm. Each spot was collected to measure ADH (b) and ALDH (c) activities. The percentage of ADH and ALDH activities was defined relative to the activity of standard enzyme (control).

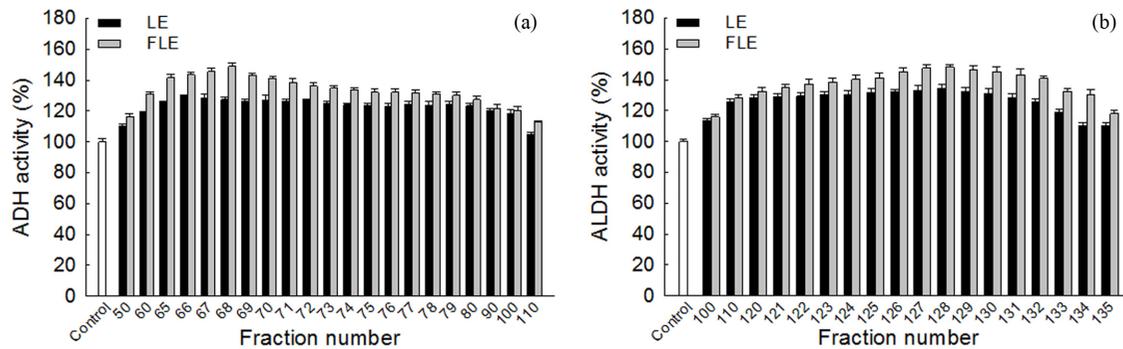


Fig. 7. ADH (a) and ALDH (b) activities of fractions by silica gel column chromatography of LE and FLE. Each fraction was concentrated to 10 mg/mL. ADH activity was high on fraction number 60~80. ALDH activity was high on fraction number 110~132.

R_f 28.842분에 peak가 확인되었다. Fig. 9(c)에서 보는 바와 같이 대조구인 control을 100%로 하였을 때 발효 전 R_f 13.452분 peak의 ADH 활성은 127%로 확인되었으며, 발효 후 구기자열매 추출물로부터 확인된 각 peak의 ADH 활성은 R_f 11.938분의 peak가 110.6%, R_f 13.014분의 peak가 134.1%, R_f 22.072분의 peak가 108.1%, R_f 28.842분의 peak가 101.3%로 확인되

었다. 발효 후 구기자열매 추출물의 68번 분획으로부터 확인된 R_f 13.014분 peak의 물질은 발효 전 구기자열매 추출물에서 분리한 ADH 활성인자 추정 물질과 동일한 물질로 사료되며, 새롭게 검출된 R_f 11.938분, R_f 22.072분과 R_f 28.842분 peak는 발효에 따른 생물전환으로 생성된 새로운 물질로 사료된다.

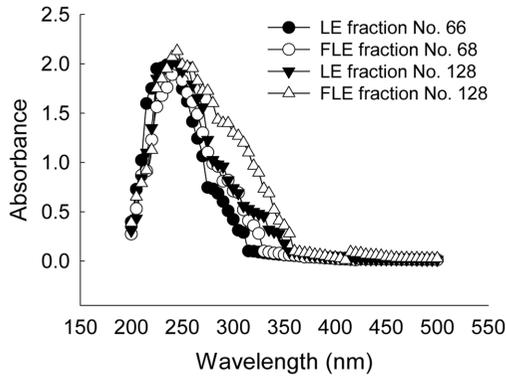


Fig. 8. UV-visible spectral analysis of ADH and ALDH activator fractions by silica gel column chromatography of LE and FLE.

