

젖산균과 청국균으로 발효시킨 용안육의 항산화, 항암효과 및 일산화질소생성

손미예^{1,2} · 남상해^{2,3} · 이상원^{2,4*}

¹경상대학교 식품영양학과, ²한국전통발효식품연구소
진주산업대학교 ³식품과학과 및 ⁴미생물공학과

Antioxidant, Anticancer Activities and Nitric Oxide Production of *Euphoria longana* Fermented with Lactic Acid Bacteria and *Bacillus subtilis*

Mi-Yae Shon^{1,2} Sang-Hae Nam^{2,3} and Sang-Won Lee^{2,4*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Korea Fermented Food Research Institute, Jinju 660-984, Korea

³Dept. of Food Science, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

⁴Dept. of Microbiological Engineering, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

Abstract

Antioxidant, anticancer activities and nitric oxide (NO) production of Vietnamese and Thai *yonganyook* (*Euphoria longana*) fermented with lactic acid bacteria and *Bacillus subtilis* were investigated. Total organic acid contents (TAC) of Thai raw *yonganyook* (473.49 mg/g, 89.2% of TAC) were higher 3.2 times than those of Vietnamese raw *yonganyook* (148.48 mg/g, 86.8% of TAC) and major organic acids of two materials were formic acid and malic acid. Total free sugars contents of Vietnamese raw *yonganyook* (434.63 mg/g) were higher 1.2 times than those of Thai raw *yonganyook* (378.77 mg/g) and major free sugar of two materials were sucrose, glucose and fructose. NO production of RAW264.7 cell treated with methanol extract of Vietnamese fermented *yonganyook* was shown to be a lower level than that of Thai fermented *yonganyook*. Its production by fermented *yonganyook* was strongly exhibited in low dose (0.2 mg/mL) than in high dose (1.0 mg/mL) as compared with raw *yonganyook*. Electron-donating ability (EDA) of Vietnamese raw *yonganyook* (41.72±3.59%) at 600 µg/assay was higher 1.4 times than that of Thai *yonganyook* (30.20±4.80%). EDA of Vietnamese *yonganyook* fermented with *B. subtilis* at 600 µg/assay was 43.57±2.07%, which was the highest level of all samples tested. Anticancer activity of raw *yonganyook* on human HeLa cell was similar to between Vietnamese and Thai *yonganyook*. In inhibitory effect of HepG2 cell growth, methanol extract of Thai *yonganyook* (46.13±4.80%) was higher than that of Vietnamese *yonganyook* (33.07±0.92%). Inhibitory activity of fermented *yonganyook* on HeLa and HepG2 cell growth were 39.21±1.46% and 48.07±1.63%, when 200 µg/assay of methanol extract of Vietnamese and Thai *yonganyook* fermented with *B. subtilis* were used, respectively.

Key words : *Euphoria longana*, NO production, antioxidant, anticancer activity

서 론

용안육(Longan Arillus)은 중국, 대만, 베트남 등지에서 재배되는 용안나무(*Euphoria longana* Lamarck)의 가종피

를 말한다. 한방에서 귀비탕에 처방되는 생약재로서, 불면증, 신경쇠약 및 진정 효과가 있다고 알려져 있으며, 여러 개의 박편이 끈끈하게 붙어 있고, 반투명한 적갈색이나 흑갈색을 나타낸다. 물에 침지하면 육질이 옅은 황갈색을 나타내고, 단맛과 함께 특이한 냄새를 발생한다(1,2).

용안육의 연구로는 acetylgeraniin, corilagin, adenosine,

*Corresponding author. E-mail : swlee@jinju.ac.kr,
Phone : 82-55-751-3394, Fax : 82-55-751-3399

uridine, β -sitosterol, daucosterol, dihydrosterculic acid 등의 화학성분(3-10)에 대한 것이 많고, 생리활성에 관한 연구로는 적혈구응집억제효과(6), 항고혈압효과(7,8), 뇌의 GABA(γ -aminobutyric acid) 농도를 조절하는 산화효소인 GDH(glutamate dehydrogenase) 활성 촉진효과(10), 구속스트레스 생쥐뇌의 norepinephrine(11)과 serotonin(12) 함량에 미치는 영향에 관한 보고들이 있다.

