

누룩(*Rhizopus oryzae* KSD-815)으로부터 분리한 지질화합물의 세포독성 및 항염증 활성

곽호영 · 이상진^{1,2} · 이대영 · 배낙현² · 정낙훈 · 홍성렬² · 김계원¹ · 백남인*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ¹(주)국순당, ²성균관대학교 유전공학과

Cytotoxic and Anti-inflammatory Activities of Lipids from the Nuruk (*Rhizopus oryzae* KSD-815)

Ho-Young Kwak, Sang-Jin Lee^{1,2}, Dae-Young Lee, Lakoon-Jung, Nark-Hyun Bae², Sung-Youl Hong², Gye-Won Kim¹ and Nam-In Baek*

The Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

¹Research Laboratories, Kooksoondang Brewery Co. Ltd., Seongnam 462-120, Korea

²Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

Received April 21, 2008; Accepted June 16, 2008

Nuruk is the Korean traditional Koji that contains various microorganisms and has been used to make the traditional fermented foods including alcoholic beverages. *Rhizopus oryzae* KSD-815 was isolated from the alcohol-fermenting *Nuruk* used for manufacturing traditional alcohol. In this study, the authors reported the isolation and identification of four lipids from the *Nuruk* (*Rhizopus oryzae* KSD-815) that inoculated wheat with *Rhizopus oryzae* KSD-815. The dried and powdered *Nuruk* (*Rhizopus oryzae* KSD-815) were extracted three times at room temperature with 80% aqueous MeOH. The extracts were partitioned with EtOAc, *n*-BuOH, and water, successively. The EtOAc extract was suspended in 80% MeOH and partitioned repeatedly with *n*-hexane. From the *n*-hexane fraction, four lipids were isolated through the repeated silica gel and ODS column chromatographies. According to the results of physico-chemical data including NMR, GC and MS, the chemical structures of the compounds were determined as linolenic acid methyl ester (1), palmitic acid methyl ester (2), linoleic acid (3), palmitic acid (4). Cytotoxicity was evaluated in human breast cancer cells, MDA-MB-231 and human hepatocarcinoma, SK-HEP-1 cells using MTT assay. Exposure of compounds 1 and 3 led to a dose-dependent inhibition of cell viability in both cancer cell lines. In addition, treatment of RAW264.7 cells with compound 3 caused inhibition of lipopolysaccharide/interferon- γ -induced nitric oxide production.

Key words: anti-inflammation, cytotoxicity, linoleic acid, linolenic acid methyl ester, Nuruk, palmitic acid methyl ester, *Rhizopus oryzae*

서 론

누룩은 밀 또는 보리, 옥수수, 쌀, 귀리, 호밀과 같은 곡류에 누룩곰팡이를 접종시킨 후 수일 간 번식시킨 것으로, 술 제조 시 곡물을 발효시키는데 사용한다. 따라서 누룩은 보통 여러 가지 균이 많이 섞여 있지만, 저자 등이 사용한 누룩은 자체적으로 분리, 선발한 *Rhizopus oryzae* KSD-815라는 단일 균종만을 밀에 접종한 것으로 쌀을 발효하여 약주를 만들기 위하여 개발한 것이다. 밀에 *Rhizopus oryzae* KSD-815를 접종한 누룩(이하 누룩, *Rhizopus oryzae* KSD-815라고 함)의 경우 밀에 함유되

어 있던 다양한 이차대사산물이 *Rhizopus oryzae* KSD-815에 의해 분자수식을 받아 밀과는 다른 구조의 다양한 이차대사산물을 함유하게 된다. 따라서 이러한 시료에서 생물 변환 된 이차대사산물을 분리, 동정하는 일은 식물자원으로부터 새로운 기능성 소재를 탐색하고, 이를 이용한 건강기능성 제품이나 의약품 개발을 위한 기초연구로서 의의가 있다.

밀(*Triticum aestivum* L.)은 전세계 온대기후 각지에 분포하는 단자엽 한해살이 식물로, 세계적으로 가장 중요한 식량작물로 널리 재배되고 있다. 한방에서는 보허(補虛), 양기(養氣), 조오장(助五臟), 이대장(利大腸) 등의 효능이 있으며 허한 기를 보충해주고 오장의 활동을 도와주며 뭉친 피를 풀어주어 혈액순환을 좋게 한다고 알려져 있다.¹⁾ 지금까지 밀에서 분리 및 분석된 화합물로는 alkaloid(allantoin, biotin, gramine, vitamin B₁

*Corresponding author

Phone: +82-31-201-2661; Fax: +82-31-201-2157

E-mail: nibaek@khu.ac.kr

등), flavonoid(apigenin, quercetin, tricin 등), flavonoid 배당체 (orientin, schaftoside, isoschafatoside 등), phenylpropanoid (caffeic acid, ferulic acid, vanillic acid, cinnamic acid 등), terpenoid(citrinin, tocopherol 등), steroid (ergosterol, cholesterol, β -sitosterol 등)가 있으며,^{2,3)} 활성으로는 항산화활성, 항균활성 등이 보고되어 있다.⁴⁾