발효 전후 구기자열매 추출물의 ALDH 활성 증가가 가장 높은 분획은 발효 전후 모두 128번 분획으로 확인되어 HPLC를 통해 분석하였다. 분석한 결과는 Fig. 10(a)와 (b)에서 보는 바와 같이 발효 전 구기자열매 추출물의 128번 분획으로부터 R_t 15.037분, 16.046분, 17.072분, 23.056분과 30.447분의 peak가 확인되었으며, 발효 후 구기자열매 추출물의 128번 분획으로부터 R_t 14.859분, 33.465분과 35.640분의 peak가 확인되었다. 각 peak의 ALDH 활성은 Fig. 10(c)에서 보는 바와 같이 대조구인 control을 100%로 하였을 때 발효 전 R_t 16.046분의 peak가 122.3%, 발효 후 R_t 35.640분의 peak가 130%로 ALDH 활성의 증가가 확인되어 발효 전후 구기자열매 추출물에서 분리한 ALDH 활성인자 추정물질은 다른 물질로 사료된다. 발효 구기자열매 추출물에서 분리한 ADH 및 ALDH 활성인자 추정물질은 NMR, MS 등의 분광학적 분석기법을 이용하여 추후 규명하여 새로운 물질 생성여부에 대한 연구를 수행하고자 한다.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 구기자열매 추출물의 발효를 통해 ADH 및 ALDH의 활성을 증대시키고, 각 효소의 활성을 증대시키는 기능을 가진 활성인자 (activator)로 추정되는 물질을 확인하고자 하였다. 구기자열매는 열수 추출을 하였을 때 ADH 및 ALDH 활성 증가가 가장 높게 확인되었다. 복합배양은 단일 배양 시 높은 ADH 활성 증가를 보였던 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 높은 ALDH 활성 증가를 보였던 *S. cerevisiae* IFO 2376을 이용하여 복합배양한 후 ADH와 ALDH 활성의 증가를 증대시키기 위해 수행하였다. 그 결과, 시료 미첨가 대조군으로서 control을 100%와 비교하였을 때 YM 배지에서 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *S. cerevisiae* IFO 2376을 7일간 발효한 구기자열매 추출물은 발효 전에 비해 ADH 활성이 약 28%, ALDH 활성이 약 23% 증가하였다. TLC 분석을 한 결과, ADH 활성은 발효 전후 구기자열매 추출물 모두 R_f값이 0.68인 spot에서

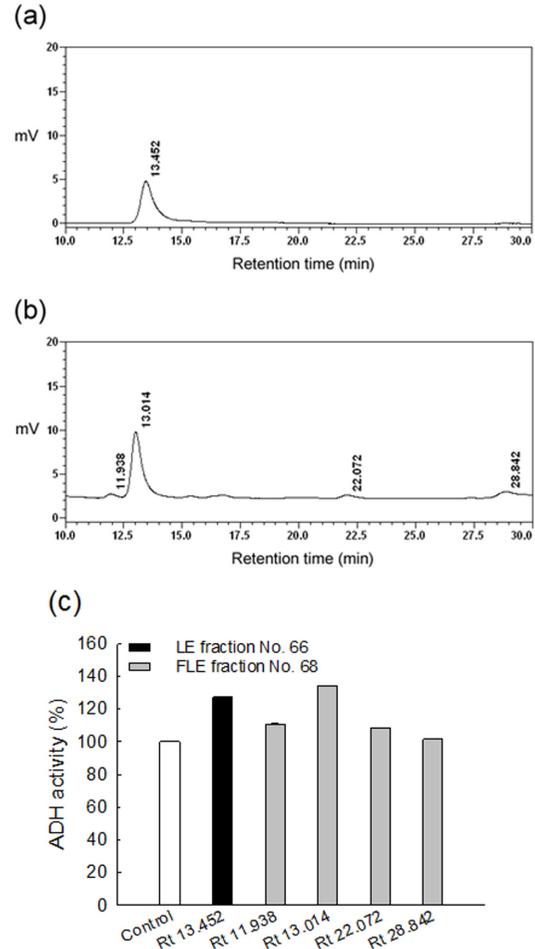


Fig. 9. ADH activity of isolated fraction according to retention time (R_t) by HPLC from fractions. HPLC analysis of fraction number 66 from LE (a) and fraction number 68 (b) from FLE was performed using a Hallsil C₁₈ 5 micron (150 × 4.6 mm) column. The mobile phase was consisted of methanol - water (6 : 4, v/v). The flow rate was set to 0.8 mL/min. The injection volume was 10 μL (10 mg/mL) and detection wavelength was set at 245 nm. Each fraction was used for ADH activity (c). The percentage of ADH activity was defined relative to the activity of standard enzyme (control).

