

2단 발효에 의한 발효마의 생리활성

전춘표¹ · 이준걸¹ · 이종복² · 박세철¹ · 최충식³ · 김장억⁴ · 권기석^{5*}

¹안동과학대학교 의약품질분석과, ²건동대학교, ³(주)한스바이오,
⁴경북대학교 응용생명과학부, ⁵안동대학교 생명자원과학부

Biological Activities of Fermented *Dioscorea batatas* Dence by two Stage Fermentation

Chun-Pyo Jeon¹, Joon-Geol Lee¹, Jung-Bok Lee², Se-Cheol Park¹, Chung-Sig Choi³,
Jang-Eok Kim⁴, and Gi-Seok Kwon^{5*}

¹Dept. of Medicine Quality Analysis, Andong Science College, Andong 760-709, Republic of Korea

²Dept. of Optometry, Kundong University, Andong 760-833, Republic of Korea

³Bio Industry Institute, HansBio Co., Ltd., Yeongyang 764-803, Republic of Korea

⁴School of Applied Bioscience, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Republic of Korea

⁵School of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Republic of Korea

(Received February 21, 2012 / Accepted March 19, 2012)

This study was conducted to investigate antioxidative and physiological activities of two stage fermented Chinese Yam (TSFCY) by *Monascus* sp. MK2 and *Lactobacillus brevis* HLJ59. The extracts from TSFCY were measured to examine pigments, monacolin K contents, total polyphenol and flavonoid contents, DPPH radical scavenging activity, reducing power, ACE inhibitory activity and GABA contents. In this study, the results show that *Monascus* sp. MK2 and *Lactobacillus brevis* HLJ59, with *Dioscorea batatas* Dence. As the substrate can produce pigments (yellow, orange and red), monacolin K contents, total polyphenol and flavonoid contents, DPPH radical scavenging activity, reducing power, ACE inhibitory activity, and GABA contents at 14.03 (yellow), 13.88 (orange), 15.71 (red), 487.9 (MK, mg/kg), 723.8 (TP, mg/kg), 326.4 (TF, mg/kg), 81.7 (DPPH, %), and 1.5 (RP, O.D), respectively. In addition, the showed ACE inhibitory activity and GABA contents was 86.9% and 977.4 mg/kg in EtOH extract, respectively.

Keywords: anti-oxidant activity, biological activities, fermented Chinese Yam, GABA

마(*Dioscorea* sp.)는 백합목 마과식물(*Dioscoreaceae*)로 현재 10속 650여 종이 알려져 있으며 다년생 덩굴성 초본으로 전세계의 열대 및 아열대지방에서 널리 분포하는 식량 작물로서(Pursegolve, 1972), 우리나라의 전체 생산량 중 약 70% 정도가 경북 북부지역에서 생산되고 있고, 한방에서는 자양, 강장, 폐결핵 등에 유효하고 소염, 해독, 진해, 거담, 이뇨, 신경통, 류마티즘에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Jung, 2007). 마(*Dioscorea batatas* Dence)의 주요 성분으로는 전분이 생체중의 8-24%, 점질물이 0.6-2.4%를 차지하며, 약용성분으로는 amylose, cholin, saponin, mucin 등이 포함되어 있다(Kim *et al.*, 1991). 한편 마의 주요 약용성분으로 알려진 steroidal saponin은 항암 및 항염증 작용(Baek *et al.*, 1991, 1994), 세포의 DNA 돌연변이를 방지하는 항

돌연변이성 작용 등 다양한 생리활성에 관여하는 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 1995). 마의 기능성에 관한 연구로 마 점질물이 중금속 제거능과 Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 저해 효과를 나타낸다는 보고(Ha *et al.*, 1998)와, 콜레스테롤 저하효과, 지질 분해효소 저해활성 및 항 돌연변이 활성 등이 보고되어 있다(Kwon *et al.*, 1999, 2003; Lee *et al.*, 2006). 그러나 마를 이용한 발효식품에 관한 연구는 Lee and Kahng (1995), Kim 등 (1998), Lee 등(1999) 및 Lee 등(2011)의 연구 외에는 거의 없는 실정이며, 본 연구팀에서도 발효마 분말을 첨가한 요구르트의 생리활성 효과에 대해 보고한 바 있다(Jeon *et al.*, 2011).

