

금은화 추출물을 이용한 미생물 발효 생성물의 항산화 특성

신정희¹ · 유선균^{2*}

¹중부대학교 식품영양학과, ²중부대학교 식품생명과학과

Antioxidant Properties in Microbial Fermentation Products of *Lonicera japonica* Thunb. Extract

Jung Hee Shin¹ and Sun Kyun Yoo^{2*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

²Dept. of Food Science and Biotechnology, Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

Abstract

The purpose of this study is to investigate antioxidant properties in microbial fermentation products of *Lonicera japonica* Thunb extract. The bacterium *Lactobacillus plantarum* NHP1 was isolated from conventional fermented foods. Modern pharmacological studies show that *Lonicera japonica* Thunb and its active principles of wide pharmacological actions. For instance, they show a strong efficacy in antibacterial, anti-inflammatory, antiviral, anti-endotoxin, blood fat reducing, anti-pyretic, and antioxidant activities. The extract of *Lonicera japonica* Thunb was obtained by extracting dried *Lonicera japonica* Thunb using either hot water or 70% ethanol as a solvent. Fermentation was performed in a 2L fermentor containing 1.2 L of extractat conditions of 30°C and 100 rpm for 48 hr. The amount of chlorogenic acid was 2.65 µg/g in hot water extract. The total phenolic content (GAE, gallic acid equivalent) in hot water and 70% ethanol were 56.5±4.9 GAE mg/g and 72.7±5.3 GAE mg/g, respectively. After fermentation, the phenolic content increased to 30.2% in hot water and 12.9% in ethanol extract. In the same manner, flavonoid content increased to more than 75% regardless of extract solvent. ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) value noticeably increased to 50% after fermentation.

Key words : Antioxidant, *Lonicera japonica*, fermentation, phenolics compounds, flavonoids, DPPH, ABTS.

서론

금은화(*Lonicera japonica* flower)는 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 인동덩굴(*Lonicera japonica* Thunb.)의 꽃으로서 오래전부터 동양의학에서 호흡기 감염, 당뇨병 및 관절염 치료와 독소에 대한 중화 및 해열제로 활용되어 왔다(Lee *et al* 2008, Yoo *et al* 2005). 금은화의 주요 생리활성인 염증반응 억제와 독소에 대한 중화반응 등은 금은화의 항산화 물질에 기인한 것으로 밝혀짐에 따라, 최근 금은화 항산화 성분과 생리활성에 대한 연구가 진행되어 왔다(Joo *et al* 2010). 그동안 진행된 연구 결과들에 의하면 다양한 용매로 추출된 금은화의 성분들은 chlorogenic acid, tannin류, saponins, flavonoid 화합물인 lonicerin, luteolin, apigenin, quercetin, ochnaflavone, astragalinal 등이 배당체로 존재하는 것으로 밝혀졌다(Han *et al* 2008).

생체반응 중에서 생성되는 활성산소들은 대부분 생체 소

거기작에 의해서 소멸되지만, 다양한 이유로 소거기능이 부실해지거나 만성적으로 대량 발생하는 경우 각종 질환의 원인이 된다(Harman D 1992). 이러한 활성산소들을 소거하기 위하여 BHT(butylated hydroxytoluene), BHA(butylated hydroxyanisole), TBHQ(tert-butylhydroquinone), PG(propyl gallate) 등이 사용되어 왔지만, 독성 및 안정성이 의문시됨에 따라(Shahidi F 2000) 식물성 천연물로부터 유래하는 flavonoids, phenolics, limonoids, carotenoids, coumarins, phytosterols 같은 항산화 물질에 대한 연구가 집중적으로 진행되고 있다(Craig WJ 1999, Ou *et al* 2002).

최근 미생물을 이용한 천연 생리활성 물질에 대한 발효가 활발하게 연구되고 있는데, 미생물을 이용한 천연물 발효는 미생물의 에너지를 제외한 영양성분들은 대부분 그대로 보존되고 미생물이 분비하는 각종 가수분해효소와 세포내 조직에 결합되어 있던 생리활성 물질들이 유리되기 때문에 생체이용률(bioavailability)이 훨씬 높아지는 것으로 알려졌다(Hubert *et al* 2008, Katina *et al* 2007). 본 연구에서는 금은화를 열수 또는 70% ethanol로 추출하였고, 추출물을 전통

* Corresponding author : Sun Kyun Yoo, Tel : +82-41-750-6206, Fax : +82-41-750-6422, E-mail : skyoo@joongbu.ac.kr

발효식품에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* NHP1을 이용하여 발효를 수행한 후, 발효 전후의 총 페놀성 화합물, 플라보노이드 화합물, DPPH 소거능 및 ABTS를 측정하였다. 따라서 본 연구의 목적은 금은화 열수, 70% ethanol 추출물이 전통발효식품에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* NHP1 균주에 의한 발효과정에 의해 항산화 물질 및 래디칼 소거능이 변화하는지를 관찰하고자 하는 것이다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

실험에 사용된 금은화는 유림당 생약(금산군, 충남)에서 건조된 상태로 구입을 하였다. 실험에 사용된 발효 균주는 홈플러스(동구, 대전)에서 구입한 전통 발효 김치 및 채소류로부터 분리하였다. 분석 및 생리활성 측정을 위한 시약인 gallic acid, hesperidine, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), aluminum chloride, phenol reagent, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), potassium persulfate, naringine, luteolin, imperatorin, trolox 등은 Sigma Aldrich Company(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 그 외에 사용된 시약들은 1 등급이었다.