각각 약 128%, 132.4%로 확인되었으며, ALDH 활성은 발효 전 구기자열매 추출물의 경우 R_f값이 0.55인 spot에서 120.2%, 발효 후 R_f값이 0.36인 spot에서 126.6%로 확인되었다. 발효 전후 구기자열매 추출물로부터 ADH 및 ALDH 활성인자로 추정되는 물질을 분리하기 위해 silica gel column chromatography를 수행한 결과, 발효 전 구기자열매 추출물로부터 용출된 분획의 ADH 활성은 66번이 약 133%로 가장 높았으며, ALDH 활성은 128번 분획이 약 130%로 가장 높게 확인되었다. 발효 후 구기자열매 추출물의 ADH 활성은 68번이 약 150%로 가장 높았으며, ALDH 활성은 128번 분획이 약 148%로 가장 높게 확인되었다. Silica gel column chromatography를 통해 분리한 분획 중 ADH 및 ALDH 활성의 증가가 가장

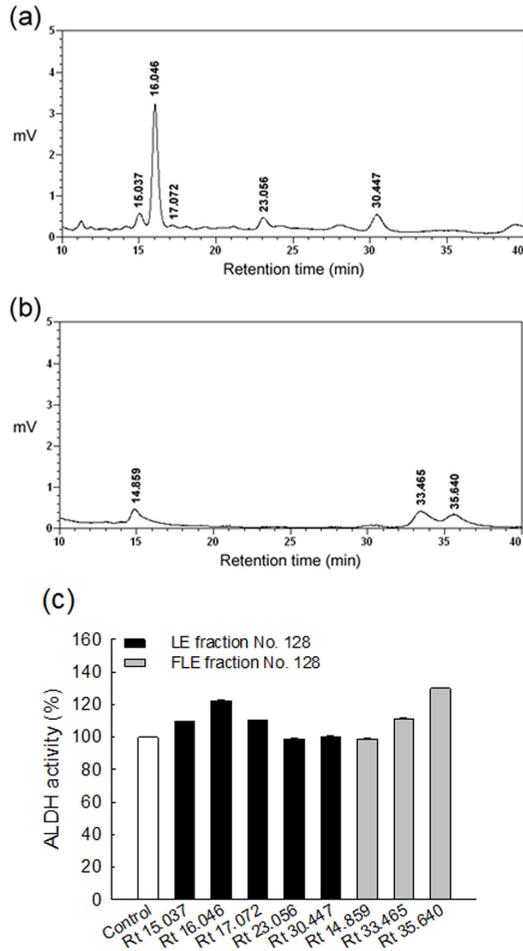


Fig. 10. ALDH activity of isolated fraction according to retention time (R_t) by HPLC from fractions. HPLC analysis of fraction number 128 from LE (a) and fraction number 128 from FLE (b) was performed using a HPLC column. The mobile phase was consisted of methanol - water (6 : 4, v/v). The flow rate was set to 0.8 mL/min. The injection volume was 10 μ L (10 mg/mL) and detection wavelength was set at 245 nm. Each fraction was used for ALDH activity (c). The percentage of ALDH activity was defined relative to the activity of standard enzyme (control).