따라서 본 연구는 마 가공식품 연구의 일환으로 발효방법에 따른 기초자료를 확보하기 위하여 수행되었다. 즉, 다양한 약리적인 효과를 인정 받고 있는 홍국균(*Monascus* sp.)과 유산균을 이용하여 마의 1단 발효와 2단 발효를 통해 얻어진 발효마의 천연색소와 monacolin K 생산량, 항산화 활성, ACE 저해활성 및

*For correspondence. E-mail: gskwon@andong.ac.kr; Tel.: +82-54-820-5909; Fax: +82-54-820-6252

GABA (γ -aminobutyric acid) 함량변화 등의 생리활성 효과를 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 Folin-ciocalteu's phenol reagent, DPPH, tannic acid, GABA (γ -aminobutyric acid), angiotensin converting enzyme (ACE), hippuril-L-histidine-L-leucine (HHL), mevinolin (monacolin K) 등은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였으며, 그 외의 시약은 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

사용 균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 본 연구실에서 신규 분리한 균주들 중에서 홍국색소 생산능이 우수한 것으로 조사된 *Monascus* sp. MK2 균주(Jeon et al., 2006)와 ACE 저해물질 생산능이 우수한 것으로 조사된 *Lactobacillus brevis* HLJ59 균주(Jeon et al., 2010)를 발효마 제조에 발효 균주로 선발하여 본 실험에 사용하였다. 발효마의 제조를 위해 *Monascus* sp. MK2의 전배양 기본 배지로 3% rice powder, 0.15% NaNO_3 , 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 및 0.25% KH_2PO_4 , pH 6.0로 구성된 Lin's 배지(Lin, 1973)를 사용하였으며, 본 배양은 전 배양과 동일한 Lin's 배지에 *Monascus* sp. MK2 전 배양액을 2% (v/v)로 접종한 후 초기 pH 6.0, 배양 온도 30°C에서 130 rpm으로 5일간 진탕 배양하여, 발효마의 제조를 위한 종균으로 사용하였다.

L. brevis HLJ59 균주는 *Lactobacilli* MRS broth (Difco, USA)에 접종하고 37°C에서 24시간 2회 배양하여 균주를 활성화시킨 후 사용하였다.

발효마의 제조

본 실험에 사용한 마 시료는 2011년 경북 안동에서 재배한 병마 (*Dioscorea batatas* Dence)를 구입하였으며, 구입 직후 4°C에 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다. 발효마를 제조하기 위하여 마는 흐르는 물에 세척하여 뿌리 표면에 부착된 이물질을 없애고 말단 부분과 껍질을 제거한 후, 약 3 mm 정도로 절단하고 60°C에서 항량 건조하여 냉동보관 하면서 사용하였다. 발효마의 제조는 건조된 마를 물에 침지한 후 불림을 행하였으며, 침지 후 물 빼기를 실시한 다음 100 g씩 배양통에 분취하였다. 이후 121°C에서 15분간 가압 멸균하고 실온으로 냉각시킨 다음 *Monascus* sp. MK2 배양액을 5% (v/w)로 접종한 후 30°C에서 7일간 발효한 경우(1단 발효)와 *Monascus* sp. MK2 배양액을 5% (v/w)로 접종한 후 30°C에서 7일간 발효한 다음 *L. brevis* HLJ59 균주를 5% (v/w)로 접종하여 2일간 발효한 경우(2단 발효), 또한 *L. brevis* HLJ59 균주를 5% (v/w)로 접종하여 2일간 발효한 경우(1단 발효)와 *L. brevis* HLJ59 균주를 5% (v/w)로 접종하여 2일간 발효한 다음 *Monascus* sp. MK2 배양액을 5% (v/w)로 접종하여 7일간 발효한 경우(2단 발효)로 구분하여 각각 발효를 실시하였으며, 배양체의 덩어리 형성 방지를 위해 하루에 3회 규칙적으로 흔들어 주었다. 발효가 완료된 후에는 60°C에서 수분함량

10% 이하로 건조한 후 분쇄하여 냉동보관 하면서 실험에 필요한 시료로 사용하였다.