*Rhizopus oryzae*는 한국이나 일본, 중국 그리고 인도네시아 등에서 전통주를 만들 때 발효과정에서 주로 사용되는 균주로, 지금까지는 주로 lactic acid 생산에 관한 연구가 많이 보고되어 있다.⁵⁾ 또한 우리나라에서는 메주에서도 많이 발견되는 곰팡이로 이 균주를 조절하여 된장, 간장을 만들고 이들의 chitooligosaccharide 함량을 높이고자 하는 연구도 보고되어 있다.⁶⁾

본 연구에서는 누룩(*Rhizopus oryzae* KSD-815)으로부터 이차 대사산물을 분리동정하여 그 화합물에 대한 여러 가지 생리활성과 관련한 연구를 진행시킴으로써 누룩(*Rhizopus oryzae* KSD-815)의 기능성 식품 또는 의약품 개발 등과 같은 활용방안을 모색하고자 하였다. 그래서 누룩(*Rhizopus oryzae* KSD-815)으로부터 추출, 분획 및 column chromatography를 실시하여 4 종의 지질화합물을 분리하였고, NMR 및 GC/MS 등을 통하여 구조를 결정하였다. 또한 각 화합물에 대하여 인체암 세포에 대한 세포독성을 측정하였고, RAW264.7 세포를 이용한 항염증활성을 측정하였다.

재료 및 방법

누룩 *Rhizopus oryzae* KSD-815. 본 실험에서 사용한 누룩은 (주)국순당에서 제공한 것으로, 신우창 박사가(주) 국순당 연구소] 동정하였으며,⁷⁾ 표본시료(KHU-060425)는 경희대학교 천연물화학실험실에 보관 되어 있다.

시약 및 기기. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(Merck, Darmstadt, Germany)을 octadecyl silica(ODS) gel은 LiChroprep RP-18(Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. Thin layer chromatography(이하 TLC라고 함)는 Kieselgel 60 F254와 RP-18 F254S를 사용하였고, 실험에 이용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. NMR 스펙트럼은 Varian Inova AS 400(Varian, California, USA)으로 측정하였고, GC는 GC-14B(Shimadzu, Tokyo, Japan)로, GC/MS는 JMS-700(JEOL, Tokyo, Japan)으로 측정하였으며, UV lamp는 Spectroline(Model ENF-240 C/F, Spectronics Corporation, New York, USA)을 사용하였다. 세포독성과 nitrite는 ELISA microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA. USA)를 이용하여 측정하였다.

Lipopolysaccharide(LPS), aminoguanidine(AG), interferon- γ (IFN- γ), MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), sulfanilamide, naphylethylenediamine, sodium nitrite (NaNO_2)를 포함한 모든 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였고, 세포주 배양을 위한 RPMI1640 medium, fetal bovine serum(FBS) 및 penicillin-streptomycin은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

활성물질의 분리. 누룩(*Rhizopus oryzae* KSD-815) 8 kg(건물 중)에 80% MeOH 용액(45 l×3)을 가하여 실온에서 하룻밤 추출한 후 여과지로 여과하였다. 얻어진 여액을 45°C에서 감압농축하여 농축물 1.2 kg을 얻었고, 이 농축물을 물(4 l)과 ethyl acetate(EtOAc, 4 l×3)로 분배 추출하였으며, EtOAc층은 감압농축한 후 *n*-hexane(4 l)과 80% MeOH 용액(4 l)으로 다시 분배 추출하였다. 위의 물층은 *n*-butanol(*n*-BuOH, 4 l×3)로 분배 추출하였으며, 각 층을 감압농축하여 *n*-hexane 분획(TAHe, 135 g), EtOAc 분획(TAE, 92 g), *n*-BuOH 분획(TAB, 114 g) 및 물 분획(TAW, 855 g)을 얻었다.

n-Hexane 분획(TAHe, 130 g)에 대하여 silica gel column chromatography(c.c.) (*n*-hexane:EtOAc=10:1 → 7:1 → 5:1 → 3:1 → 1:1, φ9×20 cm)를 실시하여 16개의 분획물(TAHe1~TAHe16)을 얻었다. 이 중에서 분획 TAHe2(5 g)에 대하여 ODS c.c.(acetonitrile: H_2O =6:1, φ5×10 cm)를 실시하여 화합물 1(TAHe2-4, 55 mg)과 화합물 2(TAHe2-11, 34 mg)를 분리하였다. 또한 분획 TAHe4(3 g)에 대하여 ODS c.c.(acetonitrile: H_2O =3:1, φ4.5×10 cm)를 실시하여 화합물 3(TAHe4-6, 65 mg)와 화합물 4(TAHe4-10, 88 mg)를 분리하였다.

화합물 1(linolenic acid methyl ester): Yellow oil, EI/MS *m/z*: 292 [M]⁺; ¹H-NMR(400MHz, CDCl_3 , δ_{H}): 5.21(6H, m, olefine-H), 3.63(3H, s, OCH_3), 2.80(2H, dd, J =6.4 Hz), 2.78(2H, dd, J =6.6, 6.4 Hz), 2.30(2H, t, J =8.4 Hz), 2.07(2H, m), 2.03(2H, dt, J =6.6, 6.7 Hz), 1.41(2H, m), 1.36(2H, m), 1.30(2H, m), 1.29(2H, m), 1.27(2H, m, methylene), 0.94(3H, t, J =7.8 Hz, terminal methyl); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}): 174.9(ester), 131.6, 130.6, 128.7, 128.6, 127.2, 126.4(olefine-C), 51.5(OCH_3), 34.9, 29.5, 29.4, 29.3, 27.4, 25.6, 25.5, 24.9, 20.7(methylene), 14.4(terminal methyl).

