

발효 보리, 쑥, 다시마, 대두의 항산화효과

유형재 · 이승훈 · 이동석¹ · 김한복*

호서대학교 자연과학부 생명과학전공, ¹인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과

활성산소는 많은 경우에 성인병, 염증, 암, 동맥경화 등과 관련되어 있다. 따라서 항산화물질의 섭취는 성인병 예방이나 치료에 도움이 될 수 있다. 보리, 쑥, 다시마, 대두는 자연식품으로 항산화물질을 포함하고 있다. 이들을 발효시켰을 때, 원재료에 비해 항산화도가 증가할 수 있는지 여부를 결정하였다. 항산화도를 결정하기 위해서는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용하였다. 보리, 쑥, 다시마, 대두를 *Bacillus licheniformis* B1으로 발효시켰을 때, ethanol 추출 발효산물의 항산화도는 원재료에 비해 각각, 2.6, 1.6, 2.7, 1.7 배로 증가하였다. 또한, 250~300 nm에 걸쳐 발효대두의 ethanol 추출성분의 peak 영역이 대두의 것에 비해 뚜렷하게 높았으며, 이는 이런 구성성분의 차이가 양 항산화도의 차이와 관련되어 있을 가능성을 제시해 준다. Paraquat는 *Escherichia coli* 내부에서 활성산소를 만들어 균의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다. Ethanol로 추출한 발효대두 성분은 paraquat에 의한 균의 억제를 회복시킬 수 있었다. 이는 발효대두 성분이 체내에서도 이용될 수 있는 가능성을 보여준다.

Key words □ antioxidant activity, barley, fermentation, sea tangle, soybean, wormwood

인체는 산소 대사과정에서 필연적으로 활성산소를 만들게 된다. 또한 현대인들에게는 과식, 지나친 음주, 흡연, 정신적인 스트레스 등으로 인하여 체내에서 더욱 많은 활성산소가 생성된다. 이는 염증, 암, 동맥경화, 노화 등의 성인병으로 연결될 수 있다 (17,18). 따라서 항산화물질을 충분히 섭취함으로써 이러한 성인병의 예방, 치료에 도움을 줄 수 있다.

각종 곡물, 채소, 과일, 해조, 약초류 등은 강한 자외선 등으로부터, 자신을 보호하기 위해 자신들의 껍질 등에 항산화물질을 풍부하게 포함하고 있다. 보리, 쑥, 다시마, 대두 등은 우리가 흔히 섭취하는, 부작용 없는 자연 건강식품으로도 알려져 있다 (1-4). 대두, 보리는 구미에서도 많이 연구를 하고 있으나, 쑥, 다시마에 관한 연구는 주로 한국, 일본 등에서 연구되고 있는 소재이다. 쑥, 다시마, 대두의 항산화효과에 대해서는 보고된 바 있다(2-4,16). 대부분의 식물들은 세포내부에 polyphenol류의 항산화제를 갖고 있어 활성산소에 의한 세포막의 파괴를 막아주고 있다.

본 연구에서는 보리, 다시마, 쑥, 대두 등을 *Bacillus licheniformis* B1이란 균주로 발효 시(5), 원재료보다 항산화효과가 보다 더 증가되는지 여부를 결정하였다.

알코올로 추출한 발효대두의 항산화도가 시험관수준(*in vitro*)에서 보고된 바 있으나(9,11,12), 생체 내에서(*in vivo*) 발효대두의 항산화효과에 대한 보고는 별반 없는 형편이다. 인체에 항산

화물질이 실제로 도움을 주기 위해서는, 기본적으로 항산화물질이 세포내로 흡수, 이동될 수 있어야한다. 앞으로 발효 보리, 쑥, 다시마, 대두 등의 혼합물을 이용한 각종 기능성 항염증, 항암식품 등을 개발할 수 있기를 기대한다.