또한 한약은 수치(processing, 修治)에 의한 그 부작용이나 독성 및 약성의 완화, 효능의 변화 등을 목적으로 물리학적 및 생물학적 활성 변화를 유도하는 연구가 이루어지고 있으며(13), 최근에는 생약재의 약효 및 흡수율 증진이나 기호성 등을 개선하기 위하여 젖산균이나 바실러스 및 버섯균사체 등의 고체 및 액체 배양법을 활용하여 제조되는 발효생약에 대한 연구로서 장내세균 중에서 분리한 *Bacillus* sp. P-92로 발효시킨 발효녹용이 대조균이나 처리하지 않은 실험군의 생쥐에 비하여 녹용의 효율을 높이고 새로운 약리효과를 기대할 수 있다는 보고(14)와 젖산균주를 이용한 인삼발효물 제조과정에서 *Lactobacillus plantarum* MG-208 젖산균이 생균수와 산도조성에 효과적이었다는 보고도 있다(15). 특히 인삼 및 홍삼 발효에 관한 연구가 다소 많은데, 압출성형 공정을 통한 백삼과 홍삼의 발효적성 증진과 그 발효액 특성을 비교하거나(16), 발효산삼 배양액의 부산물 급여가 비옥토의 품질특성에 미치는 영향에 관한 보고가 있으며(17), 그리고 발효홍삼의 항당뇨 및 산화스트레스 개선효과(18)에 관한 보고도 있다. 또한 오미자의 전통발효액을 조제하여 유효한 면역증진 활성을 보고하였으며(19), 맥문동을 이용한 감주와 그 식초를 이용한 발효음료 개발에 관한 보고(20)와 발효에 의한 율나무 수피의 휘발성 유기성분의 화학적 변화에 대한 보고가 있다(21).

본 연구에서는 전통 발효미생물을 이용한 각종 한약재의 발효생약재로 개발하고자 하는 기초연구의 일환으로 베트남산과 태국산의 용안육을 청국균 혹은 젖산균 혼합 배양시킨 발효 용안육의 유리당과 유기산 함량, 그 메탄올 추출물의 NO생성, 항산화능 및 항암활성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료, 공시균주 분리

용안육은 시판 중인 태국산과 베트남산을 한약재료 판매점에서 구입하여 사용하였다. 용안육의 발효를 위한 발효균주로는 진주산업대학교 미생물공학과 생물공학연구실에서 전통된장으로부터 순수분리하여 농촌진흥청 농업미생물자원센터에 기탁한 *Bacillus subtilis* KACC-9122P와 한국종균협회로부터 분양받은 *Lactobacillus bulgaricus* KCTC-3635, *L. acidophilus* KCTC-3168 및 일본식품총합연구소 효소학연구실로부터 분양받은 *L. reuteri* KFRI-661을

사용하였다. 그리고 *B. subtilis* KACC-9122P의 배지는 soluble starch 1%, yeast extract 0.5%, peptone 0.5%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05%로 구성된 SY 배지, 젖산균의 배지는 MRS(Difco) 배지를 사용하였다.

균주의 배양

B. subtilis KACC-9122P 및 젖산균의 배양은 300 mL 삼각 플라스크에 SY 및 MRS 액체배지를 각각 100 mL씩 첨가하고 121°C, 15분 멸균한 후 동일 배지에서 전배양한 배양용액을 각 5 mL씩 접종한 다음, *B. subtilis* KACC-9122P는 35°C에서 160 rpm으로 24시간 배양하였으며, 젖산균은 혐기성 jar fermenter를 이용하여 정치배양하였다. 이 배양용액을 8,000×g에서 15분 동안 원심분리하여 균체를 회수한 다음 멸균증류수로 세척하는 과정을 2회 반복하였다. 최종 균체 농도의 흡광도는 660 nm에서 흡광도(O.D.) 값이 0.9가 되도록 멸균증류수로 조정하여 용안육의 발효를 위한 접종원으로 사용하였다.

용안육의 발효

500 mL 삼각플라스크에 용안육을 100 g씩 넣고 증류수로 50%(w/v)의 수분함량으로 조정한 후 121°C, 15분 멸균한 다음 전배양한 *B. subtilis* KACC-9122P와 혼합 젖산균의 균체현탁액을 각각 5 mL 접종하여 37°C에서 4일 동안 행하였다. 발효가 종료된 용안육은 동결건조한 후 분석용 시료로 사용하였다.

유기산 분석

동결 건조한 시료분말 5 g을 증류수 50 mL에 침지하여 30°C의 shaking incubator에서 5시간 동안 추출한 후 전체 부피를 100 mL로 정용한 후, 원심분리(5,000 rpm, 10 min)하여 상층액을 취하였으며, 이를 0.2 μ m membrane filter로서 여과한 후 HPLC(Shimadzu LC10A, Japan) 분석용 시료로 사용하였다.

유리당 분석

동결 건조한 시료분말 5 g을 증류수 25 mL에 침지하여 30°C의 shaking incubator에서 5시간 동안 추출한 후, acetonitrile로 50 mL까지 채워 정용한 후, 원심분리(5,000 rpm, 10 min)하여 상층액을 취하였으며, 이를 0.2 μ m membrane filter로서 여과한 후 HPLC(Shimadzu LC10A, Japan) 분석용 시료로 사용하였다.