화합물 2(palmitic acid methyl ester): colorless oil, EI/MS *m/z*: 270 [M]⁺; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl_3 , δ_{H}): 3.63(3H, s, OCH_3), 2.26(2H, t, J =10.0 Hz), 1.98~1.22 [28H, (CH_2)_n, m], 0.84(3H, t, J =7.6 Hz, terminal methyl); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}): 170.5(ester), 51.5(OCH_3), 34.7, 34.1, 29.6, 29.5, 29.3(×3), 27.7(×2), 26.63, 26.01, 25.4, 25.5, 23.4(methylene), 14.1(terminal methyl).

화합물 3(linoleic acid): colorless oil, EI/MS *m/z*: 280 [M]⁺; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl_3 , δ_{H}): 5.40(4H, m, olefine-H), 2.63(2H, dd, J =6.6, 6.4 Hz), 2.30(2H, t, J =8.4 Hz), 2.18(2H, m), 2.14(2H, dt, J =6.6, 6.7 Hz), 1.52~1.27 [16H, (CH_2)_n, m], 0.90(3H, t, J =7.8 Hz, terminal methyl); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}): 178.4(carbonyl-C), 130.3(×2), 127.3(×2, olefine-carbon), 34.0, 31.9, 29.9, 29.7, 29.6, 29.4, 29.0, 27.8(×2), 25.6, 24.7, 22.8(methylene), 14.1(terminal methyl).

화합물 4(palmitic acid): white powder, EI/MS *m/z*: 256 [M]⁺; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl_3 , δ_{H}): 2.30(2H, t, J =10.0 Hz), 1.52~1.26 [12H, (CH_2)_n, m], 0.88(3H, t, J =7.6 Hz, terminal methyl); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}): 178.4(carbonyl-C), 34.0, 31.9, 29.6(×7), 29.3(×2), 29.0, 24.7, 22.7(methylene), 14.1(terminal methyl).

지방산의 GC/MS 분석. 시료 TAHe2-4(1, 1 mg/1 mL, CHCl₃), TAHe2-11(2, 1 mg/1 mL, CHCl₃), TAHe4-6(3, 1 mg/1 mL, CHCl₃) 및 TAHe4-10(4, 1 mg/1 mL, CHCl₃)로부터 각 3 μL를 취하여, FID가 설치된 GC(GC-14B, Shimadzu, Tokyo, Japan)의 주입구에 넣고, 털착시켜 분석하였다. 분석용 컬럼은 DB-5(30 m × 0.32 mm ID × 0.25 μm, J & W, Folsom, California, USA)를 사용하였으며, GC의 injector 온도는 300°C, oven 온도는 처음 3분 동안 150°C로 유지하였고, 분당 승온 속도를 7°C로 하여 최종온도가 300°C가 되도록 한 후 5분간 300°C를 유지하도록 하였다. 분석한 화합물 1, 2, 3 및 4의 retention time(min)은 각각 10.84, 9.72, 11.49, 및 9.34로 나타났다. 분석한 화합물을 동정하기 위하여, GC(Agilent technologies, California, USA)와 연결된 massspectrometer(JMS-700, JEOL, Tokyo, Japan)를 사용하였고, 분석용으로 사용한 컬럼(HP-5, 30 m × 0.32 mm ID × 0.25 μm, USA) 이외의 모든 분석 조건은 GC 조건과 동일하였다. GC/MS로 분석한 각 peak의 최종 확인은 library (Wiley GC±MS Library) 분석을 바탕으로 확인하였다.

세포배양. 지방산의 세포독성을 측정하기 위한 암세포주는 모두 인체 기원의 암세포주들로, 유방암세포주인 MDA-MB-231, 간암세포주인 SK-HEP-1을 사용하였다. 항염증 활성을 평가하기 위하여 대식세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW264.7 세포를 사용하였다. 모든 세포주 배양에는 RPMI1640 medium을 사용하였으며 10% FBS와 100 unit/mL의 penicillin, 100 units/mL의 streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 적응시켜 배양하였다.

세포독성 측정. 지방산의 세포독성 효과를 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다.⁸⁾ 각 세포주를 2 × 10⁴ cells/well로 맞추고, 96-well plate에 200 μL씩 첨가하여 24시간동안 37°C에서 배양하여 세포를 부착하였다. 각각의 지방산을 10, 20, 30, 40, 50 μg/mL 농도로 첨가하여 24시간 동안 배양한 후, 5 mg/mL MTT solution을 첨가하고 4시간 동안 반응시켰다. MTT 용액을 제거하고 100 μL DMSO와 20 μL Soren's 용액[0.1 M glycine, 0.1 M NaCl, pH 10.2]를 첨가한 후, ELISA microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포의 시료 무첨가군을 100%로 하여 상대적인 세포 독성을 평가하였다.