2. 균주 분리 및 동정

연구에 사용된 균주는 발효 김치 및 채소류를 포장된 상태로 가볍게 짠 후 국물을 용기 바닥에 고이게 한 후 한 백금이 취하여 MRSA(Difco, NJ, USA) 평판 배지에 도말하여 분리하였다. 평판 배지들은 30°C의 항온기에서 48시간 배양하였다. 원형으로 유백색의 광택이 나는 콜로니들을 선택하여 설당을 3% 함유한 TSA(Difco, NJ, USA) 평판배지에 옮겨 24시간 배양하였다(Hwang *et al* 2008). 최종적으로 선택된 균주의 현미경 관찰은 TSA에서 배양된 콜로니를 백금이로 슬라이드 글라스에 옮긴 후 염색하지 않고 현미경(BX51, Olympus, Japan)에서 400배율로 관찰하였다.

정제한 16S rRNA를 주형으로 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystems, Carlsbad, CA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequencing PCR은 BigDye 1.3 μ L, P7 primer 1 μ L, 16S rRNA sample 1 μ L(100 ng), 2 \times buffer 3.4 μ L에 멸균 증류수 13.3 μ L를 잘 혼합한 후 cycle sequencing을 실시하였다. PCR 산물은 100% ethanol 50 μ L와 3 M sodium acetate(pH 5.2) 2 μ L를 첨가한 후 15,000 rpm에서 25분간 침전시키고, 250 μ L의 70% ethanol로 세척하여 건조시킨 후 HiDi Formamide 20 μ L를 첨가하여 95°C에서 2분 동안 denaturation 한 후 얼음위에서 냉각시키고 ABI PRISM 310 Genetic Analyser(Applied Biosystems, Carlsbad, CA)를 사용하여 16S rRNA (500~580

bp) 염기서열을 결정하였고, homology는 DDBJ/NCBI/GenBank database의 BLAST program을 이용하여 비교하였다. 각 염기서열의 상동성은 alignment Clustal X program를 이용하여 병렬로 정렬하였으며, 계통도의 작성은 근린 결합법에 의거하여 결정하였다(Thomson *et al* 1994).

3. 금은화 엑기스 추출 및 농축

건조 금은화 300 g을 저울에 정밀히 달아 부직포에 넣고 5 L 둥근 추출용 플라스크에 옮기고 2 L의 증류수를 공급하였다. 내용물을 완전히 잠기게 한 후에 플라스크를 환류장치에 연결하고, 8°C 냉각 순환수조에 연결을 하였다. 추출은 95°C에서 3시간 30분 동안 수행하였다. 같은 방법으로 70% ethanol 추출은 70°C에서 3시간 30분간 수행하였다. 추출 후 잔여물을 제거하기 위하여 부직포를 두 겹으로 하여 순수 추출액을 회수하고, 농축 전까지 4°C 이하에서 냉장보관하였다. 추출액 농축은 500 mL 농축 플라스크에 추출액을 200 mL를 담아 감압 농축기에 연결하여 수행하였다. 항온수조의 물의 온도를 60°C로 맞추고, 냉각수 순환조의 온도가 4°C 이하로 내려가면 물을 순환시켜 감압상태 하에서 최종 농축액이 50°brix 될 때까지 농축하였다. 농축액은 실험에 사용할 때까지 4°C 이하에서 냉장보관하였다.

4. 발효를 위한 배지의 조성 및 배양 조건

균주 증식 및 발효에 사용된 염배지(mineral medium; MM)는 증류수 1 L에 K₂HPO₄ 3 g, FeSO₄·H₂O 0.01 g, MnSO₄·7H₂O 0.01 g, NaCl 0.01 g, CaCO₃ 0.05 g, ethylenediaminetetraacetic acid 0.1 g을 용해하여 pH를 6.5로 보정하여 제조하였다. 염배지에 0.5% (w/v) 효모 추출물(yeast extract)을 포함하였을 때는 MMY로 표기하였다. 전 배양을 위한 금은화 발효 배지는 MMY에 금은화 농축액이 2% (w/v)가 되도록 조정 후 pH를 6.5로 보정하여 제조하였다. 배지 50 mL를 250 mL 배양플라스크에 분주하였다.

전배양은 진탕배양기(SI-300R, Lab, Korea)에서 30°C, 150 rpm 조건으로 24시간 동안 진탕배양하였다. 전배양액은 본 배양을 위한 종균으로 사용하였다. 본 배양을 위한 배지의 조성은 MMY에 금은화 농축액이 10%(w/v)가 되도록 조정 후 pH를 6.5로 보정하여 제조하였다. 본 배양은 working volume 2 L의 회분식 발효기(Semital, Daejeon, Korea)에 제조된 배지 1.2 L와 종균 60 mL를 무균적으로 공급을 하고 30°C, 100 rpm 조건으로 48 시간 동안 수행하였다(Hwang *et al* 2008).