재료 및 방법

발효균주

보리, 다시마, 쑥, 대두를 발효시키기 위하여, *Bacillus licheniformis* B1균주를 이용하였다(5).

발효분말의 제조

인진쑥은 한약방에 구입하였고, 쌀보리, 다시마, 대두는 식품매장에서 구입하였다. 보리, 다시마, 쑥을 물로 깨끗이 닦고 실온에서 건조, 분쇄한 후, 고압증기멸균하였다. 분말보리, 다시마, 쑥을 증류수에 넣어 1%가 되게끔 한 다음 *B. licheniformis* B1도 역시 1% 되게끔 접종하여 37°C에서 24 시간 배양하였다. 발효대두의 경우에는 청국장 제조방법을 이용하였다(5). 각각의 배양물을 진공동결 건조하여 발효 보리, 다시마, 쑥, 대두 분말을 제조하였다.

항산화물질의 추출

보리, 쑥, 다시마, 대두 원재료와 각각의 발효 분말을 100% ethanol에 1% 되도록 넣고, 26°C 수조에 20 시간 두었다. 15,000 ×g, 4°C에서 30 분간 원심분리하여 상층액을 얻어 항산화도 결정에 이용하였다(6).

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-540-5624, Fax: 041-548-6231
E-mail: hbkim@office.hoseo.ac.kr

항산화도 결정

항산화도는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma, St. Louis, USA) 방법을 이용했으며, 517 nm에서의 흡광도 감소를 측정하였다(6,8). Ethanol로 추출한 각 시료물질과 DPPH를 섞어 준 후, spectrophotometer (UVICON 930, Kontron Instruments, Denver, USA)의 time drive 기능을 이용하여 초기반응부터 30 분간 항산화도의 kinetics를 추적, 결정하였다.

흡수스펙트럼 결정

대두와 발효대두 분말을 각각 100% ethanol에 녹여 성분을 추출하고, spectrophotometer (UVICON 930)을 이용하여 200~500 nm에 걸쳐 OD값을 측정하였다.

발효 분말의 생체내 항산화효과 결정

E. coli DH5 α 를 LB 액체배지에서 15 시간 배양한 후, 이것을 1 μ g/ml vitamin B₁₂를 포함하는 GM배지(0.5% glucose, 0.02% MgSO₄, 0.2% citric acid, 1% K₂HPO₄, 0.35% NaNH₄HPO₄) (14)에 1% 되게끔 접종하고 다시 15 시간 배양했다. 여기에 접종 후 2 시간 후 paraquat (0.02 g/ml) (Sigma)을 배지 100 ml당 70 μ l 집어넣고, 균의 증식 억제 효과를 측정하였다. 발효대두 분말 0.05 g을 100% ethanol 1 ml에 녹이고 그 중 100 μ l와 1 ml을 각각 취하여, paraquat가 포함된 100 ml의 GM 액체배지에 넣었다. 균주의 OD를 600 nm에서 측정함으로써 발효대두 성분에 의한 균주 성장 회복효과를 결정하였다.

결과 및 고찰

발효분말의 항산화도

보리, 쑥, 다시마, 대두는 자연식품으로 그 자체가 우수한 식품이다. 발효를 하면 원재료에 없던 새로운 생리활성 물질이 생성되기도 하고 원재료 분해에 의한 생체 이용률 증대효과도 있다. 이들 식품이 발효에 의해서 항산화효과도 증대되는지 여부를 결정하였다.