Nitric oxide(NO) 생성 억제 측정. RAW264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 RPMI1640 배지를 이용하여 1 × 10⁵ cells/mL로 조절하여 24-well plate에 분주하여 12~18시간 배양을 하였다. 각 지방산과 LPS(1 μg/mL)과 IFN-γ(10 U/mL)을 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess reagent 방법으로 측정하였다.⁹⁾ NO는 Griess 시약 [1% sulfanilamide, 0.1% naphylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 세포 배양 상등액 100 μL와 Griess 시약 100 μL를 혼합하여 96-well plate에서 5분간 반응시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양 상등액의 NO를 정량하기 위하여 sodium nitrite를 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

결과 및 고찰

누룩 건조한 것을 MeOH용액으로 추출하였고, 추출물을 *n*-

hexane, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O로 분배추출하여 분획하였다. 얻어진 4개 분획(TAHe, TAE, TAB, TAW)에 대하여 세포독성 및 항염증 활성을 검색한 결과 TAHe 분획에서 유의한 활성(Data not shown)이 확인되었다. 따라서 TAHe 분획에 대하여 silica gel과 ODS column chromatography를 반복하여 4종의 지질화합물을 분리하였다.

화합물 1(Yellow oil)은 TLC에 전개시켜 관찰한 결과 UV 흡수가 없고, 10% 황산을 분무, 건조 한 후 발색한 결과 연한 갈색으로 발색되었다. ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) spectrum에서 δ_H 5.21(6H, m)의 signal로부터 6개의 olefine methine proton이 존재함을 확인하였고, δ_H 3.64(3H, s)의 signal로부터 methoxy의 존재를 확인하였다. δ_H 2.80(2H, dd, *J*=6.4 Hz), δ_H 2.78(2H, dd, *J*=6.6, 6.4 Hz), δ_H 2.30(2H, t, *J*=8.4 Hz), δ_H 2.07(2H, m) 및 δ_H 2.03(2H, dt, *J*=6.6, 6.7 Hz)의 signal로부터 allyl 위치의 methylene이 관측되었으며, δ_H 1.41~1.27 사이에서 다수의 methylene proton signal과 δ_H 0.98(3H, t, *J*=7.8 Hz)에서 triplet의 말단 methyl proton signal이 관측되었다. 따라서 이 화합물은 세 쌍의 이중결합을 갖고 있는 aliphatic chain 형태의 화합물로 판단되었다. ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) spectrum에서 19개의 탄소 signal이 관측되었다. δ_C 174.9에서 ester-carbon signal과, δ_C 131.6, 130.6, 128.7, 128.6, 127.2, 126.4에서 6개의 olefine methine carbon signal 그리고 δ_C 51.5에서 methoxy signal이 관측되었다. δ_C 34.9~20.7 사이에서 methylene signal과 δ_C 14.4에서 terminal methyl signal이 확인되었다. 따라서 화합물 1은 octadecatrienoic acid methyl ester로 구조를 규명하였다. 또한 GC/MS를 이용하여 분석한 결과 10분 84초에서 단일 peak가 관측되었으며, 이 화합물의 EI/MS spectrum에서 M⁺ 이온 peak가 *m/z* 292에서 관측되었다. 이 결과를 토대로 Wiley library를 사용하여 검색한 결과 화합물 1을 linolenic acid methyl ester로 동정하였다.¹⁰⁾

화합물 2(colorless oil)은 TLC에 전개시켜 관찰한 결과 UV 흡수가 없고, 10% 황산을 분무, 건조 한 후 발색한 결과 연한 갈색으로 발색되었다. ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) spectrum에서 δ_H 3.63(3H, s)에서 methoxy proton signal이 관측되었고, δ_H 2.26(2H, t, *J*=10.0 Hz)에서 allyl methylene proton signal과 δ_H 1.22~1.98 사이에서 다수의 methylene proton signal이 관측되었다. 또한 δ_H 0.84(3H, t, *J*=7.6 Hz)에서 terminal methyl proton signal이 관측되어 지방산 화합물로 추측 되었다. ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) spectrum에서 17개의 탄소 signal이 관측되었고, δ_C 170.5에서 ester-carbon signal과 δ_C 51.5에서 methoxy signal이 관측되었다. δ_C 34.7과 δ_C 23.4 사이에서 14개의 methylene carbon signal과 δ_C 14.1에서 terminal methyl carbon signal이 확인되었다. 따라서 정확한 구조 동정을 위하여 GC/MS를 이용하여 분석한 결과 9분 72초에서 단일 peak가 관측되었으며, 이 화합물의 EI/MS spectrum에서 M⁺ 이온 peak가 *m/z* 270에서 관측되어 270으로 결정 하였고, 이것을 Wiley library를 사용하여 비교해본 결과 palmitic acid methyl ester와 일치 하였다.