일산화질소 생성 측정

단핵세포 세포주인 RAW264.7 세포로부터 일산화질소(nitric oxide, NO) 생산의 지표로서 배양 상층액 내에 안정된 NO 산화물인 NO_2 (nitrite)를 Griess 반응으로 측정하였다(22). EDTA(ethylenediamine tetra acetic acid)가 들어 있는

50 mM potassium phosphate buffer로 조직을 마쇄한 후에 4°C, 10,000×g에서 15분 동안 원심 분리하여 조직의 상층액을 준비하였으며, 각각의 상층액 100 µL를 96 well plate에 넣고, 여기에 Griess 시약(0.1% N-1-naphthyl- ethylenediamine /H₂O : 1% sulfanilamide/5% H₃PO₄ = 1 : 1)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 NaNO₂를 이용하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다.

전자공여능 측정

전자공여능(Electron-donating ability, EDA) 측정은 96 well plate에 에탄올로 녹인 1.5×10⁻⁴ M DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액 90 µL와 시료 10 µL를 첨가한 후 10분 간 반응을 시킨 다음 microplate reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 농도에 따른 전자공여능은 아래의 식에 따라 계산하였으며, DPPH 용액 대신 에탄올을 첨가한 시료의 흡광도를 blank로 하였고, 시료 또는 메탄올을 넣은 것을 대조구로 하였다(23).

$$EDA(\%) = (1 - 10\text{분 후 측정 한 시료의 흡광도 변화}) \times 100/\text{대조구의 흡광도}$$

암세포 성장억제 효과 측정

실험에 사용한 암세포는 인체의 자궁경부암세포인 HeLa cell과 간암세포인 HepG2 cell을 Korea Cell Line Bank (KCLB)로부터 구입하여 실험에 사용하였으며, 각각 5% FBS(fetal bovine serum, Hyclone, USA) 및 항생제 혼합액을 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO, NY, USA) 배양액을 사용하였다. 암세포에 대한 암세포 성장억제 효과를 측정하기 위해 MITT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay를 실시하였다(24). 암세포를 96well plate에 1×10⁵ cells/well 이 되게 300 µL 씩 분주하여 24시간 후 시료를 일정한 농도로 제조하여 10 µL 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 여기에 PBS(phosphate- buffered saline)에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MITT용액 20 µL를 첨가하고 동일한 배양 조건에서 4시간을 배양하였다. 배양액을 제거하고 각 well 당 DMSO(dimethyl sulfoxide) 300 µL를 가하여 ELISA reader(Molecular Devices, SpectraMAX 340pc, USA)로 517 nm에서 흡광도를 측정하여 inhibition rate(%)를 구하였다.

결과 및 고찰

유기산 함량의 변화

태국산과 베트남산 용안육 및 그 발효 배양물의 유기산

을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 원료 용안육의 총 유기산은 태국산 용안육(473.49 mg/g)이 베트남산(148.48 mg/g) 용안육에 비하여 3.2배 높은 함량을 나타내었으며, 주요한 유기산은 태국산과 베트남산 모두 formic acid와 malic acid였으며, 그 함량이 전체 유기산의 각각 89.2%, 85.7%를 나타내었다. 발효 용안육의 경우에도 2 가지 유기산은 전체의 유기산에 대한 비율은 *B. subtilis*와 3가지 혼합 젖산균 배양에서 태국산(88.9%, 86.8%) 및 베트남산(88.9%, 88.5%) 발효 용안육에서도 큰 차이가 없었지만, 그 상대적 함량은 원료 용안육의 함량이 높은 태국산 발효 용안육이 총 유기산 함량에서 베트남산 보다 발효균에 따른 각각 3.8배와 3.1배가 높게 나타났다. 그리고 *B. subtilis* 및 혼합 젖산균 배양에 의하여 제조된 발효 용안육의 총 유기산은 각각 그 원료육에 비하여 태국산은 46.6%와 27.9%였으며, 베트남산은 39.1%와 28.6%로 그 함량이 큰 폭으로 감소되었다. 이상의 결과에서 청국균 및 혼합 젖산균 발효에 의한 원료 용안육의 총 유기산 함량이 감소하므로, 발효 용안육이 원료 용안육에 비하여 신맛이 감소되는 효과가 있을 것으로 판단된다. Jwa 등(25)은 9월중에 생산된 섬오갈피 줄기의 총 유기산은 504.9 mg%였으며, 주요 유기산과 그 함량은 succinic acid(177.7 mg%), citric acid(152.4 mg%), malic acid(98.7 mg%)로 보고하였다.

Table 1. Contents of organic acids in raw and fermented yonganyook of oriental medicinal herb

	(mg/g)					
Organic acids	YTO	YTBS	YTLB	YVO	YVBS	YVLB
Citric acid	4.01	2.44	2.06	2.39	-	-
Tartaric acid	8.33	4.99	3.81	3.99	2.01	1.39
Malic acid	178.50	82.57	62.49	30.52	14.98	12.89
Succinic acid	36.12	15.83	10.87	12.84	3.55	2.75
Lactic acid	2.67	1.11	0.74	1.96	0.83	0.59
Formic acid	243.86	113.62	52.10	96.78	36.71	24.71
Acetic acid	-	-	-	-	-	0.15
Total	473.49	220.56	132.07	148.48	58.08	42.48

YTO = Thai yonganyook, YVO= Vietnamese yonganyook.
 YTBS, YVBS = YTO and YVO fermented with *B. subtilis* HS-25.
 YTLB, YVLB = YTO and YVO fermented with mixture of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and *L. reuteri*, respectively.