5. 금은화 엑기스 성분분석

성분분석에 사용된 HPLC 구성은 Shimadzu LC-20AD pump, CTO-20AC oven, SIL-20AC auto-sampler, PDA-20A UV detector, CBM-20A system controller, LC Workstation software

(Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)로 이루어졌다. 시료의 분리를 위하여 가이드 컬럼과 컬럼 Agilent C₁₈을 사용하였다. 이동상의 구성은 (A) acetonitrile 과 (B) acetic acid를 사용하였고, 60~90% B 용매조성을 0~15분 유지하고, 20~60% B 용매를 15~25분, 0~20%를 25~26분, 0% B를 26~34분, 0~90% B를 34~35분, 90% B를 10분으로 하여 가동하였다. 다음 시료분석을 위한 용매의 용출시간은 10분으로 하였고, 용매의 용출속도는 1.0 mL/min이었다. 컬럼 오븐의 온도는 40℃를 유지하였다. 총 UV 감지기의 파장은 275 nm에서 수행하였다. 분석을 위한 샘플의 양은 10 μL이었다.

6. 항산화능 측정

1) 총 페놀성 화합물 측정

전체 페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 Folin-Ciocalteu reagent(FCR) 발색방법으로 분석하였다(Dewanto *et al*, 2002). 표준물질 제조는 gallic acid (20, 40, 60, 80, 100 mg/L) 용액을 만들어 1 mL를 9 mL의 deionized water에 혼합하여 제조하였다. 분석 샘플은 Na₂CO₃ 1.5 mL(20 g/100 mL), FCR 500 μL, deionized water 6 mL, 샘플용액 100 μL, 표준 gallic acid 100 μL를 혼합하여 제조하였다. 실험실에서 분석 샘플을 2 시간 반응시킨 후에 4,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 취해 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분석샘플의 대조구는 acetone : water(1:1)로 하여 gallic acid 용액을 대신하였다. 전체 페놀 물질은 건조 시료 g 당 gallic acid equivalent(GAE)의 양으로 평가하였다.

2) 총 플라보노이드 함량 분석

전체 플라보노이드의 정량 분석은 aluminium chloride 비색법(Saleh & Hameed 2008)을 이용하여 측정하였다. Hesperidine 표준물질을 20, 40, 60, 80, 100 mg/L 용액으로 만들어 각각의 용액 1 mL를 deionized water 9 mL에 혼합하여 제조하였다. 함량분석을 위한 반응은 샘플용액 0.5 mL를 95% ethanol 1.5 mL와 혼합한 다음 10% aluminium chloride 0.1 mL, 1 M NaOH 0.1 mL, deionized water 2.8 mL를 첨가한 후 상온에서 30분간 이루어졌다. 반응 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였고, 전체 플라보노이드 양은 건조시료 g 당 hesperidine 양으로 평가하였다.

3) DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 측정은 Hung *et al* (2009)의 방법을 변형하여 측정하였다. 금은화 엑기스를 deionized water에 용해하여 농도 5%(w/v) 시료를 만들었다. 사용된 DPPH의 최종 농도는 75 μM이었다. 반응은 DPPH 용액 3.9 mL와 시료 100 μL를 어둠에서 혼합한 후 상온에서

30분간 이루어졌다. 반응 후에 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 DPPH 용액 3.9 mL와 메탄올 100 μL를 혼합하여 제조하였다. DPPH 라디칼 소거능은 대조구에 대한 시료의 흡광도를 비교하여 아래와 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{DPPH 소거능(\%)} = [(\text{추출물 무 첨가구의 흡광도} - \text{추출물 첨가구 흡광도}) / \text{추출물 무 첨가구 흡광도}] \times 100$$

4) 전체 항산화능 측정

전체 항산화능 측정은 TEAC(trolox equivalent antioxidant capacity) 방법에 의하여 분석하였다(Liyana & Shahidi 2006). 시료 내에 항산화물질이 존재할 경우 항산화물질 농도에 비례하여 ABTS는 탈색되며, 이러한 색변화를 734 nm에서 흡광도로 측정하였다. 분석은 시료의 ABTS를 소거하는 항산화능력을 표준물질인 trolox의 항산화 능력표준곡선과 비교하여 이루어졌다.

7. 통계처리

모든 연구 결과의 자료는 통계프로그램인 SAS(Statistic Analysis System, 9.2)를 이용하였다. 각 군에 따른 유의성 검정은 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA)을 한 후, $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 금은화 엑기스 발효 균주 분리

김치, 동치미, 오이지 등 발효식품에서 균주를 분리하기 위해서 무균적으로 샘플들의 엑기스를 백금으로 취해서 MRS 배지에 도말하였다. 총 50여개 이상 콜로니를 취하여 성장 및 배양특성을 비교한 후에 10개의 균주를 선택하였다. 10개 균주들을 금은화 엑기스 배지에서 배양한 후에 총 생균수, 최종 pH, 산도를 측정하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다. 유산균으로 평가할 수 있는 10개의 균주들을 같은 조건의 금은화 엑기스 배지에서 발효를 수행한 결과, 총 생균수는 $8.23 \times 10^8 \sim 1.47 \times 10^9$ /mL의 분포를 보였다. pH는 3.61~4.14 범위였고 산도는 1.01~1.51의 범위를 보였다. 총 생균수와 산도 및 pH와의 관계를 보면 균주의 종류에 상관없이 균수가 1×10^9 /mL 이하에서 정상기에 도달한 발효에서는 균수와 상관없이 pH와 산도가 거의 일정하였고, 균수가 1×10^9 /mL 이상에서는 총 균수의 증가에 따라 산도는 증가하고, pH는 감소하였다. 균의 증식, 산도 등 발효 특성을 비교하여 최종적으로 선택한 균이 NHPLB이었다. 최종 선정된 균주의 콜로니는 매끄러운 광택을 보여 주었고, 현미경 사진은 전형적인 간균으로 운동성을 보여 주었다(Fig. 1).