화합물 3(colorless oil)은 TLC에 전개시켜 관찰한 결과 UV 흡수가 없고, 10% 황산을 분무, 건조 한 후 발색한 결과 연한

갈색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) spectrum에서 δ_{H} 5.40(4H, m)의 signal로부터 olefine methine proton 4개가 존재함을 확인하였고, δ_{H} 2.63(2H, dd, $J=6.6, 6.4 \text{ Hz}$), δ_{H} 2.30(2H, t, $J=8.4 \text{ Hz}$), δ_{H} 2.18(2H, m) 및 δ_{H} 2.14(2H, dt, $J=6.6, 6.7 \text{ Hz}$)의 signal로부터 allyl 위치의 4개의 methylene δ 관측되었으며, δ_{H} 1.52~1.27 사이에서 다수의 methylene proton signal과 δ_{H} 0.90(3H, t, $J=7.8 \text{ Hz}$)에서 triplet의 말단 methyl proton signal이 관측되었다. 따라서 이 화합물은 두 쌍의 이중 결합을 갖고 있는 aliphatic chain 형태의 화합물로 판단되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) spectrum에서 18개의 탄소 signal이 관측되었다. δ_{C} 178.4에서 este-carbon signal과, δ_{C} 130.3, 127.3에서 각각 2개, 즉 4개의 olefine methine carbon signal이 관측되었고 δ_{C} 34.0~22.8 사이에서 methylene carbon signal과 δ_{C} 14.1에서 terminal methyl carbon signal이 확인되었다. 또한 GC/MS를 이용하여 분석한 결과 11분 49초에서 단일 peak가 관측되었으며, 이 화합물의 EI/MS spectrum에서 M^+ 이온 peak가 m/z 280에서 관측되었다. 이 결과를 토대로 Wiley library를 사용하여 검색한 결과 화합물 3을 linoleic acid로 동정하였다.

화합물 4(white powder)는 TLC에 전개시켜 관찰한 결과 UV 흡수가 없고, 10% 황산을 분무, 건조 한 후 발색한 결과 연한 갈색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) spectrum에서 δ_{H} 2.30(2H, t, $J=10.0 \text{ Hz}$)에서 allyl methylene proton signal과 δ_{H} 1.52~1.26 사이에서 다수의 methylene proton signal이 관측되었다. 또한 δ_{H} 0.88(3H, t, $J=7.6 \text{ Hz}$)에서 terminal methyl proton signal이 관측되어 지방산 화합물로 추측되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) spectrum에서 16개의 탄소 signal이 관측되었고, δ_{C} 178.4에서 carbonyl-carbon signal과 δ_{C} 34.0과 δ_{C} 22.7 사이에서 14개의 methylene carbon signal과 δ_{C} 14.1에서 terminal methyl carbon signal이 확인되었다. GC/MS로 분석한 결과 9분 34초에서 단일 peak가 관측되었다. 이 화합물의 EI/MS spectrum에서 M^+ 이온 peak가 m/z 256에서 관측되었으며, Wiley library를 사용하여 비교해본 결과 palmitic acid와 일치하였다.

세포독성 효과. 누룩 유래 지방산 화합물의 암세포에 대한 세포독성을 규명하기 위해 인체 유래 유방암(MDA-MB-231)과 간암(SK-HEP-1)의 세포 생존율을 MTT 방법을 이용하여 평가하였다. 화합물 1(linolenic acid methyl ester)과 화합물 3(linoleic acid)에서 두 가지 암 세포주에 농도의존적인 세포독성 효과를 확인하였다(Fig. 1). MDA-MB-231 세포에 대한 화합물 1(linolenic acid methyl ester)과 화합물 3(linoleic acid)은 50 μM 농도에서 각각 49%와 43%의 세포독성을 나타냈다(Fig. 1A). MDA-MB-231의 전이능력과 estrogen receptor 발현의 차이가 있는 MCF-7 세포주에 대한 세포독성 결과,¹¹⁾ 누룩 유래 지방산 화합물은 MCF-7에 대한 세포 독성 효과가 없었다(Data not shown). 간암 세포주인 SK-HEP-1에 대한 화합물 1(linolenic acid methyl ester)과 화합물 3(linoleic acid)은 50 μM 농도에서 각각 47%와 38%의 세포독성을 유도하였다(Fig. 1B). 또한 같은 농도에서 화합물 1(linolenic acid methyl ester)과 화합물 3(linoleic acid)은 인체 유래 melanoma 세포주인