원재료의 항산화도는 대두, 쑥, 보리, 다시마의 순으로 높았다(Fig. 1). 대두의 항산화도는 쑥, 보리, 다시마에 비해 2배 이상 높았다. 나머지 쑥, 보리, 다시마의 항산화도는 서로 비슷한 범주에 있었다. 대두의 항산화물질로는 chlorogenic acid, isochlorogenic acid, caffeic acid, syringic acid, vanillic acid, isoflavone, genistin, 대부분의 아미노산 등이 알려져 있다(15,16). 보리, 쑥, 다시마, 대두를 발효 시 원재료에 비해 항산화도가 각각 2.6, 1.6, 2.7, 1.7 배 증가하였다(Fig. 1,2). 항산화도는, 시료와 DPPH 용액을 섞고 초기반응이 시작된 지 30 분이 지난 시점에서의 값을 기준으로 하였다. 보리, 다시마를 발효시켰을 때 항산화도 증가율이 쑥과 대두를 발효시켰을 때 보다 훨씬 높았다. 발효에 사용한 *B. licheniformis* B1은 청국장 발효에 적합한 균주로 보고되었었다(5). 본 연구를 통해 상기균주는 보리, 쑥, 다시마 발효에도 효율적인 것으로 밝혀졌다.

발효산물에서도 발효대두의 항산화도가 가장 높았다(Fig. 1,2). 발효대두에는 당이 제거되어 있는 genistein, 갈변물질, 아미노산 등이 풍부하고 이 물질들도 항산화도에 기여할 것이다(5-7). 발효

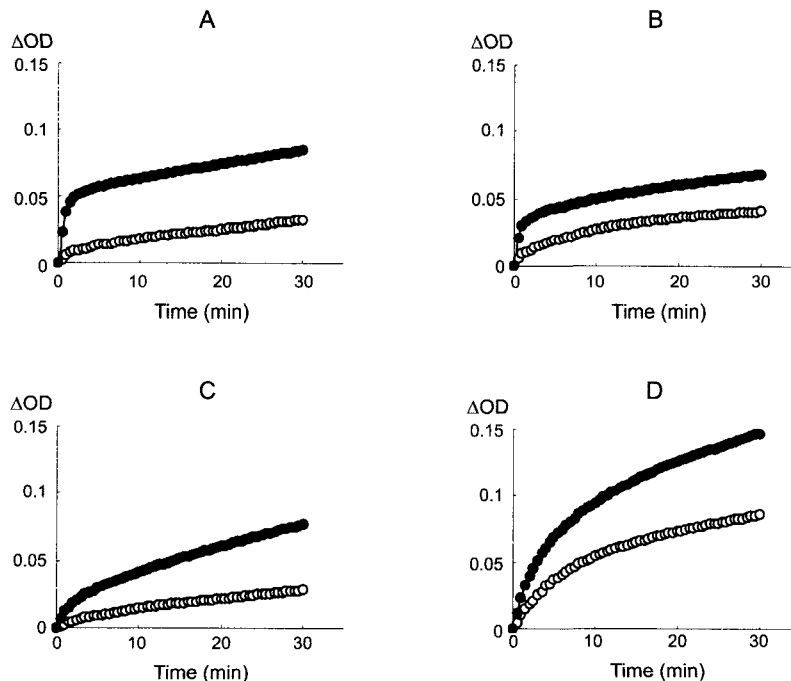


Fig. 1. Increase of antioxidant activity. Barley (A), wormwood (B), sea tangle (C), and soybean(D) (○), and their fermented products (●) were extracted with 100% ethanol. Extracted material was mixed with DPPH solution, and each antioxidant activity was determined by measuring decrease of OD values at 517 nm, using time drive function of spectrophotometer.

