

Paenibacillus kribbensis AM49로 발효시킨 택사의 항산화 활성 및 NO 생성 효과

유동진[#], 김창은[#], 유수정, 전문희, 김수현^{*}

구운식품 기업부설 연구소

Antioxidant activity and NO production of the *Alisma orientale* Juzep fermented by *Paenibacillus kribbensis* AM49

Dong-Jin Yoo[#], Chang-Eun Kim[#], Soo-Jung Yoo, Moon-Hee Jeon, Soo-Hyun Kim^{*}

Guwoon Food & Research Institute, Hoengseong-gun, 25246, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the antioxidant activities and nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 macrophages in extract of *Alisma orientale* Juzep (EAOJ) and fermented extract (FAOJ) by *Paenibacillus kribbensis* AM49 (*P. kribbensis* AM49).

Methods : The *Alisma orientale* Juzep was fermented with *P. kribbensis* AM49 at 37°C for 72 hours. We measured total polyphenol and total flavonoid, DPPH radical scavenging activity, FRAP activity and reducing power by spectrometric assay in EAOJ and FAOJ at concentrations at 0.5, 1, 5, 10 mg/mL. Positive control was used ascorbic acid. Furthermore, we examined effect of EAOJ and FAOJ on the cell viability and NO production in RAW 264.7 macrophages.

Results : The total polyphenol and total flavonoids content of FAOJ were increased 9.16 mg/g, 2.59 mg/g to 12.58 mg/g, 3.45 mg/g. DPPH radical scavenging activity, FRAP activity and reducing power were dose dependently increased according to the treatment concentration (0.5, 1, 5, 10 mg/mL) of EAOJ and FAOJ. In particular, DPPH radical scavenging activity, FRAP activity of FAOJ was significantly increased at 5, 10 mg/mL. Reducing power of FAOJ at 10 mg/mL was similar to ascorbic acid at 0.1 mg/mL. In addition, the cell viability and NO production in RAW 264.7 macrophages were significantly increased at the concentrations of 250, 500, 1000 µg/mL.

Conclusions : These results suggest that FAOJ by *P. kribbensis* AM49 has effects to antioxidant activity. In addition, the cell viability and NO production in RAW 264.7 macrophages were significantly increased.

Key words : Fermented *Alisma orientale* Juzep, *Paenibacillus kribbensis* AM49, Antioxidant activity, NO production

I. 서 론

발효란 미생물에 의해 유기물이 분해되는 과정을 말한다.

김치, 막걸리, 치즈, 포도주 등 식생활과 밀접한 관련 있는 가공 방법으로 발효식품이 가지는 독특한 풍미와 함께 식생활의 다양화로 그 수요는 날로 증가하는 추세이다. 발효는 식품에서

*Corresponding author : Soo-Hyun Kim, Guwoon Food & Research Institute, Hoengseong-gun, 25246, Republic of Korea.

· Tel : +82-33-345-9321 · E-mail : soo7735@naver.com

#First author : Dong-Jin Yoo, Guwoon Food & Research Institute, Hoengseong-gun, 25246, Republic of Korea.

· Tel : +82-33-345-9322 · E-mail : djyoo_1@naver.com

Chang-Eun Kim, Guwoon Food & Research Institute, Hoengseong-gun, 25246, Republic of Korea.

· Tel : +82-33-345-9322 · E-mail : pang0735@naver.com

· Received : 18 June 2021 · Revised : 08 July 2021 · Accepted : 25 July 2021

뿐만 아니라 치료의 목적으로 한약에도 사용되었다. 조선 초기에 처음 등장한 발효한약은 양조과정과 유사한 식품학, 미생물학 및 의학이 결합한 형태로, 질병치료에 있어 최대의 효과를 얻기 위한 당시의 여러 기술이 집약된 형태이다¹⁾. 한약의 발효 방법은 인위적으로 미생물을 접종하지 않고 약재가 가진 미생물에 의해 자연 발효되는 방법과 한약재를 미생물이 잘 이용할 수 있도록 찌거나 삶은 후 순수 분리된 미생물을 접종하여 고체 및 액체배양을 하는 방법이 있는데, 이는 발효 홍삼, 발효 한방 화장품과 같은 새로운 한약 제품의 제형을 개발 할 수 있다는 점이 주목받고 있다²⁾. 이러한 발효한약은 맛의 증진, 약리의 증진, 미생물에 의한 항산화 효소의 생산 및 한약재의 약리성분의 체내흡수율과 생체 이용률을 극대화시킨 가공방법으로 한약의 제형을 개선시킬 수 있는 장점을 가지고 있다³⁾. 발효에 이용되는 미생물로는 유산균이나 *Bacillus* sp. 및 버섯 균사체 등이 있으며, 특히 유산균의 경우 그 생육 특성상 생성되는 유기산인 lactic acid로 인해 발효균 외의 유해균의 증식을 억제하는 효과가 있어 발효 공정 개발에 빈번히 활용되고 있다⁴⁾.