선정된 균은 16S rRNA 유전자 염기서열에 기초한 분자계

통학적 분석 결과, *Lactobacillus* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서, *Lactobacillus plantarum* NRRL B-14768T(AJ965482)와 100%의 유연관계를 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 따라서 분리된 균을 *Lactobacillus plantarum* NHP1으로 명명하였다.

2. Chlorogenic Acid 분석

금은화의 지표 기능성 성분으로 알려진 chlorogenic acid는

Table 1. Bacterial number, acidity and pH of fermentation broth of *Lonicera japonica* Thunb. extract produced by isolated bacteria

Isolated bacteria	Bacterial number ($\times 10^8$ /mL)	pH	Acidity
PMW1A	8.23	3.99	1.13
PMW1B	9.49	4.05	1.20
PMWLM1A	7.89	4.09	1.26
PMWLM1B	7.54	4.08	1.32
NHPLA	12.56	3.61	1.45
NHPLB	14.67	3.66	1.51
NHPLM1A	10.24	4.14	1.01
NHPLM1B	11.25	4.07	1.07
YJB10A	8.92	4.11	1.07
YJB10B	9.45	4.02	1.01

Bacteria were isolated from fermented vegetables. Fermentation medium was mineral medium(K_2HPO_4 3 g, $FeSO_4 \cdot H_2O$ 0.01 g, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, NaCl 0.01 g, $CaCO_3$ 0.05 g, ethylenediaminetetraacetic acid 0.1 g per 1 L water), yeast extract 0.5% (w/v), and *Lonicera japonica* Thunb extract 2% (v/v). Fermentation was conducted on shaker at condition of 30°C, initial pH 7.0, and 100 rpm for 48 hr.

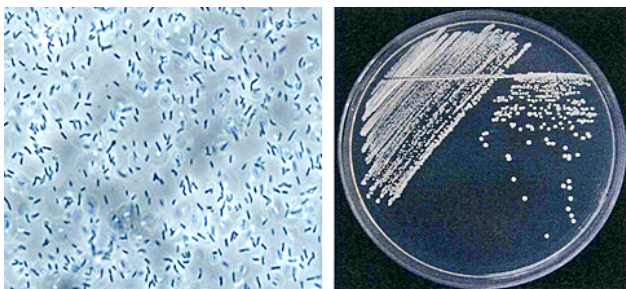


Fig. 1. Morphology and colonies of finally selected bacteria. Colonies were grown at TSA medium plus 3% sucrose (w/v) for 24 hr. Bacterial figure was taken by a microscope of 400 magnification without stain.

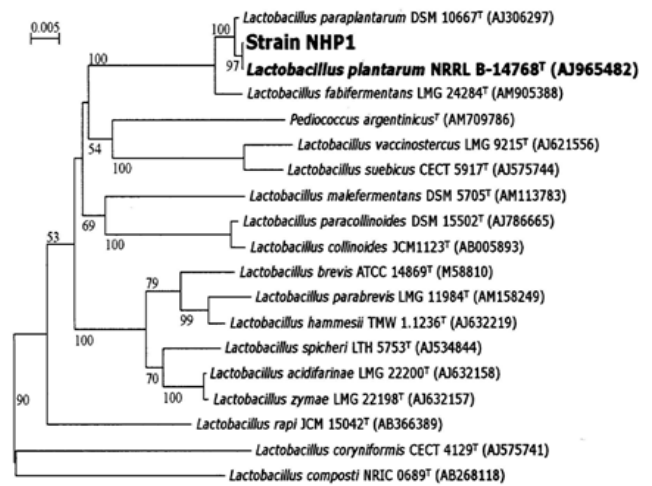


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the phylogenetic relationships of strain NHP1 and representative species of the genera *Lactobacillus*. Phylogenetic tree based on rRNA gene sequences showing the position of strain. NHP1 and related bacterial taxa. Numbers at branches are bootstrap values inferred from the BLAST program(Thomson *et al* 1994).

hydroxycinnamic acid로서 천연물의 산물인 polyphenolic caffeic acid와 cyclitol (-)-quinic acid가 에스테르 결합으로 되어 있다(Clifford *et al* 2003, Clifford MN 1999). 최근 연구에 의하면 chlorogenic acid는 강한 항산화기능이 있으며, 식후에 혈액내로 포도당 방출을 늦춘다고 보고되었다(Clifford MN 2003). 전형적인 chlorogenic acid 구조와 HPLC 분석시 internal standard로 사용된 trolox의 화학구조는 Fig. 3과 같다.

Chlorogenic acid의 정량 및 정성은 대표적인 항산화 물질로 알려진 hesperidine(Hirata *et al* 2005), naringine(Schindler & Mentlein 2006), luteolin(Kelley & Johnson 2008), imperatorin 표준시료와 internal standard인 trolox를 이용하여 분석하였다. HPLC의 분석 결과, chlorogenic acid, hesperidine(1), naringine(2), luteoin(3), imperatorin(4)의 순으로 용출되었다(Fig. 4A). 금은화 엑기스 샘플에서 chlorogenic acid는 뚜렷하게 검출되었지만, 다른 항산화 물질은 정량할 수 있는 양이 검출

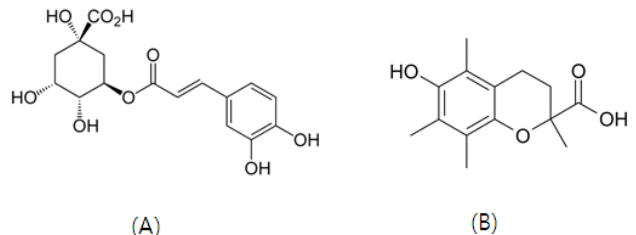


Fig. 3. Chemical structure of (A) chlorogenic acid (B) trolox (internal standard). Trolox was used as internal standard for HPLC analysis.