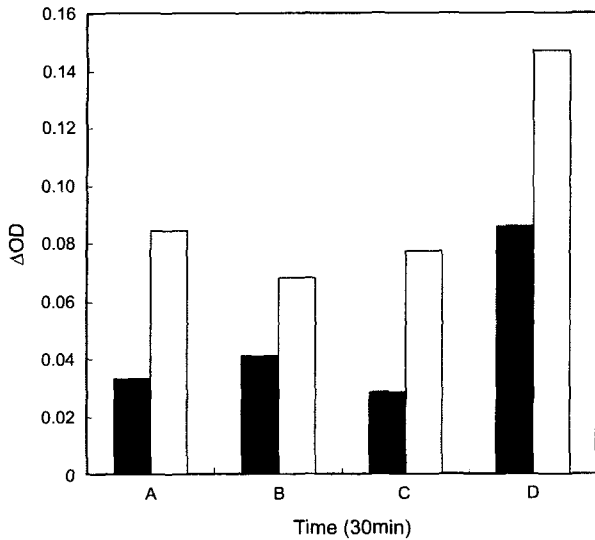


Fig. 2. Antioxidant activity comparison. Antioxidant activities of barley (A), wormwood (B), sea tangle (C), and soybean (D) (■) were compared with those of fermented barley (A), wormwood (B), sea tangle (C), and soybean (D) (□), respectively, at 30 min point.

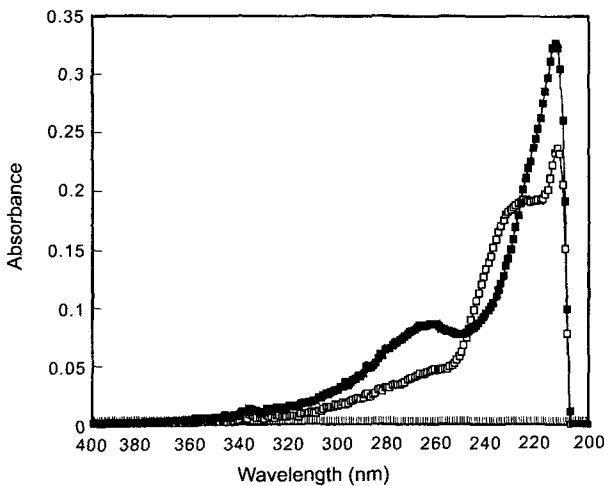


Fig. 3. UV-VIS spectra of extract from soybean and fermented soybean. Substances extracted with ethanol from soybean (□) and fermented soybean (■) were scanned by spectrophotometer at the range between 200 and 500 nm.

시키면 왜 항산화도가 증가하는지 보고된 것이 거의 없는 형편이다. Bacillus의 효소들에는 β-glucosidase, xylanase, pectinase, cellulase, protease등이 알려져 있다(5,13). 이들 효소에 의해 발효 대두에서는 대두에서 없었던 각종 생리활성 물질이 추가적으로 만들어질 수 있고, 이들 중에 항산화물질도 포함될 수 있으리라 사료된다.

대두와 발효대두의 흡수스펙트럼

대두와 발효대두의 흡수스펙트럼을 측정하여 양 구성 성분의 차이와 항산화도와와의 관련성 여부를 알아보았다. 250~300 nm에 걸쳐 발효대두의 ethanol 추출성분의 peak영역이 대두의 것에 비

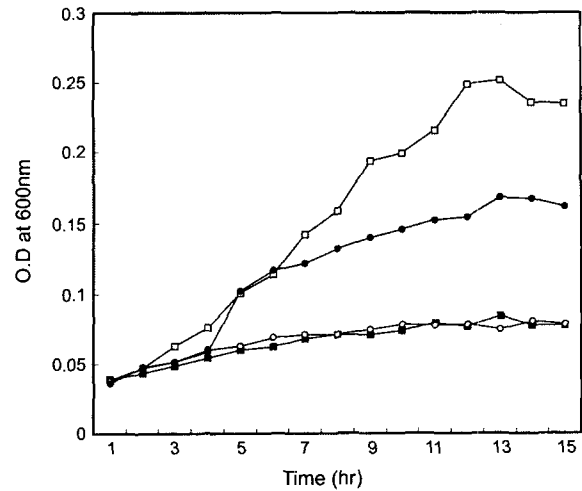


Fig. 4. Effect of fermented soybean extract on the growth of *E. coli* suppressed by paraquat. *E. coli* growth in GM media (□), in paraquat(■), in paraquat plus 100 μl fermented soybean (○) or 1 ml (●) was measured by determining OD values at 600 nm.