Paenibacillus sp.는 1993년 *Bacillus* sp.에서 별도의 속으로 처음 재분류된 미생물로 내생포자를 형성하는 그람양성 세균이다. 토양, 김치, 우유 및 한약재 찌꺼기 등 다양한 환경에서 분리되어 보고되고 있으며 곰팡이, 식물성 병원균 및 *Clostridium botulinum*과 같은 혐기성 병원균에 영향을 미치는 항균물질, 세포 외 다당체 (EPS)같은 유용 물질을 생산한다고 알려져 있다. 또한 프로바이오틱스로서의 개발 가능성을 확인하고자 *Paenibacillus* sp.를 대상으로 연구가 진행된 바 있으며, 그 가능성이 매우 높은 균주임이 확인되었다^{5,6)}.

한방에서 택사는 *Alisma plangtago-aquatica* var. *orientale* Samuels (*Alisma orientale* Juzep)인 질경이택사를 주로 사용한다고 알려져 있다⁷⁾. 성질은 차며 맛이 달고 짜며 독성이 없으며, 방광에 몰린 오줌을 잘 나가게 하며 방광의 열을 없애는 것으로 수재되어 있다⁸⁾. 약리활성 성분으로는 alisol A와 B, alisol monoacetate 및 정유 epialisol A 등을 함유하고 있으며 이노자용⁹⁾, 간 보호작용¹⁰⁾, 고지혈증개선¹¹⁾, 항알러지 작용¹²⁾ 등의 효능이 보고되어 있다.

본 연구에서는 숙취해소 효과를 보이는 시제품 제작을 위해 지구목 및 지구자에 정제수를 가하여 제조한 추출물에서 *P. kribbensis* AM49를 분리하였으며, *P. kribbensis* AM49를 오미자, 겨우살이 및 여러 종류의 한약재추출물에 액체 배양하여 적당한 조건의 발효 대상이 되는 한약재를 조사하던 중 택사추출물에서 발효가 가능한 것을 확인하였다.

따라서 발효기간 동안 택사추출물에 미치는 영향을 파악하고자 택사추출물과 *P. kribbensis* AM49를 이용하여 발효시킨 택사추출물을 대상으로 항산화 활성 등을 평가하여 비교하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 택사는 2020년 12월 강원도 원주시 영진

약업사로부터 공급받았으며, 물에 수세하여 먼지 및 이물질을 제거한 후 건조하여 사용하였다.

2. 사용 균주 및 배지

발효에 사용된 균주는 지구목 및 지구자를 함유한 추출물로부터 분리하였다. 추출물 용기의 바닥 부근에서 한 백금이를 취하여 BCP agar 배지에 선상도말하여 37°C 배양기에서 24 시간 배양한 후 노란색 집락을 형성하는 콜로니만을 재배양하였다. 정확한 균종 동정을 위해 BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit와 ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer를 사용하는 Solgent Co., Ltd. (Daejeon, Republic of Korea)에 의뢰하여 *P. kribbensis* AM49 균주임을 확인하였다. 생육 배지로는 TSA agar와 TSB broth를 사용하였다.

3. 추출물의 제조 및 발효

건조된 택사에 시료량의 10배인 정제수를 가하고 103°C에서 5시간 추출하였다. 그리고 곧바로 autoclave 121°C에서 15분간 고압멸균 한 후 실온에서 충분히 식힌 다음 *P. kribbensis* AM49가 함유되어 있는 TSB (5×10^7 CFU/ml) broth를 1% 농도로 처리하여 37°C에서 72시간 조건으로 액체배양 하였다. 배양액은 여과하여 고압멸균 한 후, 농축하였으며 동결건조기 (Clean Vac-8, Hanil, Incheon, Republic of Korea)로 건조하여 4°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

4. 총 폴리페놀 함량 측정

Folin-Denis¹³⁾법을 응용하여 측정하였다. 각 시료 0.2 ml를 취하여 증류수 1.8 ml, Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.4 ml를 가하여 혼합하고 3분 후 증류수 1.4 ml과 10% Na₂CO₃ 0.4 ml를 첨가하여 실온에서 1시간 방치하고 725 nm에서 흡광도 (X-MA3100PC, Human, Seoul, Korea)를 측정하였다. 표준물질은 카페인산 (Caffeic acid; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 0~100 µg/ml의 농도로 제조하여 시료와 같은 방법으로 분석하였으며 표준 검량곡선으로부터 시료의 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

5. 총 플라보노이드 함량 측정

Moreno 등¹⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료 0.5 ml에 10% aluminum nitrate 0.1 ml, 1 M potassium acetate 0.1 ml 및 ethanol 4.3 ml를 차례로 가하여 혼합하고, 실온에서 40분간 방치한 후 흡광도 415 nm로 측정하였다. 표준물질은 quercetin (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 0~100 µg/ml의 농도로 제조하여 시료와 같은 방법으로 분석하였으며 표준 검량곡선으로부터 시료의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

6. DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 Choi 등¹⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다. 용액 1.4 ml를 가하여 혼합한 후 실온에서 10분간 방치하고 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 시료 무첨가구에 대한 첨가구의 흡광도 비로 나타내었다.

7. Ferric-reducing antioxidant potential (FRAP) 활성 측정

FRAP 활성은 Benzie & Strain¹⁶⁾의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료 0.05 ml에 혼합물 1.5 ml를 가한 후 혼합하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 593 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

8. 환원력 측정

Oyaizu¹⁷⁾의 방법을 응용하여 측정하였다. 시료 0.5 ml에 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.6) 0.5 ml, 1% potassium ferricyanide 0.5 ml을 혼합한 후 50°C에서 20분간 반응하였다. 10% trichloroacetic acid 0.5 ml을 첨가하여 혼합한 후 2000 RPM에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액 1 ml에 0.1% ferric chloride 0.2 ml을 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 ascorbic acid를 사용하여 시료와의 항산화 활성을 비교하였다.