발효마의 색소 측정

발효마로부터 색소의 측정은 80% 에탄올로 각각 추출한 후 추출액을 6,000×g에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 적정 배수까지 희석하고 UV-VIS spectrophotometer (Hewlett Packard 8453, Germany)를 사용하여 황색 색소는 400 nm, 오렌지 색소는 470 nm 및 적색 색소는 500 nm에서 측정된 흡광도 값을 각각의 색소 값으로 나타내었다. 또한 적색 색소와 황색 색소의 생성량을 500 nm/400 nm의 비율로서 상대적으로 비교하였고, 1.0을 기준으로 하여 그 이상은 적색 색소의 생성 비율이 높은 것으로 그 이하는 황색 색소의 생성 비율이 높은 것으로 나타내었으며, 이때 흡광도 (OD) 1.0을 1 unit로 나타내었다.

HPLC를 이용한 Monacolin K의 정량

발효마로부터 monacolin K의 정량은 발효마 1 g에 80% 에탄올 20 ml를 첨가하여 30°C, 150 rpm으로 3시간 동안 교반하고 정치시킨 후 6,000×g에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 membrane filter (0.45 μm , Millipore, USA)로 여과하여 시료로 사용하였으며, 이때 사용한 HPLC 분석조건은 다음과 같다.

Monacolin K의 정량은 Luna 5 μ Phenyl-Hexyl column (250×4.6 mm, Phenomenex Inc., USA)이 장착된 HPLC (Sykam, Germany)를 이용하여 flow rate : 1.0 ml/min, UV 237 nm에서 검출하면서 injection volume 20 μl 로 하여 acetonitrile : 0.1% Phosphoric acid = 55 : 45의 비율로 용출시킨 후 표준 monacolin K (Sigma Co., USA)를 이용하여 peak의 면적비로써 비교 정량 분석하였다.

총 polyphenol 및 flavonoid 함량

발효마의 총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법(Swain et al., 1959)을 일부 변형하여 측정하였다. 원심분리한 상등액의 농도별 시료 50 μl 에 2% Na_2CO_3 용액 1 ml를 가하고, Folin & Ciocalteu's phenol reagents 50 μl 를 혼합한 다음 실온에서 30분간 반응시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 tannic acid (Sigma Co.)를 사용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 작성한 검량선으로부터 총 polyphenol 함량을 계산하였다. 총 flavonoid 함량 측정은 Jia법(Jia et al., 1999)을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 원심분리한 상등액의 농도별 시료 150 μl 에 증류수 600 μl , 5% NaNO_2 45 μl 를 가한 후 6분간 방치하고, 10% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 150 μl 를 가하였다. 11분간 방치 후 1 M NaOH를 500 μl 를 가하고 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 rutin (Sigma Co.)을 사용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 작성한 검량선으로부터 총 flavonoid 함량을 계산하였다.

DPPH radical 소거활성

발효마의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거활성은 Blois (1958)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉,

원심 분리한 상등액의 농도별 시료 200 µl에 DPPH 용액을 800 µl 를 가하여 혼합한 다음 실온에서 10분간 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 DPPH radical 소거활성은 시료 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 차이를 비교하여 나타내었으며, 양성 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다.

환원력(reducing power) 측정

발효마의 환원력 측정은 Ferreira 등(2009)의 방법을 응용하여 측정하였다. 원심 분리한 상등액의 농도별 시료 1 ml에 200 mM 인산 완충용액(pH 6.6) 및 1%의 potassium ferricyanide 1 ml를 차례로 가한 다음 50°C에서 30분간 반응하였다. 여기에 10% TCA 용액 1 ml를 가하여 반응을 정지 시킨 다음 5,000×g에서 5분간 원심 분리한 후 얻은 상등액 1 ml에 증류수 및 ferric chloride 용액을 각 1 ml씩 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 환원력을 흡광도 값으로 나타내었다.

ACE 저해활성

발효마의 ACE 저해활성의 측정은 Cushman과 Cheung의 방법(Cushman and Cheung, 1971)을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 원심분리한 상등액의 농도별 시료 100 µl에 100 mM sodium borate buffer (pH 8.3) 100 µl를 가한 후, 37°C에서 5분간 전 배양시켰다. 여기에 기질로 hippuril-L-histidine-L-leucine (HHL, Sigma, USA) 용액 50 µl를 첨가한 후, 다시 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 250 µl를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 1 ml를 가하여 30초간 vortexing한 다음 1,500×g으로 15분간 원심분리 한 후 상등액 800 µl를 취하였다. 이 상등액을 120°C에서 40분간 완전히 건조 시킨 후 동일조건외의 100 mM sodium borate buffer (pH 8.3) 1 µl을 가하여 완전히 용해시켜 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해활성을 계산하였다.