유리당 함량의 변화

태국산과 베트남산 용안육 및 그 발효 배양물의 유리당 함량을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 원료 용안육의 총 유리당은 유기산 함량과는 다르게 베트남산(434.63 mg/g)이 태국산(378.77 mg/g)에 비하여 1.15배 높은 함량을 나타내었으며, 주요한 유리당은 태국산과 베트남산에서 sucrose, glucose와 fructose였으며, 태국산에서는 mannose가 미량으로 미발효 원료에서 검출되었다. 그리고 *B.*

subtilis 및 혼합 젖산균 배양에 의하여 제조된 발효 용안육의 총 유리당은 무처리 원료에 비하여 각각 태국산은 47.3%와 42.2%, 베트남산은 43.6%와 31.5%로 그 함량이 감소되었으며, 이는 총 유기산의 변화와 유사하게 원료의 전처리 과정과 청국균 및 혼합 젖산균 발효에 의한 발효성 당으로 이용되므로 인한 그 함량이 감소된 것으로 판단된다. Jwa 등(25)은 9월중에 생산된 섬오갈피 줄기의 주요 유리당과 그 함량을 glucose(0.75%), fructose(0.34%), sucrose(0.21%)로 보고하였다.

Table 2. Contents of free sugars in raw and fermented yonganyook of oriental medicinal herb

Free sugars	(mg/g)					
	YTO	YTBS	YTLB	YVO	YVBS	YVLB
Sucrose	119.26	94.65	82.15	146.63	53.64	39.55
Glucose	143.88	24.62	26.41	130.73	65.53	42.53
Mannose	12.18	-	-	-	-	-
Fructose	103.45	59.79	51.08	157.27	70.51	54.68
Total	378.77	179.06	159.64	434.63	189.68	136.76

YTO = Thai yonganyook, YVO = Vietnamese yonganyook.
YTBS, YVBS = YTO and YVO fermented with *B. subtilis* HS-25.
YTLB, YVLB = YTO and YVO fermented with mixture of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and *L. reuteri*, respectively.

대식세포주 일산화질소 생성의 변화

반응성 질소기(RNS, reactive nitrogen species) 중에 NO는 염증 반응에 관여하는 활성기로서 phagocyte cell로부터 유리된 활성기는 염증 반응에 매우 중요한 역할을 하며 그들은 NF- κ B를 활성화시키고 이것은 염증 항체와 cox-2를 유도하며 항산화제는 이들의 활성을 방해하여 염증 발현을 억제한다(26). 태국산과 베트남산 용안육 원료 및 그 발효물의 추출물 농도별로 첨가하여 단핵세포 대식세포주인 RAW264.7 세포와 함께 배양하였을 때, 추출물에 의한 NO 생성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 대조군의 NO 함량은 $0.47 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 로서 다른 시료들에 비하여 높은 함량을 나타내었으며, 원료 및 발효 용안육 시료의 추출물 농도를 증가시킬수록 NO 생성은 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 태국산과 베트남산의 원료 용안육 NO 생성은 각 농도별 서로 비슷한 수치를 나타내었으며, *B. subtilis*와 혼합 젖산균의 발효 용안육의 NO 생성은 원료 용안육에 비하여 약간 높은 경향을 나타내었다. 특히 발효 용안육의 경우, 태국산이 베트남산에 비하여 약간 높은 농도를 나타내었고, 각 농도별 NO의 생성은 원료 용안육과 발효 용안육의 고농도 추출물보다 저농도에서 그 함량 차이가 크게 나타났다. 따라서 용안육의 추출물은 NO 생산을 저해하고 활성기 소거활성도 나타내므로 유익한 예방의학적 효과와 NO 생산 저해제의 새로운 자원으로 기대된다. 그리고 Kim 등(27)은 21종의 한약재 중에서 LPS 무처리 조건에서 광항

(*Agastache rugosa*)의 열수 추출물이 마우스 대식세포주인 RAW264.7세포의 NO 생산을 강력하게 유도하였다고 보고하였으며, Yee 등(28)은 당귀, 어성초, 오가피, 황기 등 4가지 한약재 추출물을 단독으로 처리했을 때는 NO와 TNF- α 생산을 유도하지 못하지만, IFN- γ 와 동시 처리를 하면 추출물 농도에 의존적으로 유도되었다고 보고하였다. Kang 등(29)은 in vitro 실험의 경우, 마우스 복강 macrophage에 LPS와 γ -interferone을 처리할 때, 대조군의 NO 생성량은 $11.4 \pm 1.0 \mu\text{M}$ 이었는데, 천남성(天南星, *Arisaemitis tuber*)은 NO 생성을 촉진한 반면에, 황련(黃連, *Coptidis rhizoma*)은 억제하는 경향을 나타내었다고 하였다.