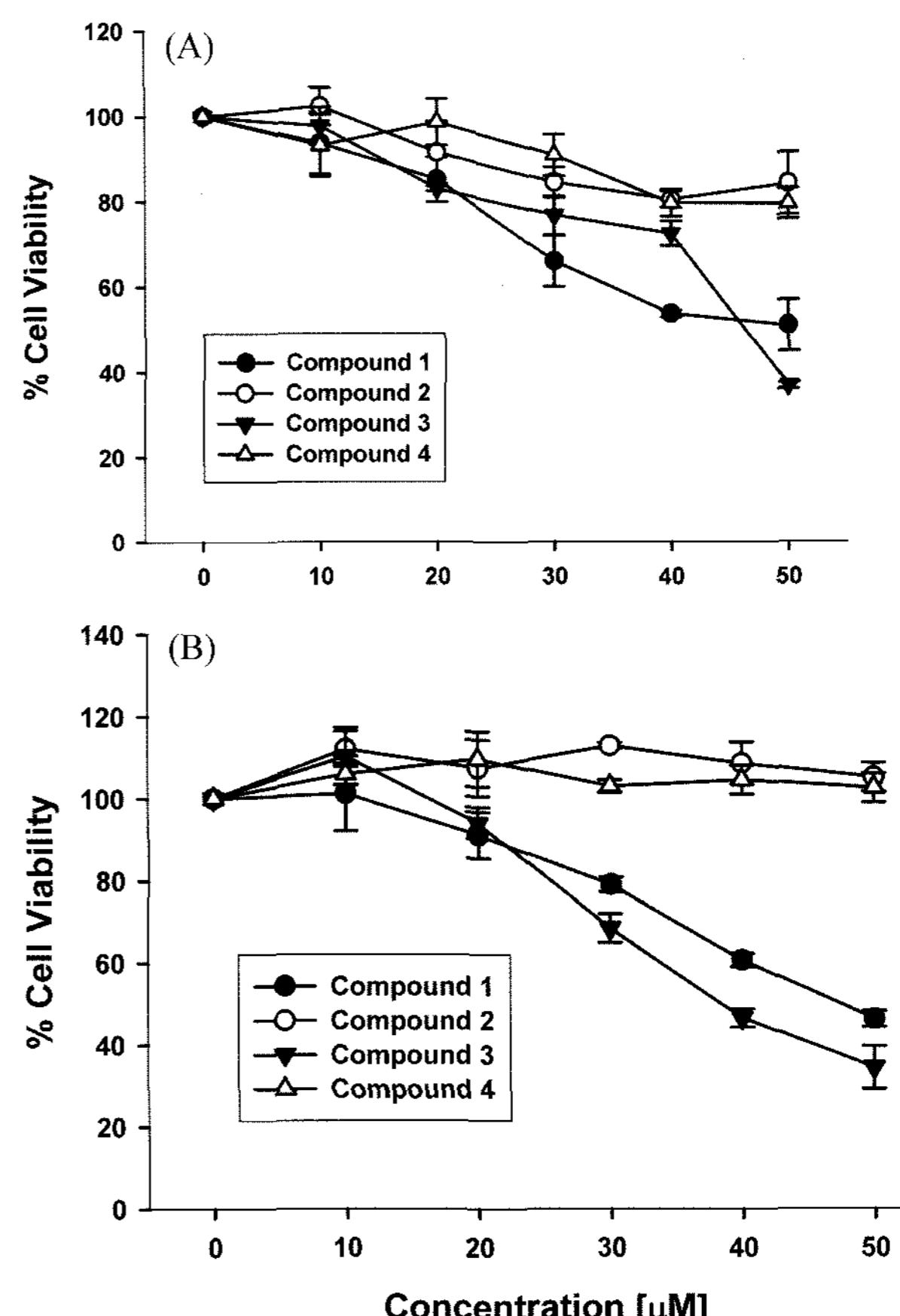


Fig. 1. Inhibitory effects of compounds from Nuruk on cancer cell cytotoxicity. MDA-MB-231 and SK-HEP-1 cells (2×10^4 cells/well) were incubated with the indicated doses of compounds purified from Nuruk for 24 hr and treated with MTT solution for 4 hr. The extent of the reduction of MTT to formazan within cells was quantitated by the measurement of absorbance at 540 nm. A) Human breast cancer cells, MDA-MB-231, B) Human hepatocarcinoma, SK-HEP-1.

A2058에서 55~80%의 세포 독성 효과를 관찰하였다(Data not shown).

화합물 1-4는 모두 사슬형 지방산이지만, 세포독성을 보인 화합물 1과 3은 cis-배치의 이중결합을 2개 혹은 3개를 가짐으로 하여, 반응성이 화합물 2 와 4에 비하여 상대적으로 높고, 입체적 모양도 일직선이 아니라 구부러진 모양으로 활성을 나타내는 요인이 되는 것으로 추측되었다. 현재까지 ω -3 또는 ω -6 불포화지방산은 암세포의 이동성과 전이, 혈관생성, 신호전달체계 등을 조절하는 역할이 있다고 보고되어 있으며,^{12,13)} 불포화지방산의 합성은 fatty acid synthase(FAS) 등 lipogenic enzyme를 억제하여 암 세포의 사멸을 유도한다고 보고되었다.^{14,15)} 불포화지방산인 화합물 1(linolenic acid methyl ester)과 화합물 3(linoleic acid)도 신호전달체계 및 lipogenic enzyme 조절 등을 통하여 암 세포의 생육을 조절하는 것으로 사료된다.

Nitric oxide 억제 효과. Nitric oxide(NO)는 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되며 여러 가지 생리학적 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{16,17)} LPS나 cytokine에 의해 발현된 inducible NOS(iNOS)는 많은 양의 NO를 calcium 비의존적으로 생성하여 염증반응, 종양 발생 등