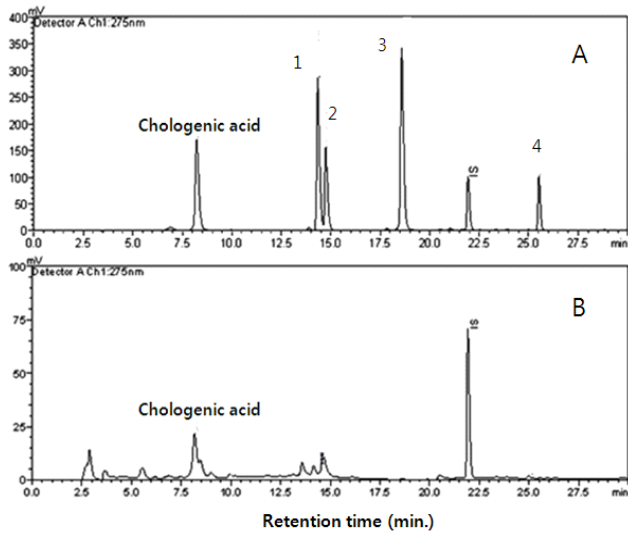


Fig. 4. HPLC chromatograms of extract of *Lonicera japonica* Thunb. (A) chromatogram of authentic standards. Numbers indicate hesperidine(1), naringin(2), luteolin(3), and imperatorin(4). (B) chromatogram of extract of *Lonicera japonica* Thunb. IS means an internal standard as trolox.

되지 않았다. Internal standard를 이용하여 측정된 결과 chlorogenic acid의 양은 $2.65 \mu\text{g/g}$ 이었다.

3. 총 페놀성 화합물 분석

금은화 추출물 및 추출 발효물의 총 페놀성 화합물 함량을 측정된 결과가 Fig. 5A와 같다. 총 페놀성 화합물은 gallic acid를 대표 지표물질로 하여 분석하였는데, 발효 전 금은화 열수 추출물에는 56.5 ± 4.9 GAE mg/g, 70% ethanol 추출물에는 72.7 ± 5.3 GAE mg/g의 총 페놀성 화합물이 있는 것으로 측정되었다. 발효 후 금은화 열수 추출 발효물에는 73.55 ± 3.4 GAE mg/g, ethanol 추출 발효물에는 82.0 ± 2.9 GAE mg/g의 총 페놀성 화합물이 측정되었다. 네가지 조건에서의 총 페놀성 화합물 함량을 비교해 보면, 열수 추출물이 56.5 ± 4.9 GAE mg/g로 가장 낮은 반면 ethanol 추출 발효물이 82.0 ± 2.9 GAE mg/g로 가장 높았다. 발효와는 상관없이 열수 추출물에 비해 70% ethanol 추출물의 총 페놀성 화합물 양이 28.7% 높은 것으로 분석되었다. Ethanol 추출물과 열수 추출 발효물의 페놀화합물 양은 유사한 수준이었다. 발효에 의해 열수 추출 발효물의 총 페놀양은 발효 전보다 30.2% 상승하였고, ethanol 추출 발효물은 발효 전보다 12.9% 증가된 것으로 분석되었다. 최근 보고된 발효에 의한 페놀화합물 분석에 대한 연구 결과를 보면, Kang *et al*(2011)은 구지뽕(*Cudrania tricuspidata*) 열매의 70% ethanol 추출물이 자연발효에 의해서 총 페놀양이 17.22% 증가하였고, *Bacillus* 균주 발효에 따라 35.7~45.37%로 증가했다고 보고하였다. Lee *et al*(2009)은 *Bacillus subtilis*

균주로 발효시킨 탈지대두 grits 발효물의 80% ethanol 추출물에서 총 페놀화합물이 발효전보다 3.8~4.8배 증가하는 것으로 보고하였다. 또한 Song *et al*(2011)은 유산균인 *L. brevis* LB-20에 의한 톳 발효액이 비발효액에 비해 페놀성 화합물이 증가하였다고 보고하였으며, Eom *et al*(2010)과 Bae & Kim (2010)도 미생물발효에 의한 다시마 추출액에서 페놀성 화합물의 함량증가를 보고하였는데, 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 페놀류의 항산화 능력은 구조적 특징에 의한 산화 환원력에 기인하고, 대부분의 페놀 성분들은 조직에 결합(bounded phenols)된 상태로 존재한다고 보고되었다(Hung *et al* 2009). 본 연구 결과에서 총 페놀성 화합물 함량이 발효 후에 현저히 증가된 것으로 분석되었는데, 이는 발효 전 세포벽 및 세포 구성물질에 결합되어 있던 페놀류 및 생리활성 물질들이 미생물의 발효작용에 의해 유리된 것으로 사료된다(Katina *et al* 2007).