9. 세포배양

마우스 대식세포인 Raw 264.7 cell은 한국세포주은행 (Seoul, Republic of Korea)에서 분양받았으며, 10% FBS, penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (SANYO, MCO-18AC)에서 배양하며 사용하였다.

10. 세포생존율 측정

96 well plate에 RAW 264.7 cell을 1×10⁵ cells/well의 cell을 100 μl 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator (SANYO, MCO-18AC)에서 24시간 배양하였다. 각각의 시료를 제조하여 다양한 농도 (0, 15, 62.5, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μg/ml)를 함유한 세포배양액 100 μl를 첨가하여 세포를 24시간 배양한 후 MTT assay를 실시하여 살아있는 세포수를 측정하였다. MTT assay 방법은 미토콘드리아의 dehydrogenase가 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Amersco, Solon, OH, USA)를 환원시켜 푸른색 물질인 formazan을 만드는 원리에 기초한 것으로 본 시험에서는 formazan을 DMSO에 용해시킨 다음 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

11. Nitric Oxide (NO) assay

24 well plate에 RAW 264.7 cell을 1×10⁵ cells/well의

cell을 1 ml 씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator (SANYO, MCO-18AC)에서 24시간 배양하였다. 10 U/ml 농도의 IFN-γ (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 6시간 처리한 후 RAW 264.7 cell에 다양한 농도 (250, 500, 1000 μg/ml) 및 양성 대조군인 LPS (1 μg/ml)로 48시간 자극하였다. NO의 측정은 96 well plate에서 세포 배양액 100 μl와 Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 1% α-naphthylamide in H₂O) 100 μl를 혼합하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 microplate reader (EPOCH, Bio-Tek, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

12. 통계분석

본 실험에서 얻어진 모든 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 통계적 유의성은 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program을 이용하여 분석하였다. 각 항목별 실험결과들은 일원배치분산분석을 실시하여 유의성을 검증한 후 시료간의 유의성은 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test 실시하였다.

III. 결 과

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

택사추출물 (EAOJ) 및 발효택사추출물 (FAOJ)의 항산화 활성을 평가하기 위해 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. EAOJ에 함유된 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 9.16 mg/g, 2.59 mg/g이었으며, FAOJ의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 12.58 mg/g, 3.45 mg/g으로 나타났다 (Table 1).

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents of EAOJ and FAOJ

Con c. (mg/ml)	Total polyphenol (mg/g GAE) ¹⁾		Total flavonoid (mg/g QE) ²⁾	
	EAOJ ³⁾	FAOJ ⁴⁾	EAOJ ³⁾	FAOJ ⁴⁾
5	9.16 ± 0.13	12.58 ± 0.01	2.59 ± 0.14	3.45 ± 0.07

The results are values represent mean ± SD of three independent experiments.

¹⁾ Garlic acid equivalents.

²⁾ Quercetin equivalents.

³⁾ EAOJ : Extract of *Alisma orientale* Juzep.

⁴⁾ FAOJ : Fermented *Alisma orientale* Juzep.

2. DPPH radical 소거능 측정

EAOJ 및 FAOJ의 항산화 활성을 평가하기 위해 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. 0.5, 1, 5, 10 mg/ml의 농도로 EAOJ를 처리한 결과 각각 1.35%, 2.24%, 11.73%, 21.10%를 나타냈으며 FAOJ는 각각 1.98%, 4.18%, 22.26%, 37.46%를 나타냈다. 양성대조군인 ascorbic acid를 0.025, 0.050, 0.075,

0.1 mg/ml의 농도로 처리한 결과 각각 23.74%, 47.71%, 67.85%, 93.87%의 라디칼 소거능을 나타냈다. EAOJ, FAOJ 및 양성대조군인 ascorbic acid 모두 농도 의존적으로 증가하

였으며 유의성을 보이는 것은 5, 10 mg/ml의 FAOJ로 나타났다 (Figure 1).

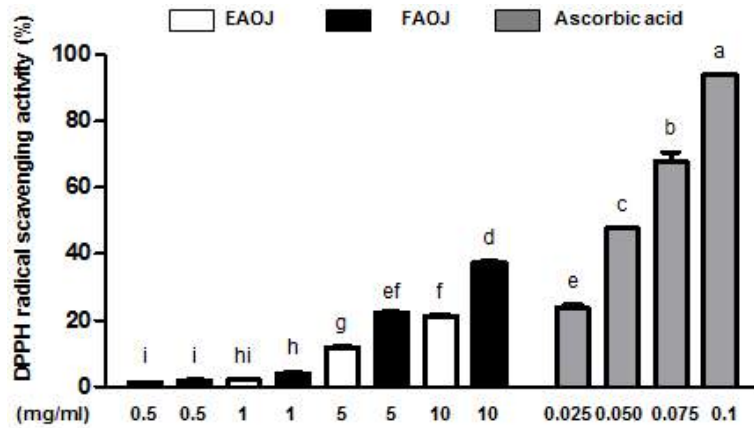


Figure 1. DPPH radical scavenging of EAOJ and FAOJ. The results are values represent mean \pm SD of three independent experiments. ^{a-i} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. EAOJ ; Extract of *Alisma orientale* Juzep. FAOJ ; Fermented *Alisma orientale* Juzep.