해 뚜렷하게 높았다(Fig. 3). 발효대두의 항산화도가 대두의 것에 비해 1.7 배 높은 것은(Fig. 2) 이 영역에 존재하는 물질의 차이에서 기인할 가능성도 있다. 285 nm에서 phenol류의 흡수가 잘 일어나는 것으로 알려져 있다(2). 수용성 갈변물질도 이 영역에서 phenol류를 많이 포함하고 있다는 보고가 있었다(6). 대두가 발효되면서 단백질이 분해되어 phenol기를 포함하는 아미노산류가 증가할 가능성도 있으리라 사료된다. 발효대두의 항산화도가 대두의 것에 비해 훨씬 높은 이유를 규명하는 작업이 보다 깊이 있게 규명되어야 할 것이다.

발효대두 성분의 생체내 이용성

제초제로 널리 쓰이는 paraquat는 생명체에 매우 독성이 강하다(10). *E. coli*에서 대사된 paraquat는 산소분자와 반응하여 활성 산소(superoxide)를 만들게 된다. 보통의 배지에서는 paraquat를 처리해도 1 시간이 지나면 Mn-SOD (superoxide dismutase)가 합성되어 활성산소의 해독을 제거할 수 있다(14). GM 최소배지에서는 Mn-SOD가 유도되지 않아, paraquat를 처리한 배양액에서는 9 시간 이상 균주의 증식이 억제되게 된다(14). 이때 분말청국장 추출물을 넣어 억제된 균주 증식이 회복되었다면, 이는 분말청국장 추출물의 항산화효과에서 기인한다고 볼 수 있다.

Paraquat에 의한 균주증식 억제가 15 시간 지속되었다(Fig. 4). Paraquat를 처리하지 않았을 때는 GM의 최소배지에서 균주가 OD 0.25까지 성장했다. 발효대두 100 μl를 paraquat이 있는 배지에 넣었을 때는 균주 성장에 영향이 없었으나, 발효대두 1 ml를 paraquat이 있는 배지에 첨가했을 때는 균주 생장이 OD 0.17까지 뚜렷하게 회복되었다. 이는 균주 성장 회복이 발효대두 성분 농도 의존적임을 의미한다. Paraquat에 의해 균주 생장이 억제되었다가 발효대두 성분에 의해 생장이 회복된 것은, 발효대두 중의 항산화물질이 *E. coli*내부로 흡수되어 paraquat 독성제거에 영향을 미칠 가능성을 제시해 준다.