Table 3. Effect of raw and fermented yonganyook on NO production in RAW264.7 cells

Samples	Concentration (mg/mL)	NO(μM)
YTO	1.0	0.36 ± 0.01
	0.5	0.37 ± 0.01
	0.2	0.38 ± 0.01
YTBS	1.0	0.37 ± 0.01
	0.5	0.43 ± 0.03
	0.2	0.46 ± 0.02
YTLB	1.0	0.36 ± 0.02
	0.5	0.41 ± 0.01
	0.2	0.43 ± 0.01
YVO	1.0	0.34 ± 0.01
	0.5	0.35 ± 0.02
	0.2	0.37 ± 0.02
YVBS	1.0	0.33 ± 0.01
	0.5	0.37 ± 0.01
	0.2	0.39 ± 0.02
YVLB	1.0	0.35 ± 0.01
	0.5	0.39 ± 0.01
	0.2	0.42 ± 0.01

YTO = Thai yonganyook(Raw), YVO = Vietnamese yonganyook(Raw).
YTBS, YVBS = YTO and YVO fermented with *B. subtilis*.
YTLB, YVLB = YTO and YVO fermented with mixture of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and *L. reuteri*, respectively.
Data were presented as the mean \pm SD of triplicate determinations.

전자공여능의 변화

DPPH의 전자공여능 실험은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 식품중의 지방산화를 억제하는지를 측정할 목적으로 사용되고 있을 뿐만 아니라, 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화억제작용을 측정하는데도 이용된다. 원료 용안육 및 그 발효 추출물의 전자공여능을 분석한 결과는 Fig. 1과 같이 각 추출물을 100~600 μg 으로 증가시키에 따라 전자공여능도 비례적으로 증가하였다. 원료 용안육의 전자공여

능은 베트남산이 $41.72 \pm 3.59\%$ 로 태국산 $30.20 \pm 4.80\%$ 에 비하여 1.4배 높았으며, 발효 용안육의 전자공여능은 *B. subtilis*로 발효시킨 베트남산 용안육의 추출물 600 µg에서 $43.57 \pm 2.07\%$ 로 가장 높게 나타났으며, 그 외의 발효 용안육은 대체로 원료 용안육에 비하여 비슷하거나 약간 낮은 전자공여능을 나타내었다.

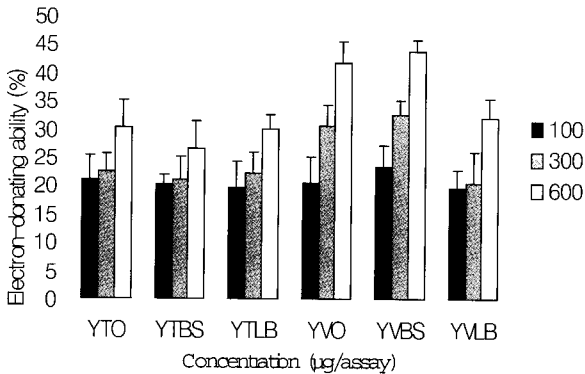


Fig. 1. Electron-donating ability of methanol extracts of raw and fermented yonganyook of oriental medicinal herb.

YTO = Thai yonganyook, YVO = Vietnamese yonganyook. YTBS, YVBS = YTO and YVO fermented with *B. subtilis*. YTLB, YVLB = YTO and YVO fermented with mixture of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and *L. reuteri*, respectively. Data were presented as the mean±SD of triplicate determinations.

Lee 등(30) 가자, 소목, 지유, 복분자, 초두구 등이 DPPH 라디칼에 대한 소거활성이 높다고 보고하였으며, Jung 등(31)은 118종 한약재 및 약용식물 소거활성이 괴화가 76.9%로 가장 높았고 다음으로 녹차(64.6%), 작약(57.1%)순으로 보고하였다. Choi 등(32)은 95종의 식용 혹은 약용식물로부터 붉나무가 팜유와 돈지를 대상으로 하였을 때 각각 antioxidant index의 수치가 1.35, 3.30으로 가장 항산화능이 높게 나타났으며, 그 외에 질경이, 택란엽, 황기, 포공영 등이 우수하였다고 보고하였다. 또한 Kim 등(33)도 20종의 약용식물 물추출물의 항산화활성에서 음양곽, 오미자, 파고지, 당귀, 해동피 등이 대조구에 비해 70% 이상의 항산화활성을 나타내었다. 이상의 타 연구자들의 결과를 본 연구의 용안육 추출물과 비교하면, 그 추출법이나 처리농도 등의 실험조건들이 약간씩은 상이하지만, 대체로 용안육 추출물은 식물성 추출물들에 비하여 항산화능이 다소 낮은 경향을 나타내었다.