3. FRAP 활성 측정

EAOJ 및 FAOJ의 항산화 활성을 평가하기 위해 FRAP 활성을 측정하였다. 0.5, 1, 5, 10 mg/ml의 농도로 EAOJ를 처리한 결과 각각 0.059, 0.075, 0.264, 0.356의 흡광도를 나타냈으며 FAOJ는 각각 0.071, 0.102, 0.395, 0.597의 흡광도를

나타냈다. 양성대조군인 ascorbic acid는 0.025, 0.050, 0.075, 0.1 mg/ml의 농도로 처리한 결과 각각 0.230, 0.449, 0.667, 0.889의 흡광도를 나타냈다. EAOJ, FAOJ 및 양성대조군인 ascorbic acid 모두 농도 의존적으로 증가하였으며 유의성을 보이는 것은 5, 10 mg/ml의 FAOJ로 나타났다 (Figure 2).

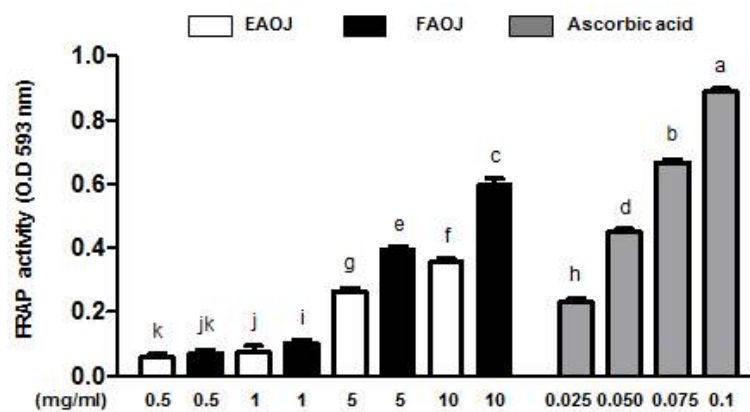


Figure 2. Ferric-reducing antioxidant potential of EAOJ and FAOJ. The results are values represent mean \pm SD of three independent experiments. ^{a-k} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. EAOJ ; Extract of *Alisma orientale* Juzep. FAOJ ; Fermented *Alisma orientale* Juzep.

4. 환원력 측정

EAOJ 및 FAOJ의 항산화 활성을 평가하기 위해 환원력을 측정하였다. 0.5, 1, 5, 10 mg/ml의 농도로 EAOJ를 처리한 결과 각각 0.057, 0.109, 0.404, 0.854의 흡광도를 나타냈으며 FAOJ는 각각 0.120, 0.218, 0.712, 1.743의 흡광도를 나타냈다. 양성대조군인 ascorbic acid는 0.025, 0.050,

0.075, 0.1 mg/ml의 농도로 처리한 결과 각각 0.449, 0.904, 1.341, 1.771의 흡광도를 나타냈다. EAOJ, FAOJ 및 양성대조군인 ascorbic acid 모두 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 10 mg/ml 농도에서 FAOJ가 0.1 mg/ml의 ascorbic acid와 유사한 것으로 나타났다 (Figure 3).

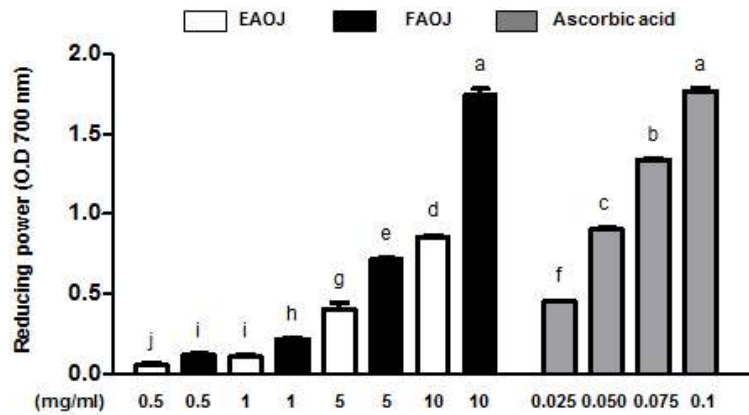


Figure 3. Reducing power of EAOJ and FAOJ. The results are values represent mean \pm SD of three independent experiments. ^{a-j} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test, EAOJ ; Extract of *Alisma orientale* Juzep, FAOJ ; Fermented *Alisma orientale* Juzep.

5. 세포생존율 측정

마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell에서 EAOJ 및 FAOJ의 세포생존율을 확인하였다. 15,625~1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 EAOJ 및 FAOJ 모두 농도에 따른 세포독성을 보이지 않았으며 250, 500,

1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 EAOJ는 각각 109%, 108%, 110%의 세포생존율을 나타냈으며 FAOJ는 각각 116%, 120%, 126%의 세포생존율을 나타냈다 (Figure 4).