4. 총 플라보노이드 함량

금은화 추출물의 발효 전후 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Fig. 5B와 같다. Hesperidine을 대표 지표물질로 총 플라보노이드의 정량분석이 수행되었다. 발효 전 총 플라보

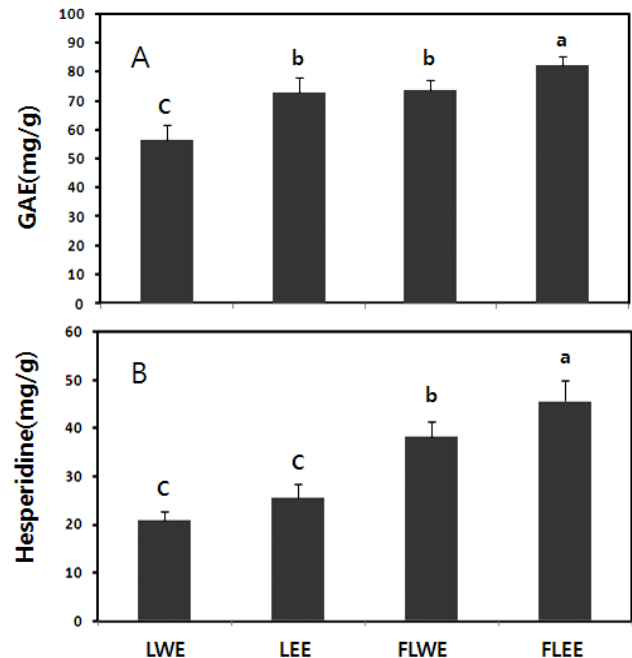


Fig. 5. Total phenolic contents and total flavonoid compounds of extracts from *Lonicera japonica* Thunb. before and after fermentation. LWE; *Lonicera japonica* Thunb water extract, LEE; *Lonicera japonica* Thunb 70% ethanol extract, FLWE; fermented *Lonicera japonica* Thunb water extract, and FLEE; fermented *Lonicera japonica* Thunb 70% ethanol extract. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

노이드 함량은 금은화 열수 추출물에서 20.93 ± 1.8 mg/g, 70% ethanol 추출물에서 25.57 ± 2.76 mg/g이었다. 열수 추출물 발효물의 총 플라보노이드 함량은 38.17 ± 3.18 mg/g으로 발효 전에 비해 82.3% 증가되었고, ethanol 추출물 발효액은 45.60 ± 4.2 mg/g로 발효 전에 비해 78.3% 증가되었다. 본 연구 결과에서 총 플라보노이드 함량 변화는 총 페놀 화합물과 마찬가지로 발효 후에 유의적으로 증가하였으며 모든 용매에서 발효 전에 비해 약 75% 이상 증가되었다. 플라보노이드는 플라본과 유사한 구조를 가지는 노란색의 색소로서 식물의 2차 대사산물이다(Spencer PE 2008). 플라보놀 및 플라바놀 같은 플라보노이드는 강한 항산화 기능을 가지고 있는데 일반적으로 *in vitro*에서는 비타민 C나 E보다 월등한 항산화 능력을 보여주는 것으로 알려져 있다(Bagchi *et al* 1999). 최근 보고된 발효물의 총 플라보노이드 분석 연구 결과를 보면, Kang *et al*(2011)은 구지뽕(*Cudrania tricuspidata*) 열매의 70% ethanol 추출물이 발효에 이용된 *Bacillus* 균주에 따라 발효 후 총 플라보노이드 함량이 12.3~25.97% 증가했다고 보고함으로써 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 발효에 의해 총 플라보노이드 함량이 증가하는 것은 페놀류와 마찬가지로 대부분의 플라보노이드 화합물들이 조직에 결합이 된 채로 존재하기 때문인 것으로 사료되어진다.

5. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능

금은화 열수 및 ethanol 추출물에 대한 DPPH 라디칼 소거능 및 총 항산화 활성 능력에 대한 측정 결과는 Fig. 6과 같다. Fig. 6A에서 보는 바와 같이 발효 전 금은화 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 47.97%, ethanol 추출물에서는 60.47%이었다. 발효 후에는 금은화 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 52.13%로 증가한 반면, ethanol 추출물은 57.93%로 다소 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었다. DPPH 라디칼은 생체 고분자들인 지질, 단백질 등과 결합하여 노화 및 질병을 유발하는 물질로 밝혀진 이래로 항산화 물질의 라디칼 소거능력 측정에 이용되고 있다(Pit-chumoni & Doraiswamy 1998). 본 연구에서 특이한 것은 페놀류 및 플라보노이드 함량이 발효 후 유의적으로 증가되었으나, DPPH 소거능에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 최근 유산균 발효를 이용한 발효 한약의 기능 분석 연구에서 DPPH 소거능이 발효 전 31.7%에서 발효 후 77%로 2배 이상 증가하는 것으로 분석되었고(Kang & Kim 2011), 톳(Song *et al* 2011)과 다시마 발효액(Eom *et al* 2010)에서 DPPH 소거능이 증가하는 것으로 보고되었다. 본 실험 결과와 비교해 볼 때 증가하는 경향은 유사하나, 배양 시 사용된 기질과 균주에 따라 특이성이 있는 것으로 사료된다.