높은 분획을 HPLC를 통해 분석한 결과, 발효 전 분획은 R_t 13.452분 peak만 검출되었으며, R_t 13.452분 peak의 ADH 활성은 127%로 확인되었다. 발효 후 분획은 발효 전 분획과 동일한 R_t 13.014분 peak가 검출되었으며, R_t 11.938분, R_t 22.072분과 R_t 28.842분 peak가 새롭게 검출되었다. 각 peak의 ADH 활성은 R_t 11.938분 peak가 110.6%, R_t 13.014분 peak가 134.1%, R_t 22.072분 peak가 108.1%, R_t 28.842분 peak가 101.3%로 확인되었다. 발효 전후 구기자열매 추출물의 ALDH 활성 증가가 가장 높은 분획을 분석한 결과, 발효 전 분획은 R_t 16.307분의 peak에서 ALDH 활성 증가가 확인되었으며, 발효 후 분획은 R_t 36.640분의 peak에서 ALDH 활성의 증가가 확인되었다. *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *S. cerevisiae* IFO 2376을 이용하여

구기자열매 추출물의 발효하였을 때 ADH 및 ALDH 활성을 증대시키는 기능을 가진 활성인자 (activator)로 추정되는 물질의 생산이 추정되었다.

REFERENCES

1. Ministry of health and welfare, and centers for disease control and prevention (2014) Korea health statistics 2013: Korea national health and nutrition examination survey (KNHANES VI-1). *Ministry of health and welfare*. pp. 24-25.
2. Tsukamoto, S., T. Muto, T. Nagoya, M. Shimamura, M. Satio, and H. Tainaka (1989) Determination of ethanol, acetaldehyde and acetate in blood and urine during alcohol oxidation in man. *Alcohol Alcoholism* 24: 101-108.
3. Lieber, C. S. (1994) Alcohol and the liver: update. *Gastroenterology* 106: 1085-1090.
4. Bode, C., V. Kugler, and J. C. Bode (1987) Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J. Hepatol.* 4: 8-14.
5. Setshedi, M., J. R. Wands, and S. M. Monte (2010) Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 3: 178-185.
6. Moore, P. A. and W. H. Patrick (1987) Effect of zinc deficiency on alcohol dehydrogenase activity and nutrient uptake in rice. *Agron. J.* 80: 882-885.
7. Cha, J. Y., H. J. Jung, J. J. Jeong, H. J. Yang, Y. T. Kim, and Y. S. Lee (2009) Effects of amino acids on the activities of alcohol metabolizing enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH). *J. Life Science* 19: 1321-1327.
8. Yin, M., K. Ikejima, G. E. Arteel, V. Seabra, B. U. Bradford, H. Kono, I. Rusyn, and R. G. Thurman (1998) Glycine accelerates recovery from alcohol-induced liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 1014-1019.
9. Lee, J. H., N. K. Kim, D. Y. Lee, and C. H. Lee (1999) Protective effect of selected amino acids and food extracts on ethanol toxicity deterrent in rat liver. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* 31: 802-808.
10. Kang, B. K., S. T. Jung, and S. J. Kim (2002) Effects of vegetable extracts by solvent separation on alcohol dehydrogenase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* 34: 244-248.
11. Park, Y. J., M. H. Kim, and S. J. Bae (1992) Enhancement of anti-carcinogenic effect by combination of *Lycii fructus* with vitamin C. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 143-148.
12. Na, Y. G. and K. H. Kim (1987) Effect of *Atractylis Rhizoma* and *Lycii fructus* on cell-mediated and humoral immune response in mice. *K. H. Univ. O. Med. J.* 10: 579-587.
13. Kang, K. I., J. Y. Jung, K. H. Koh, and C. H. Lee (2006) Hepatoprotective effects of *Lycium chinense* Mill fruit extracts and fresh fruit juice. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 38: 99-103.
14. Shon, Y. G., K. H. Cho, Y. S. Kim, H. S. Bae, and K. S. Lee (2007) Experimental studies of the effects of *Lycii fructus*, *Lycii cortex radialis* and *Lycii folium* on hypertension, hyperglycemia and hy-