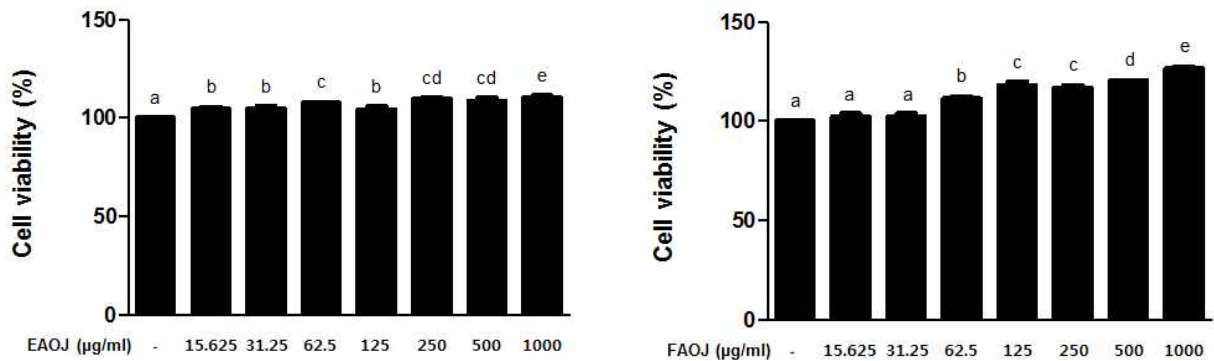


Figure 4. Effect of EAOJ and FAOJ on the cell viability in RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 macrophages were treated with different concentrations of EAOJ and FAOJ for 24 h, and their viability were determined using MTT assay. The results are values represent mean \pm SD of three independent experiments. ^{a-e} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test, EAOJ ; Extract of *Alisma orientale* Juzep, FAOJ ; Fermented *Alisma orientale* Juzep.

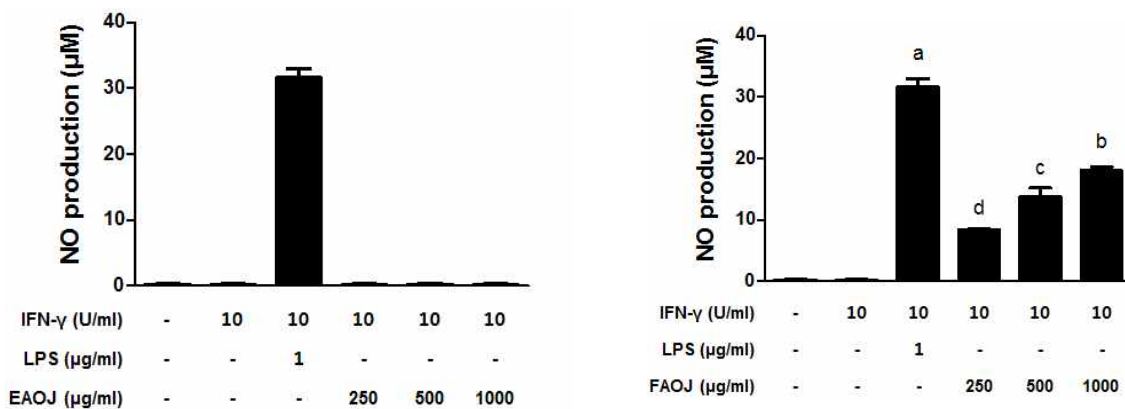


Figure 5. Effect of EAOJ and FAOJ on NO productions in RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 macrophages were treated with different concentrations of EAOJ and FAOJ for 48 h, and LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) was used as a positive control for NO productions. NO levels were determined with Griess reagent. The results are values represent mean \pm SD of three independent experiments. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test, EAOJ ; Extract of *Alisma orientale* Juzep, FAOJ ; Fermented *Alisma orientale* Juzep.

6. NO 생성 측정

마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell에서 EAOJ 및 FAOJ의 면역증진 효과 확인을 위해 NO의 생성을 측정하였다. 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 EAOJ 및 FAOJ를 처리한 결과 FAOJ는 농도 의존적으로 NO가 증가하였다. 반면 EAOJ는 NO 생성을 유발하지 않았다 (Figure 5).

IV. 고찰

텍사는 연못이나 물속에서 자라는 다년생 초목으로 일본, 사할린, 만주 및 몽고에서 야생하며 우리나라에서는 주로 전남 지역에서 재배 및 생산되고 있다¹⁸. 본초학에서 텍사는 질경이 텍사, *Alisma orientalis* (Sam.) Juzepczuk의 괴경으로 겨울에 마르기 시작할 때 채취하여 수염뿌리와 껍질을 제거하고 건조하여 사용하는 것으로 알려져 있으며, 2016년 기준으로 텍사 효능에 대한 항산화 실험은 6건이 보고되어 있다¹⁹.