항암활성의 변화

태국산과 베트남산 용안육 및 그 발효 배양물에 의한 인체암 세포주인 자궁경부암세포(HeLa cell) 및 간암세포(HepG2 cell)의 항암활성 효과를 조사한 결과는 Fig. 2, 3과 같다. 시험한 두 가지 인체암 세포주는 첨가되는 원료 용안육 및 그 발효물의 추출물 농도가 50~200 µg/assay로 높아

집에 따라서 항암활성은 농도 의존적으로 비례적으로 증가되었으며, 원료 용안육의 항암활성에서 자궁경부암세포의 경우는 베트남산이 태국산 용안육보다 대체로 비슷하거나 약간 높은 경향을 나타내었고, 간암세포의 경우는 태국산 용안육 추출물 200 µg 농도에서 저해율이 $46.13 \pm 4.80\%$ 로 베트남산 $33.07 \pm 0.92\%$ 보다 1.4배 정도 항암활성이 높게 나타났다. 그리고 발효 용안육의 자궁경부암세포에 대한 항암활성은 *B. subtilis*로 발효시킨 베트남산 용안육 추출물 200 µg에서 저해율 $39.21 \pm 1.46\%$ 로 가장 높게 나타났으며, 간암세포의 경우에는 *B. subtilis*로 발효시킨 태국산 용안육 추출물 200 µg에서 저해율 $48.07 \pm 1.63\%$ 로 가장 높았다. 이상의 결과에서 원료 용안육에 비하여 발효 용안육이 대체로 항암활성을 증진효과가 있었으며, 그 중에서는 *B. subtilis*균주를 이용한 청국균 발효가 *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* 및 *L. reuteri* 혼합 젖산균 발효에 비하여 효과적인 것으로 나타났다. 그러나 본 실험의 발효 용안육은 원료 용안육에 비하여 청국균이나 혼합 젖산균의 각각 발효과정을 통해서 활성이 현저하게 높지 못하고 부분적으로 낮은 이유로는 원료의 증자과정에서 관련 생리활성 물질의 누출 혹은 파괴나 생물전환 조건의 미비함 등이 원인으로 추정된다. 따라서 원료 용안육의 발효균 증식에 따른 발효한약의 생리활성 상승효과를 위해서는 현재의 살균 및 발효공정의 개선에 관한 연구가 더욱 필요한 실정이었다. 그리고 다른 연구자들의 연구로는 Kang 등(29)은 한방병원에서 많이 사용하는 한약재로서 항암효과가 있다고 알려져 있는 황련은 그 추출물을 100 µg/mL로 처리하면 인체 간암세포주인 HepG2세포의 증식을 50% 이상을 억제하였고, 다음으로 천남성과 시호(柴胡, *Bupleuri radix*)는 20~50% 범위로 억제하였는데, 의이인(薏苡仁, *Coicis semen*)은 오히려 증식을 촉진한다고 보고하였다.

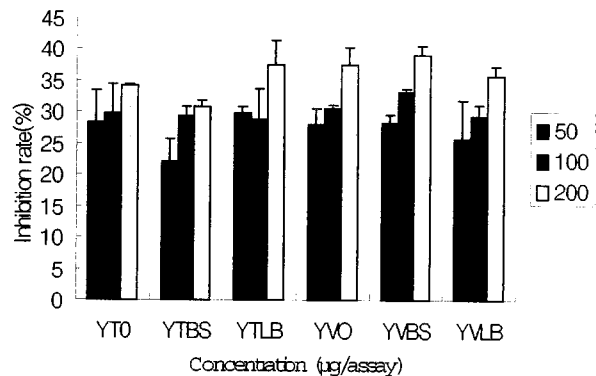


Fig. 2. Inhibitory effects of methanol extracts of raw and fermented yonganyook of oriental medicinal herb on HeLa cell growth.

YTO = Thai yonganyook, YVO = Vietnamese yonganyook. YTBS, YVBS = YTO and YVO fermented with *B. subtilis*. YTLB, YVLB = YTO and YVO fermented with mixture of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and *L. reuteri*, respectively. Data were presented as the mean±SD of triplicate determinations.

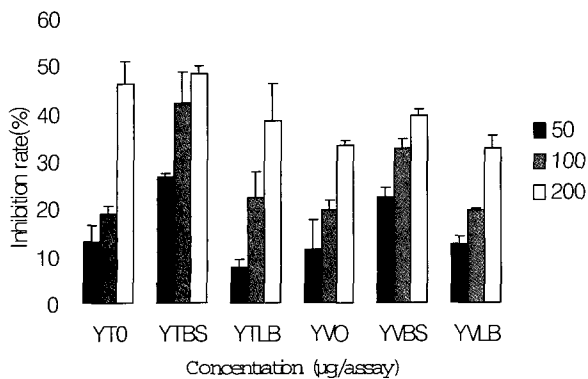


Fig. 3. Inhibitory effects of methanol extracts of raw and fermented yonganyook of oriental medicinal herb on HepG2 cell growth.