GABA 함량

발효마의 GABA 함량 측정은 아미노산분석기(Amino acid analyzer, Sykam, Germany)를 이용하여 정량 분석하였으며, 6,000×g에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 0.45 µm membrane (Millipore)으로 여과한 후 분석용 시료로 사용하였다.

결과 및 고찰

발효마의 색소 측정

식품공업에서 가장 많이 사용되어 온 색소는 대부분 타르계 합성색소로서 그 발암성 등 안전성에 문제가 발생함에 따라 천연색소에 대한 소비자의 요구가 증대됨으로서 식품에서의 천연색소 사용량이 계속적으로 증가되고 있으며, 이처럼 식품에 사용되는 색소는 식품산업에서의 제품의 가치를 높이고, 소비자의 구매욕구와 식욕을 향상시키는 역할을 하고 있다(Judie, 1987; Kim and Kim, 1997). 천연색소의 공급원으로는 특정 식물의 꽃, 잎, 뿌리 및 열매로부터 얻는 식물성 천연색소와 미생물이 생산하는 미생물 유래 천연색소가 주를 이루고 있으며, 그 중에서 미

Table 1. Pigments production of fermented *D. batatas* Dence by one stage fermentation and two stage fermentation

Fermentation form	Production of monascus pigments (units)			Red/Yellow
	Yellow	Orange	Red	
Control	0.15 ^a ±0.02 ^b	0.11±0.01	0.03±0.01	0.20
MK2	14.03±0.56	13.88±0.21	15.71±0.90	1.12
MK2/HLJ59	13.77±0.19	12.66±0.19	14.82±0.39	1.08
HLJ59	0.14±0.02	0.11±0.01	0.02±0.01	0.14
HLJ59/MK2	0.25±0.01	0.22±0.01	0.33±0.01	1.32

^a Means are three replication
^b Data are expressed as mean±SE

생물 유래의 천연색소는 배양기간이 타 천연색소 공급원과 달리 짧고 그 생산이 비교적 저비용으로 가능하다는 점에서 많은 장점을 가지고 있으며(Lin and Iizuka, 1982), 역사상 오래 전부터 주목 받아 온 것은 홍주, 육류가공, 홍두부, 기타 음식물의 착색에 이용되어온 홍국(Ang-khak)이 있다(Kim et al., 1991).

본 연구에서는 *Monascus* sp. MK2 균주와 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용하여 마의 1단 발효와 2단 발효를 실시하였으며, 이때 생산되는 색소 생산량은 Table 1과 같다.

Monascus sp. MK2를 이용하여 1단 발효 하였을 때 황색, 옐렌지색 및 적색 색소의 생산능이 각각 14.03, 13.88 및 15.71로서 가장 높게 나타났으며, *Monascus* sp. MK2로 1단 발효를 실

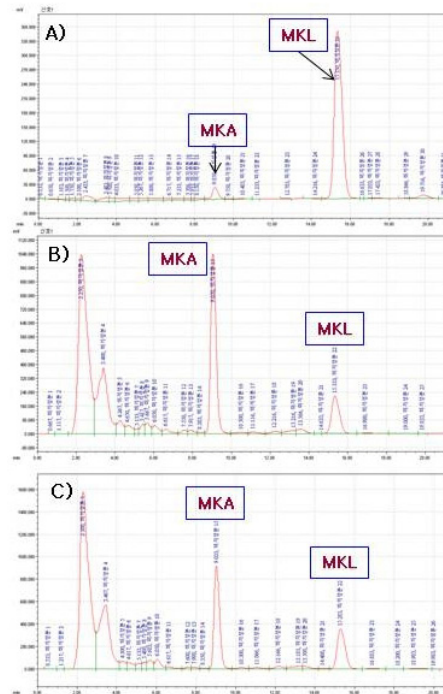


Fig. 1. Monacolin K HPLC chromatogram by one stage fermentation and two stage fermentation (A, monacolin K standard; B, one stage fermentation; C, two stage fermentation).