일반적으로 발효는 기질인 유기화합물이 분해되고 분해 산물이 산화, 환원되어 ATP를 생성하는 반응이다²⁰. 발효가 일어나기 위해서는 발효가 가능한 미생물, 적당한 온도와 습도, 배지를 필요로 하며¹, 건조 한약재를 발효시키기 위해 시도되는 고체발효는 액체발효와 달리 수분과 영양배지를 필요로 하는 다양한 조건이 갖추어져야 한다²¹. 발효한약의 기능성에 대한 연구는 Park 등²²에 의한 유산균으로 발효한 씬바귀 추출물의 알레르기의 억제 효과, Oh 등²³에 의한 25°C에서 72시간 발효한 황련해독탕가비방의 여드름 중증도의 치료효과, Shon²⁴에 의한 버섯균사체로 발효한 복령과 후박의 항산화 및 인체의 간암세포에서 항암활성의 효과가 보고된 바 있다. 이러한 발효한약의 장점으로는 첫째, 일반 한약에 비하여 맛이 좋다. 둘째, 약효가 빠르고 뛰어나며 소화도 용이하고 유효성분의 흡수율이 훨씬 높다. 셋째, 발효에 의해서 많은 효소가 생산된다. 넷째, 저온 농축으로 효과를 증강시킨다. 다섯째, 미생물 발효와 2차에 걸친 정밀여과 과정을 통해 농약과 중금속으로부터 안전하고, 항균성과 항균중성이 강한 한약재나 독성을 지닌 한약재도 액체나 고체를 가리지 않고 발효가 가능하므로 독성을 제어하는데 도움이 된다²⁵.

페놀은 hydroxyl기를 갖는 방향족 화합물로 식물의 2차대사 산물이며 단백질 및 기타 분자들과 쉽게 결합하며 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다고 알려져 있다^{26,27}. 플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 성분으로 과일과 야채를 비롯하여 와인, 차, 맥주와 같은 음료와 씨앗, 땅콩, 곡류, 향신료 및 약용 식물에서 발견된다. 또한 플라보노이드는 anthocyanidins, flavonols, flavones, catechins, 및 flavanones으로 구성되며 항염증 및 항알레르기 효과를 포함한 광범위한 약리효과를 가지고 있다고 알려져 있다²⁸⁻³⁰. EAOJ에 함유된 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 9.16 mg/g, 2.59 mg/g이었으며 FAOJ의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 12.58 mg/g, 3.45 mg/g으로 나타났다. 이는 폴리페놀이 플라보노이드를 포함하는 큰 범주이기 때문에 나타나는 결과라고 사료된다.

DPPH radical 소거능은 천연물의 수용성 혹은 유기용매 추출물의 항산화 활성 측정법으로 항산화 활성을 측정하는 대

표적인 물질이다. 짙은 자색을 띠는 DPPH radical이 항산화 물질에 의해 전자를 공여 받아 환원되면 자색이 옅어져 노란색으로 탈색된다^{31,32}. 본 연구에서는 EAOJ 및 FAOJ를 농도 별로 처리하여 DPPH radical 소거능을 측정하였으며 5, 10 mg/ml에서 FAOJ는 EAOJ보다 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. Lee 등³³은 폐 질환 치료제 개발의 일환으로 텍사열 추출물을 이용하여 DPPH radical 소거능을 측정하였으며 4, 20, 100, 500 mg/ml 농도에서 각각 7.3%, 18.6%, 49.8%, 84%의 소거능을 보였으며 본 연구결과와 유사한 DPPH 전자공여능을 나타냈다. 또한 Choi 등³⁴은 마 또는 참마의 괴경을 건조하여 사용하는 산약의 열수추출물 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 1, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 mg/ml 농도에서 각각 8.1%, 45.8%, 43.4%, 43.1% 및 37.6%로 나타났으며 같은 부위를 사용하는 한약재와 비교하였을 때 텍사열수추출물은 비교적 낮은 소거 활성을 가지고 있다고 판단된다.

FRAP assay는 총 항산화능을 측정하는 방법으로 Fe^{3+} -TPTZ 복합체가 Fe^{2+} -TPTZ로 환원되는 원리를 이용한 것으로, 높은 환원력을 가지는 물질은 흡광도의 수치가 높게 나타난다고 알려져 있다^{35,36}. FRAP assay에 의한 EAOJ 및 FAOJ의 항산화 활성을 측정된 결과, 두 추출물 모두 농도 의존적으로 흡광도가 증가하였다. 또한 5, 10 mg/ml에서 FAOJ는 EAOJ보다 유의적으로 증가한 것을 확인하였다.

환원력은 Fe^{3+} 혼합물이 수소를 공여하여 유리라디칼을 안정화하여 Fe^{2+} 로 환원하는 활성으로 흡광도의 수치가 증가할수록 시료의 환원력이 뛰어난 것을 나타낸다³⁷⁻³⁹. 환원력에 의한 EAOJ 및 FAOJ의 항산화 활성을 측정된 결과, 10 mg/ml에서 FAOJ는 EAOJ보다 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 특히 양성대조군인 0.1 mg/ml의 ascorbic acid와 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

본 연구에서 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell에 EAOJ 및 FAOJ를 15.625~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 37°C에서 24시간 배양한 후 세포의 증식을 MTT assay를 통해 확인하였다. EAOJ 및 FAOJ는 모든 농도에서 세포독성을 유발하지 않았으며 특히 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 FAOJ는 세포생존율이 현저히 증가하는 것을 확인하였다.

NO는 nitric oxide synthetase에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되는 과정에서 생성되며 신경전달, 면역 조절 등과 같은 생리적으로 중요한 역할을 담당하고 있다⁴⁰. 활성화된 대식세포에서 분비되는 NO는 면역신호전달자로서 면역세포를 활성화시켜 암세포에 대한 독성 및 외부 병원체로부터의 저항성을 증가시키는 생물학적 매개인자이다^{41,42}. 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell에서 EAOJ 및 FAOJ의 면역증진 효과 확인을 위해 NO의 생성을 확인하였으며 FAOJ는 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 농도 의존적으로 NO가 증가하는 것을 확인하였다. 반면 EAOJ는 NO의 생성을 유발하지 않았다. 따라서 FAOJ는 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell을 활성화하여 면역반응을 유도할 것으로 기대되지만 면역기능 관련 바이오마커에 대한 추가적인 측정이 필요하다.