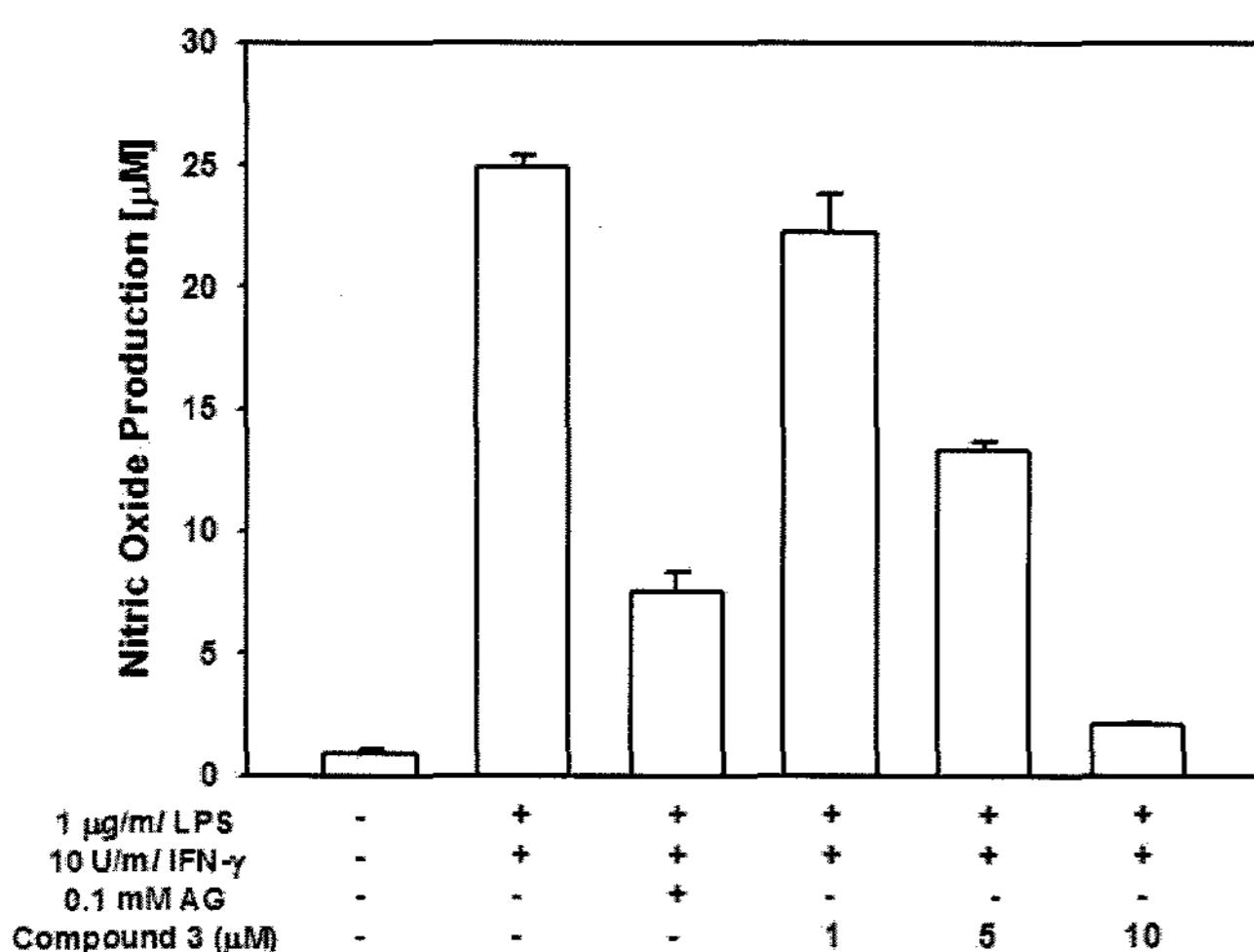


Fig. 2. Inhibitory effect of compound 3 on the production of nitric oxide in RAW264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed from culture medium of RAW264.7 cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and IFN- γ (10 U/mL) in the presence of compound 3. RAW264.7 cells were plated at a density of 2×10^5 cells/mL. Nitrite accumulation was measured by Griess reaction in culture medium. The values are the means \pm S.D. of three independent experiments.

에 관여하는 것으로 보고 되었다.¹⁸⁾ 염증 유발에 중요한 역할을 하는 NO생성에 대한 누룩 유래 지방산 화합물의 효과를 평가하였다. 생성된 NO는 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태를 측정하였다. 그 결과, 화합물 3(linoleic acid)에서 농도의존적인 염증 저해 활성을 확인하였다 (Fig. 2). 특히, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 세포독성 효과도 보이지 않으면서 NO 생성 억제 활성을 확인하였다. 하지만 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도는 RAW264.7의 세포독성 유발로 인한 효과로 판단된다(data not shown). 다른 지방산 화합물에서는 NO 생성 억제 효과가 없는 것으로 확인하였다.