ABTS는 식품의 항산화 효능을 측정하기 위해서 자주 사용하는 방법이다(Dejian *et al* 2005). ABTS는 sodium persulfate

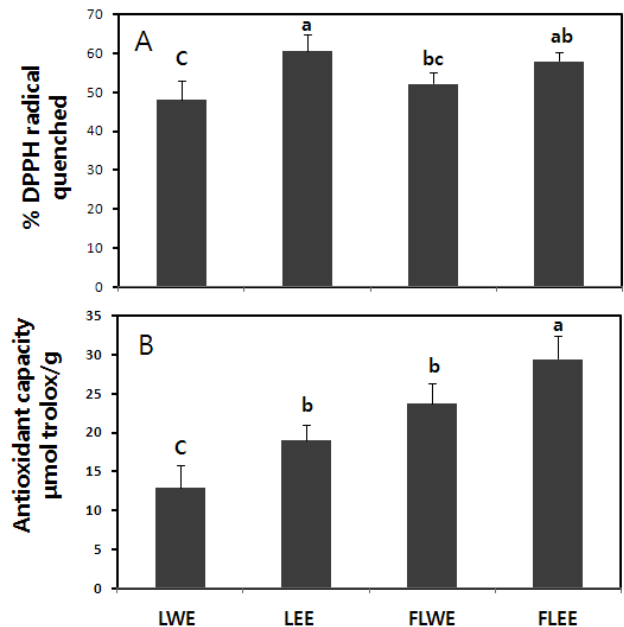


Fig. 6. DPPH scavenging capacity and total antioxidant activity of extracts from *Lonicera japonica* Thunb before and after fermentation. LWE; *Lonicera japonica* Thunb water extract, LEE; *Lonicera japonica* Thunb 70% ethanol extract, FLWE; fermented *Lonicera japonica* Thunb water extract, and FLEE; fermented *Lonicera japonica* Thunb 70% ethanol extract. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

과 반응하여 푸른색의 양이온 라디칼로 전환되며 734 nm에서 흡수된다(Roberta R 1999). 양이온 라디칼들은 항산화 물질들인 비타민 C, 티올, 페놀 화합물들과 반응하여 무색의 중성형태(neutral form)로 전환된다. 천연물의 항산화능 분석을 위한 ABTS는 수용성인 trolox와 비교하여 TEAC로 표기한다(Barclay *et al* 1985). Fig. 6B를 보면 추출용매의 종류에 따라 TEAC의 값이 발효 전후 유의적인 차이가 있었다. 발효 과정을 통하여 TEAC 값은 열수 추출물과 ethanol 추출물 모두 발효 후 약 50% 이상 증가하였다. 이러한 경향은 위의 결과와 마찬가지로 발효과정을 통하여 페놀류 등 TEAC 값에 영향을 미치는 물질들이 유리화되기 때문인 것으로 사료된다. 금은화 추출물이 ABTS에 미치는 영향에 대한 선행 연구는 미비한 실정이지만 최근 메탄올 추출물로부터 ABTS값이 $589.1 \mu\text{mol}/100 \text{g}$ 으로 보고되었다(Cai *et al* 2004). 이 연구 결과는 본 연구에서 분석된 결과보다 4~5배 정도 낮은 수준이었다.

요 약

최근에 합성 항산화제를 대체할 천연물에서 새로운 항산화 물질을 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 천연물 중

에 *Lonicera japonica* Thumb은 항균, 항염증, 항바이러스, 해독작용, 혈중 지질 감소, 해열작용 등 약리적인 효능뿐 아니라 다양한 항산화 물질을 포함하고 있는 것으로 보고되어 있다. 본 연구는 금은화 열수, 알코올 추출물을 기질로 전통발효식품에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* NHP1 균주로 발효과정을 진행한 후 항산화 물질 및 래디컬 소거능이 변화하는지를 관찰하기 위해 진행되었다. 전통 발효식품으로부터 발효를 위한 균주를 분리한 후 16S rDNA 염기서열을 비교하여 동정한 결과 *Lactobacillus plantarum* NHP1로 명명하였다. 발효를 위한 기질인 *Lonicera japonica* Thumb는 열수 및 70% ethanol을 이용하여 추출하였다. 열수 및 ethanol 추출물의 발효는 2 L 발효기에 1.2 L 추출물을 함유한 배지를 공급하고, 30℃ 및 100 rpm의 조건으로 48 시간 수행하였다. 발효 전 후의 총 페놀, 총 플라보노이드, DPPH 소거능 및 ABTS 변화를 측정된 결과, 발효 전 총 페놀양은 열수 추출물과 ethanol 추출물에서 56.5±4.9 GAE mg/g, 72.7±5.3 GAE mg/g이었고, 발효 후 각각 30.2%, 12.9% 증가되었다. 총 플라보노이드 함량은 모든 용매에서 발효 후에 유의적으로 약 75% 이상 증가되었다. 발효 후 총 페놀 함량과 플라보노이드 함량이 증가한 것에 비해 DPPH 소거능은 비례적으로 증가되지 않았으나, ABTS 항산화능은 발효에 의해 50% 증가되었다. 그동안 선행 연구에서 금은화의 용매 추출물에 대한 기능성 연구를 진행한 것이 대부분인 것에 비해, 본 연구 결과를 바탕으로 금은화 추출물에 발효기술을 접목한다면 항산화 기능 및 다른 기능성이 대폭 증가되어 기능성 건강식품 및 미용식품의 소재로의 사용이 활성화 될 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 일부 지원을 받아 수행한 연구임(2011-0014590).