따라서 *P. kribbensis* AM49를 이용하여 텍사추출물을 포함으로써 DPPH radical 소거능과 같은 항산화 활성의 증가, RAW 264.7 cell의 세포생존율 및 NO가 증진되었음을 확인하였다. 이는 오미자, 겨우살이 및 여러 종류의 한약재추출물

에서는 *P. kribbensis* AM49가 생존하지 못했던 점으로 보아 택사가 배지의 역할을 수행하였으며, 택사가 발효의 유기 화학적 조건을 충족시키는 한약재이며, 화학적 변형에서 발생하는 유기물에 의한 것으로 생각된다. 그러나 NO에 대한 면역기능 관련 바이오마커 및 발효에 따른 성분에 대한 추가적인 연구가 뒷받침 되어야 할 것이라고 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 지구목 및 지구자에서 분리한 미생물 *P. kribbensis* AM49를 이용하여 택사를 발효한 후 항산화 활성 및 RAW 264.7 cell에서의 변화를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. EAOJ에 함유된 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 9.16 mg/g, 2.59 mg/g이었으며 FAOJ의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 12.58 mg/g, 3.45 mg/g으로 나타났다.
2. EAOJ 및 FAOJ의 DPPH 및 FRAP의 활성은 농도 의존적으로 유의하게 증가하였고, 유의성을 보이는 것은 5, 10 mg/ml의 FAOJ로 나타났다.
3. EAOJ 및 FAOJ의 환원력은 농도 의존적으로 유의하게 증가하였고, FAOJ는 10 mg/ml 농도에서 0.1 mg/ml의 ascorbic acid와 유사한 활성을 보였다.
4. 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell에서 EAOJ 및 FAOJ는 모든 농도에서 세포독성을 유발하지 않았으며, 250 µg/ml 이상의 농도에서 FAOJ는 세포생존율이 증가하였다. 또한 FAOJ는 250, 500, 1000 µg/ml에서 농도 의존적으로 NO 생성이 증가하였다.

이상의 결과로 보아 택사는 *P. kribbensis* AM49에 의해 생리활성이 증가되는 것을 확인하였으며 *Paenibacillus*와 택사의 활용 가능성을 시사하는 것으로 사료된다. 또한 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

References

1. Pahng SH. A literature study on fermented korean medicinals used in dermatology. Korean J. Orient. Med, 2011 ; 17(3) : 53-60.
2. Kong BM, Min JW, Kim SY. Physico-chemical characteristics of white, fermented and red ginseng extracts. J. Ginseng Res. 2008 ; 32(3) : 238-243.
3. Jung YJ, Han DO, Park C, Lee HJ, Kim SH, Hahm DH. Effect of fermented herbal extracts, HP-1 on enzyme activities and gene expressions related to

alcohol metabolism in ethanol-loaded rats. Korean J. Orient Physiology & Pathology. 2007 ; 21(2) : 387-391.

4. Kang DH, Kim HS. Functionality analysis of korean medicine fermented by *Lactobacillus* strains. Korean J. Microbio. Biotechnol. 2011 ; 39(3) : 259-265.
5. Choi, HJ, Kim DW, Joo, WH. Characteristics of *Paenibacillus* sp. BCNU 5016 as a novel probiotic. J. Life Sci. 2014 ; 24(2) : 161-166.
6. Kim, YE. A study on *Paeniacillus* strains as probiotics. Changwon National University. Master's degree. 2011.
7. Park JC, Hur JM, Kim SE. Isolation and quantitative analysis of alisol B 23-acetate from the rhizome of *Alisma orientale*. Korean J. Food & Nutr. 2005 ; 34(2) : 243-246.
8. Koo BH. Dictionary donguibogam. Seoul : Korea Dictionary Research Publishino. 2001 : 1406.
9. Kim HG, Kim HM, Song BK, LEE EJ, Jung HT. Pharmacology of medicinal herbs. Seoul : Korea Medical Book Publishing Company. 2000 : 116.
10. Chang IM, Kim YS, Yun HS, Kim SO. Liver-protective activities of alisol compounds against *CCl4* intoxication. Kor. J. Pharmacog. 1982 ; 13(3) :112-115.
11. IMAI Y, MATSUMURA H, ARAMAKI Y. Hypocholesterolemic Effect of alisol a-24-mono-acetate and its related compounds in rats. Jap. J. Pharmac. 1970 ; 20(2) : 222-228.
12. Kubo M, Matsuda H, Tomohiro N, Yoshikawa M. Studies on Alismatis Rhizoma. I. Anti-allergic effects of methanol extract and six terpene components from Alismatis Rhizoma (dried Rhizome of *Alisma orientale*). Biol Pharm Bull. 1997 ; 20(5) : 511-516.
13. Folin O, Denis W. Colorimetric method for the determination of phenols(phenol derivatives) in urine. J. Biol. Chem. 1915 ; 22(2) : 305-308.
14. Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol. 2000 ; 71(1) : 109-114.
15. Choi JS, Lee JH, Park HJ, Kim HG, Young HS, Mun SI. Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus davidiana*. Kor. J. Pharmacog. 1993 ; 24(4) : 299-303.
16. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymology. 1999 ; 299 : 15-27.
17. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning

- reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 1986 ; 44(6) : 307–315.
18. Park HJ, Jeong PK, Lim JT, Kwon PS. The current status of cultivation of *Alisma plantago* L. in Seung-Ju, Korea. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 1993 ; 1(2) : 202–204.
 19. Jang IW, Jeong JK, Kim HS, Lee SI. The literature study of research trend of *Alismatis Rhizoma* and relationship between the Herbology and KCD. *Kor. J. Herbol.* 2016 ; 31(2) : 47–62.
 20. Choi YK, Sul JU, Park SK, Yu SN, Kim SH, Rhee MS, Ahn SC, Shin MS. Research trends of fermented medicinal herbs – Based on their clinical efficacy and safety assessment. *J. Life Sci.* 2012 ; 22(12) : 1729–1739.
 21. Cho BJ, Hong JY, Kim MJ, Song YO. Development of mouthwash products with solid fermented oriental medicinal herb. *Korean J. Food & Nutr.* 2014 ; 43(9) : 1380–1387.
 22. Park EK, Sung JH, Trinh HT, Bae EA, Yun HK, Hong SS, Kim DH. Lactic acid bacterial fermentation increases the antiallergic effects of *Ixeris dentate*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008 ; 18(2) : 308–313.
 23. Oh CS, Kim MS, Kim Il Kim HY, Park SI, Choi SI, Hong DS. Acne treatment cases with Hwangryeonhaedok-tang. *J. Korean Med. Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2009 ; 22(3) : 228–236.
 24. Son MY. Antioxidant and anticancer activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* fermented with mycelial mushrooms. *Food Indus Nutr.* 2007 ; 12(2) : 51–57.
 25. Lee DS, Kang MS, Kim YC, Im NK, Kim HS, Jeong GS. Functionality analysis of *Rhus javanica* fermented by *Lactobacillus* spp. *J. Life Sci.* 2013 ; 23(1) : 44–54.
 26. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.* 2004 ; 134(12) : 3479S–3485S.
 27. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J. Food Sci. Technol.* 2005 ; 37(2) : 233–240.
 28. Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 2012 ; 44(3) : 337–342.
 29. Lee ER, Kang GH, Kang YJ, Kim WY, Choi HY, Kim BW. Regulation of cellular signal transduction by flavonoids. *J. Cancer Prev.* 2007 ; 12(3) : 163–173.
 30. Hertog MG, Hollman PC, Van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 1993 ; 41(8) : 1242–1246.
 31. Choi MH, Shin HJ. Anti-oxidative and anti-melanogenesis effects of blueberry extract. *Asian J. Beauty Cosmetol.* 2015 ; 13(2) : 261–266.
 32. Choe M, Kim DJ, Lee HJ, You JK, Seo DJ, Lee JH. A study on the glucose-regulating enzymes and antioxidant activities of water extracts from medicinal herbs. *Korean J. Food & Nutr.* 2008 ; 37(5) : 542–547.
 33. Lee SN, Kim MG, Kim MH, Kim HJ, Jo HJ, Kim EH. Effects of *Alismatis Rhizoma* pharmacopuncture extracts on the elastase activity and DPPH and NO scavenging activities. *Korean J. Acupunct.* 2011 ; 28(1) : 15–22.
 34. Choi GY, Kim BW. Experimental study on the antioxidant and antimicrobial properties of *Dioscoreae Rhizoma*. *J. Int. Korean Med.* 2010 ; 31(2) : 290–297.
 35. Choi JI, Kim YJ, Kim JH, Song BS, Yoon YH, Byun MW. Antioxidant activities of the extract fractions from *Suaeda japonica*. *Korean J. Food & Nutr.* 2009 ; 38(2) : 131–135.
 36. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 1996 ; 239(1) : 70–76.
 37. Lee YJ, Yoon BR, Kim DB, Kim MD, Lee DW, Kim JK. Antioxidant activity of fermented wild grass extracts. *Korean J. Food & Nutr.* 2012 ; 25(2) : 407–412.
 38. Jeong CH, Shim KH. Chemical composition and antioxidative activities of *Platycodon grandiflorum* leaves and stems. *Korean J. Food & Nutr.* 2006 ; 35(5) : 511–515.
 39. Song WY, Chun SS, Choi JH. Antioxidant activities of selenium-treated *Spinacia oleracea* L. *J. Food Hyg. Saf.* 2018 ; 33(6) : 510–515.
 40. Yim CY. Nitric oxide and cancer. *Korean J. Med.* 2010 ; 78(4) : 430–436.
 41. Kim DS, Sung NY, Park SY, Kim G, Eom J, Yoo JG. Immunomodulating activity of *Sargassum horneri* extracts in RAW264.7 macrophages. *J. Nutr. Health.* 2018 ; 51(6) : 507–514.
 42. Lee SJ, Rim HK, Jung JY, An HJ, Shin JS, Cho CW. Immunostimulatory activity of polysaccharides from *Cheonggukjang*. *Food Chem. Toxicol.* 2013 ; 59 : 476–484.