초 록

Rhizopus oryzae KSD-815를 밀에 접종하여 만든 누룩 (*Rhizopus oryzae* KSD-815)에서 4종의 지질 화합물을 분리하여 화학구조를 동정하였다. 건조된 누룩을 실온에서 80% MeOH 수용액으로 추출하고 이 추출물을 EtOAc 분획, n-BuOH 분획, H₂O 분획으로 나누었다. EtOAc 분획은 다시 80% MeOH 과 n-hexane 으로 분획하였다. n-Hexane 분획에 대해 silica gel 및 ODS column chromatography를 반복 실시하여 4종의 지질 화합물을 분리, 정제하였다. NMR, IR, GC/MS 등을 통하여 화합물 1(linolenic acid methyl ester), 화합물 2(palmitic acid methyl ester), 화합물 3(linoleic acid), 화합물 4(palmitic acid)의 구조를 결정하였다. 이 지방산 화합물의 세포독성을 평가하기 위해 인체 유래 유방암(MDA-MB-231)과 간암(SK-HEP-1) 세포주에 대해 MTT assay를 수행하였다. 두 암 세포주에서 화합물 1(linolenic acid methyl ester)과 화합물 3(linoleic acid)은 농도의존적인 세포독성을 확인하였다. 또 염증반응 매개체의 일종인 nitric oxide(NO)의 생성 억제 활성을 Griess 방법으로 평

가한 결과, 화합물 3(linoleic acid)은 LPS와 IFN- γ 에 의해 유도된 NO 생성도 저해하는 것을 RAW264.7 세포에서 확인하였다.

Key words: *Rhizopus oryzae*, 누룩, linoleic acid, linolenic acid methyl ester, palmitic acid methyl ester, 세포독성, 항염증

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(506008-03-2-CG000)이 지원하는 ‘한국 전통누룩 및 전통주의 생리기능활성 탐색 연구 및 이를 이용한 웰빙 식품 개발’ 연구결과의 일부로서 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Vaaler, S., Hanssen, K. F., Dahl-Jorgensen, K., Frolich, W., Aaseth, J., Odegaard, B. and Aagenaes, O. (1986) Diabetic control is improved by guar gum and wheat bran supplementation. *Diabet. Med.* **3**, 230-233.
- Raoul, R., Nike, L. R. M., Geraldine, P., Patrice, C., Dominique, L. D., Nathalie, M. D., Marc, M. and Joelle, Q. L. (2003) Phytosterol analysis and characterization in spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) and wheat (*T. aestivum* L.) lipids by LC/APCI-MS. *J. Cereal Sci.* **38**, 189-197.
- Wu, H., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D. and An, M. (1999) Simultaneous determination of phenolic acids and 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one in wheat (*Triticum aestivum* L.) by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **864**(2), 315-321.
- Lankisch, M., Layer, P., Rizza, R. A. and DiMagno, E. P. (1998) Acute postprandial gastrointestinal and metabolic effects of wheat amylase inhibitor in normal, obesa, and diabetic humans. *Pancreas*. **17**, 176-181.
- Spiricheva, O. V., Sen'ko, O. V., Veremeenko, D. V. and Efremenko, E. N. (2007) Lactic acid production by immobilized cells of the fungus *Rhizopus oryzae* with simultaneous product extraction. *Theor. Found. Chem. Eng.* **41**, 150-153.
- Eum, B. W., Kwak, B. Y., Kim, S. Y., Shon, D. W. and Lee, K. H. (2003) Enhancement of Chitooligosaccharides in Doenjang (Soybean Paste) and Kanjang (Soy Sauce) using *Bacillus subtilis* Koji and *Rhizopus oryzae* Koji. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 291-296.
- Kim G. W., Shin W. C., Oh Y. H. and Won Y. M. (2001) Novel *Rhizopus* sp. KSD-815 producing glucoamylase with high activity, Republic of Korea Patent 10-0781053-0000.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. **65**, 55-63.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]-nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.
- Kim, D. H., Song, M. J., Han, K. M., Bang, M. H., Kwon, B. M., Kim, S. H., Kim, D. K., Chung, I. J., Park, M. H. and Baek, N. I. (2004) Development of biologically active

- compounds from edible plant sources-X. Isolation of lipids from the flower of *Campsis grandiflora* K. Schum. and their inhibitory effect on FPTase. *J. Korea Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 357-360.
11. Menendez, J. A., Mehmi, I., Atlas, E., Colomer, R. and Lupu, R. (2004) Novel singaling molecules implicated in tumor-associated fatty acid synthase-dependent breast cancer cell proliferation and survival: Role of exogenous dietary fatty acids, p53-p21^{WAF1/CIP1}, ERK1/2 MAPK, p27^{KIP1}, BRCA1, and NF-κB. *Inter. J. Oncol.* **24**, 591-608.
12. Horrobin, D. F. (1994) Unsaturated lipids and cancer. In: New approaches to cancer treatment. Horrobin DF (ed). Wiley-Liss. New York. pp. 1-29.
13. Jiang, W. G., Bryce, R. P. and Horrobin, D. F. (1998) Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **27**, 179-209.
14. Clark, B. A., Armstrong, M. K. and Jump, D. B. (1990) Nutritional control of rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA abundance. *J. Nutr.* **120**, 218-224.
15. Menendez, J. A., Ropero, S., Mehmi, I., Atlas, E., Colomer, R. and Lupu, R. (2004) Over expression and hyperactivity of breast cnacer-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) is insensitive to normal arachidonic fatty acid-induced suppression in lipogenic tissues but it is selectively inhibited by tumorcidal α-linolenic and γ-linolenic fatty acids: A novel mechanism by which dietary fat can alter mammary tumorigenesis. *Inter. J. Oncol.* **24**, 1369-1383.
16. Miyasaka, N. and Hirata, Y. (1997) Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci.* **61**, 2073-2081.
17. Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.
18. Nathan, C. and Xie, Q. W. (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell.* **78**, 915-918.