- perlipidemia. *K. H. Univ. O. Med. J.* 16: 31-52.
15. Kim, K. S., S. H. Shim, G. H. Jeong, C. S. Cheong, K. H. Ko, J. H. Park, H. Huh, B. J. Lee, and B. K. Kim (1998) Anti-diabetic activity of constituents of Lycii Fructus. *J. Appl. Pharmacol.* 6: 378-382.
 16. Hwang, S. Y., J. T. Lee, Y. U. Kim, and H. J. Kim (2013) Skin whitening effects of extracts from angelicae *Gigantis radix* and *Lycii fructus* ethanol extracts. *Herb. Formula Sci.* 21: 91-98.
 17. Yoon, C. G., T. W. Jeon, M. J. Oh, G. H. Lee, and J. H. Jeon (2000) Effect of the ethanol extract of *Lycium chinense* on the oxygen free radical and alcohol metabolizing enzyme activities in rats. *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 157-273.
 18. Hubert, J., M. Berger, F. Paul, and J. Dayde (2008) Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chem.* 109: 709-721.
 19. Jung, T. J., D. O. Hang, B. H. Choi, C. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, and D. H. Hahm (2007) Effect of fermented herbal extracts, HP-1 on enzyme activities and gene expression related to alcohol metabolism in ethanol-loaded rats. *Kor. J. Oriental Physiol. Pathol.* 21: 387-391.
 20. Katina, K., K. H. Liukkonen, A. Kaukovirta-Norja, H. Adlercreutz, S. M. Heinonen, A. M. Lampi, J. M. Pihlava, and K. Poutanen (2007) Fermentation-induces change in the nutritional value of native or germinated rye. *J. Cereal Sci.* 46: 348-355.
 21. Choi, Y. K., J. U. Sul, S. K. Park, S. N. Yu, S. H. Kim, M. S. Rhee, S. C. Ahn, and M. S. Shin (2012) Research trends of fermented medicinal herb based on their clinical efficacy and safety assessment. *J. Life Sci.* 22: 1729-1739.
 22. Jeon, B. S., J. W. Park, B. K. Kim, H. K. Kim, T. S. Jung, J. R. Hahm, D. R. Kim, Y. S. Cho, and J. Y. Cha (2005) Fermented mushroom milk-supplemented dietary fibre prevents the onset of obesity and hypertriglyceridaemia in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Diabetes Obes. Metab.* 7: 709-715.
 23. Bergmeyer, H. U. (1974) Methods of enzyme analysis. Academic Press. New York. p. 28.
 24. Koivula, T. and M. Koivusalo (1975) Different form of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biophys. Acta.* 397: 9-23.
 25. Kim, B. W. and K. S. Roh (2000) Study on the activity of GOT and GPT in the hepatotoxic rat treated *Lycium chinese* mill. *Kor. J. Biomed. Lab. Sci.* 6: 187-192.
 26. Choi, J. T., H. K. Joo, and S. K. Lee (1995) The effect of Schizandrae Fructus extract on alcohol fermentation and enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Chem. Biotechnol.* 38: 278-282.
 27. Racker, E. (1995) Alcohol dehydrogenase from bakers yeast. *Meth. Enzymol.* 1: 500-506.
 28. Hwang, J. Y., J. W. Ham, and S. H. Nam (2004) Effect of Maesil (*Prunus mume*) juice on the alcohol metabolizing enzyme activities. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 36: 329-332.
 29. Tottmar, S. O., H. Petterson, and K. H. Kiessling (1973) The subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenase in rat liver. *J. Biochem.* 135: 577-581.
 30. Lee, K. S., G. H. Kim, B. J. Seong, H. H. Kim, M. Y. Kim, and M. R. Kim (2009) Effect of aqueous medicinal herb extracts and aqueous fermented extracts on alcohol-metabolizing enzyme activities. *Kor. J. Food Preserv.* 16: 259-265.
 31. Yu, T. S., H. J. Choi, and C. G. Yoon (2003) Effect of Monascus pigment extract on the alcohol metabolism in rats. *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 603-607.