SOD는 활성산소 제거에 효과적이라고 알려져 있다(14). 그러나 이 효소는 거의 세포내로 흡수될 수 없다. 구리와 결합된 각종 아미노산, peptide는 세포내부로 이동하여 SOD와 유사한 작용을 하여 활성산소를 제거할 수 있다고 알려져 있다(14). 세포내로 흡수될 수 있는 분자량이 작은 항산화물질의 섭취가 인체에 실질적인 도움이 된다. 본 연구에서 *E. coli*에서 발효대두 성분 중의 항산화물질이 세포내로 이동될 수 있었기 때문에, 발효대두 성분을 복용 시, 인체에서도 항산화 효과를 발휘할 가능성이 높을 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 · 한국과학재단 지정 지역협력연구센터인 인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- 김관배, 강국희. 2002. 한국산 고단백질 맥주보리가 맥아 품질에 미치는 영향. 한국식품과학회지 34, 407-412.
- 김지영, 맹영선, 이기영. 1995. 다양한 용매를 이용한 대두추출물의 항산화효과. 한국식품과학회지 27, 635-639.
- 남상명, 김종근, 함승시, 김수진, 정명은, 정차권. 1999. 썩 추출물이 Benzo(a)pyrene을 투여한 흰쥐의 항산화계 효소에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 28, 199-204.
- 박재한, 강규찬, 백상봉, 이윤형, 이규순. 1991. 식용 해조류에서 항산화 물질의 분리. 한국식품과학회지 23, 256-261.
- 이재중, 이동석, 김한복. 1999. *Bacillus licheniformis* B1에 의한 청국장 및 간장발효. 미생물학회지 35, 296-301.
- 이재중, 조창훈, 김지연, 이동석, 김한복. 2001. 분말청국장에서 알코올로 추출한 물질의 항산화능. 미생물학회지 37, 177-181.
- 이정수, 최홍식. 1997. 콩 발효식품으로부터 분리한 페놀물질획분의 성분분석과 항산화 작용 특성. 한국식품영양과학회지 26, 383-389.
- Abe, N., T. Murata, K. Yamamoto, and A. Hirota. 1999. Bisorbibetenone, a novel oxidized sorbicillin dimer with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity from a fungus. *Tetrahedron Lett.* 40, 5203-5206.
- Chung, Y.C., C.T. Chang, W.W. Chao, C.F. Lin, and S.T. Chou. 2002. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2454-2458.
- Hassan, H.M. and I. Fridovich. 1979. Paraquat and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 254, 10846-10852.
- Iwai, K., N. Nakaya, Y. Kawasaki, and H. Matsue. 2002. Inhibitory effect of natto, a kind of fermented soybeans, on LDL oxydation *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3592-3596.
- Iwai, K., N. Nakaya, Y. Kawasaki, and H. Matsue. 2002. Antioxidative functions of natto, a kind of fermented soybeans: Effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3597-3601.
- Kim, J.Y., H.B. Kim, and D.S. Lee. 2002. Cloning and expression of the *Bacillus circulans* endo- β -1,3-1,4-glucanase gene (bglBC1) in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 24, 53-57.
- Nagano, T., T. Hirano, and M. Hirobe. 1989. Superoxide dismutase mimics based on iron *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 16, 9243-9249.
- Polkowski, K. and A.P. Mazurek. 2000. Biological properties of genistein. A review of *in vitro* and *in vivo* data. *Acta. Pol. Pharm.* 57, 135-155.
- Pratt, D.E. and P.M. Birac. 1979. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.* 44, 1720-1722.
- Rice-Evans, C.A. and A.T. Diplock. 1993. Current status of antioxidant therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 77-86.
- Schwarz, K.B. 1996. Oxidative stress during viral infection: A review. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 641-649.

(Received August 5, 2002/Accepted September 4, 2002)

ABSTRACT: Antioxidant Activity of Fermented Barley, Wormwood, Sea Tangle, and Soybean
 Hyung Jae Yoo, Seung Hun Lee, Dong Seok Lee¹, and Han Bok Kim* (Department of Life Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea, ¹Department of Medical Laboratory Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea)

Superoxide is involved in causing inflammation, cancer, and arteriosclerosis in many cases. Taking antioxidant material can be helpful in preventing the diseases. Natural food such as barley, wormwood, sea tangle, and soybean contain antioxidant ingredients. Antioxidant activity increase was determined by fermenting them with microorganism. To determine the activity, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) solution was used. When barley, wormwood, sea tangle, and soybean were fermented with *Bacillus licheniformis* B1, antioxidant activities of each fermented product increased 2.6, 1.6, 2.7, and 1.7 folds, respectively. Also, absorbance of fermented soybean was higher than that of soybean at the range of 250 ~ 290 nm, which might be involved in differences of antioxidant activity of the two. Paraquat suppressed *Escherichia coli* DH5 α growth by making superoxide inside the strain. However, when ethanol extract from fermented soybean was added into the GM (glucose-mineral) media containing the strain, its growth was recovered, suggesting that ethanol extract can move across *E. coli*, and can function as anti-oxidant material *in vivo*. Thus, it will be possible to develop antioxidant material from fermented soybean which can be taken orally.