문헌

- Bae HN, Kim YM (2010) Improvement of the functional qualities of sea tangle extract through fermentation by *Aspergillus oryzae*. *Korean J Fish Aquat Sci* 13: 12-17.
- Bagchi M, Milnes M, Williams C, Balmoori J, Ye X (1999) Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal injury in rats, and the protective ability of a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Nutr Res* 19: 8-16.
- Barclay LR, Locke SJ, MacNeil JM (1985) Autoxidation in micelles-synergism of vitamin-C with lipid-soluble vitamin-E and water-soluble trolox. *Can J Chem* 63: 366-374.
- Cai YZ, Luo Q, Sun M, Corke H (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 25: 2157-2184.
- Clifford MN (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates? nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agr* 79: 362-372.
- Clifford MN (2003) The analysis and characterization of chlorogenic acids and other cinnamates, In C. Santos-Buelga & G. Williamson (Eds.). *Methods in polyphenol analysis*. Cambridge. Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp 314-337.
- Clifford MN, Johnston KL, Knigh S, Kuhnert N (2003) Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *J Agric Food Chem* 51: 2900-2911.
- Craig WJ (1999) An introduction to free radical biochemistry. *Brit Med Bull* 49: 481-493.
- Dejian H, Ou B, Prior DL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53: 1841-1856.
- Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH (2002) Thermal processing enhances the nutritional values of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 3010-3014.
- Eom SH, Lee BJ, Kim YM. (2010) Effect of yeast fermentation on the antioxidant and antiinflammatory activity of sea tangle water extract. *Korean J Fish Aquat Sci* 43: 117-124.
- Han ZZ, Zhang HS, Kang SC, Gil KH, Kong KH, Kim DH, Ahn TH, Bae JS, Go HK, Han MK, Kim HS, Heo HS, Park EM, Song SW, Kim KH, Park CK, Lee HK (2008) A 90-day repeated-dose oral toxicity study on *Flos loniceræ* extract in Fischer 344/N rats. *Korean J Vet Res* 48: 401-411.
- Harman D (1992) Role of free radicals in aging and diseases. *Ann NY Acad Sci* 673: 126-132.
- Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y, Fujisawa S (2005) Kinetics of radical-scavenging activity of hesperidin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Res* 25: 3367-3374.
- Hubert J, Berger M, Nepveu F, Paul F, Dayde J (2008) Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chem* 109: 709-721.
- Hung PV, Maeda T, Miyatake K, Morita N (2009) Total phenolics compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. *Food Res Intl* 42: 185-190.
- Hwang SK, Hong JK, Jung KH, Jang BC, Shin JH, Hwang

- KS, Yoo SK (2008) Process optimization of dextran production by *Leuconostoc* sp. strain isolated from fermented Kimchi. *J Life Sci* 18: 1377-1383.
- Joo JS, Kim JS, Jeong JG, Kim BK (2010) Study of efficacy of *Foeniculi fructus* and *Lonicerae flos* extract on acute pancreatitis. *Kor J Herbology* 25: 39-45.
- Kang DH, Kim HS (2011) Functionality analysis of Korean medicine fermented by *Lactobacillus* strains. *Korean J Microbiol Biotechnol* 39: 259-265.
- Kang DH, Kim JW, Youn KS (2011) Antioxidant activities of extract from fermented mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. *Korean J Food Preserv* 18: 236-243.
- Katina K, Liukkonen KH, Kaukovirta-Norja A, Adlercreutz H, Heinonen SM, Lampi AM (2007) Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *J Cereal Sci* 46: 348-355.
- Kelley KW, Johnson RW (2008) Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proc Natl Acad Sci* 105: 7534-7539.
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR (2004) Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Sci Technol* 36: 333-338.
- Lee J, Jeong SI, Jang SI (2008) Effects of aqueous extract from *Lonicera japonica* flower on trimellitic anhydride-induced contact hypersensitivity in BALB/c mice. *Kor J Herbology* 23: 51-58.
- Lee SG, Kim HJ, Lee SP, Lee IS (2009) Antioxidant and anticancer activities of defatted soybean grits fermented by *Bacillus subtilis* NUC1. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 657-662.
- Liyana PCM, Shahidi F (2006) Importance of insoluble bound phenolics to antioxidants properties of wheat. *J Agric Food Chem* 54: 1256-1264.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Deemer EK, Prior RL, Huang D (2002) Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *J Agric Food Chem* 50: 2772-2777.
- Pitchumoni SS, Doraiswamy PM (1998) Current status of antioxidant therapy for alzheimers disease. *J Am Geriatr Soc* 46: 1566-1572.
- Roberta R (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 26: 1231-1237.
- Saleh ES, Hameed A (2008) Total phenolic contents and free radical scavenging of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chem* 114: 1271-1277.
- Schindler R, Mentlein R (2006) Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells. *J Nutr* 136: 1477-1482.
- Shahidi F (2000) Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung* 44: 158-163.
- Song HS, Kim HK, Min HO, Choi JD, Kim YM (2011) Changes of physicochemical and sensory properties of *Hizikia fusiformis* water extract by the fermentation of lactic acid bacteria. *Korean J Fish Aquat Sci* 44: 104-110.
- Spencer PE (2008) Flavonoids: modulators of brain function?. *British J Nutr* 99: 60-77.
- Thomson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Yoo JM, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR (2005) Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 333-338.

접 수: 2011년 11월 18일
 최종수정: 2012년 1월 16일
 채 택: 2012년 2월 23일