YTO = Thai yonganyook, YVO = Vietnamese yonganyook
 YTBS, YVBS = YTO and YVO fermented with *B. subtilis*.
 YTLB, YVLB = YTO and YVO fermented with mixture of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and *L. reuteri*, respectively.
 Data were presented as the mean±SD of triplicate determinations.

요약

태국산과 베트남산의 용안육 원료 및 그 발효물의 전자공여능, 일산화질소(NO) 생성효과, 인체암 세포주인 자궁경부암세포(HeLa) 및 간암세포(HepG2)의 항암활성 효과를 조사하였다. 원료 용안육의 총 유기산은 태국산 용안육(473.49 mg/g)이 베트남산(148.48 mg/g) 용안육에 비하여 3.2배 높은 함량을 나타내었고, 전체 유기산의 각각 89.2%와 86.8%를 나타내었으며, 주요 유기산은 formic acid와 malic acid였다. 원료 용안육의 총 유리당은 베트남산(434.63 mg/g)이 태국산(378.77 mg/g)에 비하여 1.2배 높은 함량을 나타내었으며, 주요한 유리당은 sucrose, glucose와 fructose였다. 단핵세포 세포주인 RAW264.7 세포에서 발효 용안육의 NO 생성은 베트남산이 태국산에 비하여 약간 낮은 농도를 나타내었고, 원료 용안육과 비교하면 고농도보다 저농도 추출물 첨가에서 그 함량의 차이가 크게 나타났다. 원료 용안육의 추출물 600 µg에서 전자공여능은 베트남산이 41.72±3.59%로 태국산 30.20±4.80%에 비하여 1.4배 높았으며, 발효 용안육의 전자공여능은 *B. subtilis*로 발효시킨 베트남산 용안육의 추출물 600 µg에서 43.57±2.07%로 가장 높게 나타났다. 원료 용안육의 자궁경부암세포에 대한 항암활성은 베트남산이 태국산 용안육보다 대체로 비슷하였지만, 간암세포의 경우는 태국산 용안육 추출물 200 µg 농도에서 저해율이 46.13±4.80%로 베트남산 33.07±0.92%보다 높게 나타났다. 그리고 발효 용안육의 자궁경부암세포 및 간암세포에 대한 항암활성은 각각 *B. subtilis*로 발효시킨 베트남산 및 태국산 용안육 추출물 200 µg에서 저해율 39.21±1.46% 및 48.07±1.63%로 가장 높게 나타났다.

감사의 글

본 논문은 2005년 진주산업대학교 구조개혁 선도대학 지원금 및 간접연구경비를 지원 받아 수행된 연구과제로 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. 한대석. (1988) 생약학. 동명사, 서울. p.291
2. Ryu, J.Y., Kim, J.S. and Kang, S.S. (2002) Quality evaluation and components of *Euphoria longana*. Kor. J. Pharmacogn., 33, 191-193
3. Kleiman, R., Earle, F.R. and Wolff, I.A. (1968) Dihydrosterculic acid, a major fatty acid component of *Euphoria longana* seed oil. Lipids, 4, 317-320
4. Ackman, R.G. and Hooper, S.N. (1970) Hydrolysis products of the major fatty acids from *Euphoria longana* seed oil. J. Am. Oil Chem. Soc., 47, 525-529
5. Okuyama, E., Ebihara, H., Takeuchi, H. and Yamazaki, M. (1999) Adenosine, the anxiolytic-like principle of the arillus of *Euphoria longana*. Planta Med., 65, 115-119
6. Kim, D.H., Song, M.C., Choi, J.M., Kim, S.H., Kim, D.K., Chung, I.S., Park, M.H., Kwon, B.M. and Baek, N.I. (2004) Development of biologically active compounds from edible plant sources-VIII. Isolation of platelet aggregation inhibitory compounds from the arillus of *Euphoria longana* L. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 47, 130-134
7. Feng, L.H., Feng, H.L. and Juei, T.C. (1994) Influence of acetylgeraniin, a hydrolyzable tannin from *Euphoria longana*, on orthostatic hypertension in a rat model. Planta Med., 60, 297-300
8. Juei, T.C., Ta, C.L. and Feng, L.H. (1995) Antihypertensive effect of corilagin in the rat. Can. J. Physiol. Pharmacol., 73, 1425-1429
9. Mahato, S.B., Sahu, N.P. and Chakravarti N. (1971) Chemical investigation on the leaves of *Euphoria longana*. Phytochemistry, 10, 2847-2848
10. Kim, D.H., Kim, D.W., Choi, S.Y. and Park, C.H. (2005) 5-hydroxymethyl- 2-furfuraldehyde, anticonvulsant furan from the arillus of *Euphoria longana* L. Agric. Chem. Biotechnol., 48, 32-34
11. Ha, Y.K. (2002) Effects of the Longanae Arillus on the norepinephrine contents of immobilization stressed mice brain. MS thesis, Kyungwon Univ., Seongnam, Korea
12. Whang, S.M. (2002) Effects of the *Euphoria longana* L. and *Hoelen cum Pini Radix* on the serotonin contents