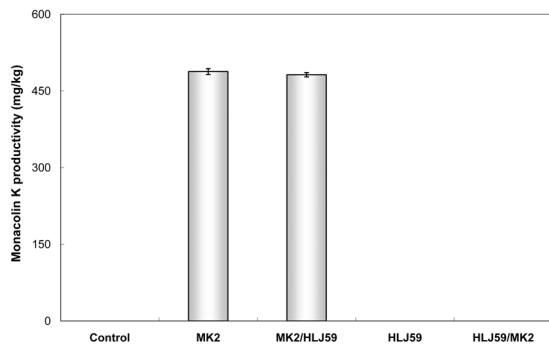


Fig. 2. Monacolin K production of fermented *D. batatas* Dence by one stage fermentation and two stage fermentation (Data are expressed as mean±SE. Control, Not fermentation yam; MK2, *Monascus* sp. MK2-one step fermentation; MK2/HLJ59, *Monascus* sp. MK2→*L. brevis* HLJ59-two step fermentation; HLJ59, *L. brevis* HLJ59-one step fermentation; and HLJ59/MK2, *L. brevis* HLJ59→*Monascus* sp. MK2-two step fermentation).

시하고, *L. brevis* HLJ59 균주로 2단 발효를 하였을 경우에는 황색, 오렌지색 및 적색 색소의 생산능이 각각 13.77, 12.66 및 14.82로서 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 1단 발효 하였을 때 보다는 약간 낮아지기는 하였으나 큰 변화는 없는 것으로 조사되었다. 그러나 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 하였을 때와 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 후 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 2단 발효를 유도하였을 경우에는 *L. brevis* HLJ59 균주가 생성하는 산의 영향으로 *Monascus* sp. MK2의 증식이 어려워져 색소 생산능이 낮은 것으로 생각된다. 따라서 색소의 생산은 *Monascus* sp. MK2를 이용한 1단 발효 또는 *Monascus* sp. MK2로 1단 발효를 실시하고 *L. brevis* HLJ59 균주로 2단 발효하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

HPLC를 이용한 발효마의 Monacolin K 생산

Monacolin K (Lovastatin, Mevinolin)는 고지혈증 치료제로 사용되고 있는 것으로 1979년 일본의 Endo 교수가 처음 발견한 물질로서 cholesterol 생합성 경로에서 HMG-CoA reductase를

특이적으로 억제함으로써 강력한 cholesterol 생합성 저해작용을 하는 것으로 보고되었다(Endo, 1979; Bilheimer et al., 1983).

HPCL 분석결과 Fig. 1과 Fig. 2 같이 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 1단 발효 하였을 때 monacolin K의 생산능이 487.94 mg/kg로 나타났으며, *Monascus* sp. MK2로 1단 발효를 실시하고 *L. brevis* HLJ59 균주로 2단 발효를 하였을 경우에는 monacolin K의 생산능이 481.71 mg/kg로 나타남에 따라 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 1단 발효 하였을 때 보다는 약간 낮아지기는 하였으나 색소와 마찬가지로 큰 변화는 없는 것으로 조사되었다.

또한 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 하였을 때와 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 후 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 2단 발효를 유도하였을 경우에는 *L. brevis* HLJ59 균주가 생성하는 산의 영향으로 *Monascus* sp. MK2의 증식이 어려워져 색소와 마찬가지로 monacolin K 생산이 이루어 지지 않은 것으로 사료된다.

발효마의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

총 페놀성 화합물은 다양한 구조와 분자량을 가진 이차대사 산물로 식물체에 널리 분포되어 있으며 free radical을 제거함으로써 산화를 억제하여 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막아 항암, 항균, 노화방지 및 심장질환 예방을 예방하는 등의 생리활성 물질로 알려져 있으며 식품, 의약품, 화장품 등 많은 분야에 활용되고 있다(Hertog et al., 1992; Ferreres et al., 2009).

Fig. 3와 같이 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 1단 발효 하였을 때 총 폴리페놀 화합물의 함량이 703.65 mg/kg로 나타났으며, *Monascus* sp. MK2로 1단 발효를 실시하고 *L. brevis* HLJ59 균주로 2단 발효를 하였을 경우에는 총 폴리페놀 화합물의 함량이 723.77 mg/kg로 나타남에 따라 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 1단 발효 하였을 때 보다는 다소 높아지기는 하였으나 큰 함량의 변화는 없는 것으로 조사되었다.