- of immobilization stressed mice brain. MS thesis, Daegu Haany Univ., Daegu, Korea
13. Kim, N.J. and Hong, N.D. (1996) Studies on the processing of crude drugs on the constituents and biological activities of *Glycyrrhizae radix* by processing. Kor. J. Pharmacogn., 27, 196-206
 14. Kim, D.H., Han, S.B., Park, J.S. and Han, M.J. (1994) Fermentation of antler and its biological activity. Kor. J. Pharmacogn., 25, 233-237
 15. Park, S.J., Kim, D.H., Paek, N.S. and Kim, S.S. (2006) Preparation and quality characteristics of the fermentation product of ginseng by lactic acid bacteria(FGL). J. Ginseng Res., 30, 88-94
 16. Han, J.Y., Goo, D.H., Han, M.S. and Ryu, G.H. (2007) Comparison of fermentability and characteristics of fermented broth for white ginseng, red ginseng and extruded white ginseng. Food Eng. Progress, 11, 119-126
 17. Jang, H.D., Kim, H.J., Min, B.J., Cho, J.H., Chen, Y.G., Yoo, J.S., Lee, J.J., Han, M.H. and Kim, I.H. (2007) Effects of fermented wild-ginseng culture by-products on growth performance, blood characteristics, meat quality and ginsenoside concentration of meat in finishing pigs. J. Anim. Sci. Technol., 49, 329-340
 18. Jae, J.H. (2007) Antidiabetic and oxidative stress relieving effects of fermented red ginseng. MS thesis, Busan National Univ., Busan, Korea
 19. Kim, C.H., Kwon, M.C., Kim, H.S., Bae, G.J., Ahn, J.H., Chio, G.P., Choi, Y.B., Ko, J.R. and Lee, H.Y. (2007) Enhancement of immune activities of *Kadsura japonica* Dunal through conventional fermentation process. Korean J. Med. Crop Sci., 15, 162-169
 20. Kim, S.D., Ku, Y.S., Lee, I.Z., Kim, M.K. and Park, I.K. (2000) Major chemical components in fermented beverages of *Liriopsis tuber*. J. East Asian Dietary Life, 10, 281-287
 21. Ryu, K.Y., Seo, H.Y., Han, K.J., Jeong, Y.M., Kim, K.S., Hong, K.J. and You, S.H. (2007) Changes of volatile organic compounds of *Rhus verniciflua* S. Bark by fermentation. Korean J. Food Preserv., 14, 308-314
 22. Chi, Y.S., Cheon, B.S. and Kim, H.P. (2001) Effect of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 cell. Biochem. Pharmacol., 61, 1195-1203
 23. Chu, Y.H., Chan, C.L. and Hsu, H.F. (2000) Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant mushrooms(*Agaricus bisporus*). J. Sci. Food Agric., 80, 561-566
 24. Hansen, M.B., Neilsen, S.E. and Berg, K. (1989) Reexamination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J. Immunol. Methods, 119, 203-210
 25. Jwa, C.S., Yang, Y.T. and Kok, J.S. (2000) Changes in free sugars, organic acid, free amino acids and minerals by harvest time and parts of *Acanthopanax koreanum*. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 43, 106-109
 26. Kim, K.A., Nam, H.Y., Moon, J.H., Jeong, J.S., Lim, Y. and Kai, H. (2002) Role of NO in activation of NFκB by PM2.5 in lung epithelial cells. Tuberculosis Respiratory Dis., 52, 616-626
 27. Kim, S.H., Kang, M.Y. and Nam, S.H. (2005) Modulatory effects of 21 kinds of medicinal herbs including herba *Pogostemi*(*Agastache rugosa*) on nitric oxide production in macrophage cell line RAW264.7 cells. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 48, 411-417
 28. Yee, S.T., Jeong, Y.R., Ha, M.H., Kim, S.H., Byun, M.W. and Jo, S.K. (2000) Induction of nitric oxide and TNF-α by herbal plant extracts in mouse macrophages. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 29, 342-348
 29. Kang, S.Y., Han, J.H. and Cho, N.G. (1997) Effect of several herb drugs Hep G2 cells and mouse peritoneal macrophage. J. Herbology, 12, 95-111
 30. Lee, S.E., Seong, N.S., Park, C.G. and Seong, J.S. (2002) Screening for antioxidative activity of oriental medicinal plant materials. Korean J. Med. Crop Sci., 10, 171-176
 31. Jung, S.J., Lee, J.H., Seong, N.S., Lee, S.E. and Baek, N.I. (2004) Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 47, 135-140
 32. Choi, U., Shin, D.H., Chang, Y.S. and Shin, J.I. (1992) Screening of natural antioxidant from plant and their antioxidative effect. Korean J. Food Sci. Technol., 24, 142-148
 33. Kim, E.Y., Baik, I.H., Kim, J.H., Kim, S.R. and Rhyu, M.R. (2004) Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol., 36, 333-338