총 플라보노이드 함량 역시 총 폴리페놀 화합물과 마찬가지로 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 1단 발효 하였을 때와 *Monascus* sp. MK2로 1단 발효를 실시하고 *L. brevis* HLJ59 균

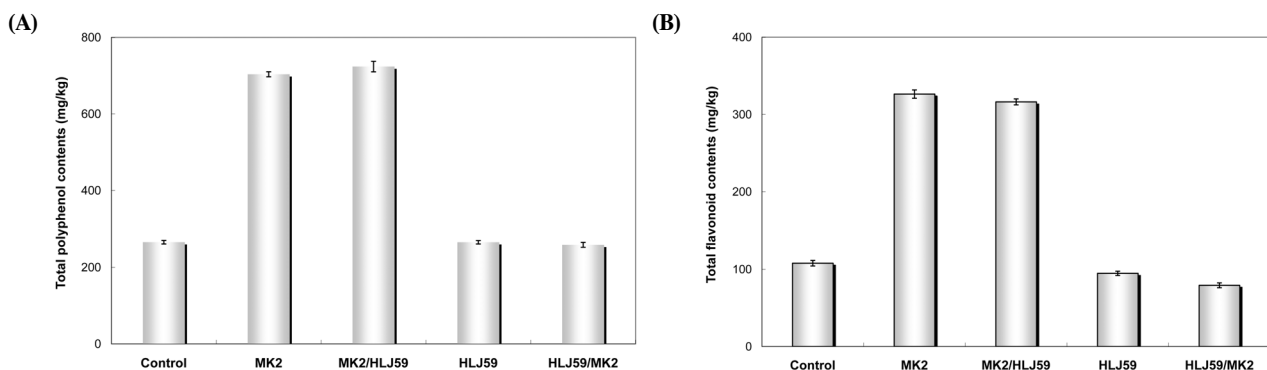


Fig. 3. Total polyphenol (A) and flavonoid contents (B) of fermented *D. batatas* Dence by one stage fermentation and two stage fermentation (Data are expressed as mean±SE. Control, Not fermentation yam; MK2, *Monascus* sp. MK2-one step fermentation; MK2/HLJ59, *Monascus* sp. MK2→*L. brevis* HLJ59-two step fermentation; HLJ59, *L. brevis* HLJ59-one step fermentation; and HLJ59/MK2, *L. brevis* HLJ59→*Monascus* sp. MK2-two step fermentation).

주로 2단 발효를 하였을 경우에 높은 결과를 나타내었다.

또한 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 하였을 때와 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 후 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 2단 발효를 유도하였을 경우에는 총 폴리페놀 화합물과 플라보노이드의 함량이 각각 265.49 mg/kg, 258.78 mg/kg 및 94.81 mg/kg, 79.26 mg/kg으로 나타났다. 이는 대조구인 마 자체 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 각각 265.66 mg/kg, 107.9 mg/kg으로 거의 같은 것으로 조사됨에 따라 *L. brevis* HLJ59 균주는 총 폴리페놀 화합물과 플라보노이드 화합물의 생성에는 영향이 없는 것으로 사료된다.

발효마의 DPPH radical 소거활성

DPPH는 화학적으로 안정화 된 free radical을 가지고 있는 수용성 물질로서 515-525 nm 부근에서 최대 흡광도를 가지는 보라색의 화합물로 ascorbic acid, BHA, 토코페롤, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 짙은 보라색이 탈색됨으로서 항산화 물질의 전자공여능을 측정할 때 사용된다(Blois, 1958).

Fig. 4에서와 같이 마 자체 추출물의 경우 DPPH radical 소거활성이 66.4%이었으나 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 1단 발효 하였을 때 DPPH radical 소거활성이 74.7%로 나타났으며, *Monascus* sp. MK2로 1단 발효를 실시하고 *L. brevis* HLJ59 균주로 2단 발효를 하였을 경우에는 DPPH radical 소거활성이 81.7%로 증가하는 것으로 조사되었다.

또한 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 하였을 때와 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 후 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 2단 발효를 유도하였을 경우에는 DPPH radical 소거활성이 각각 62.8%와 58.9%로 나타났다. 이러한 결과는 Chung (1999)의 보고에서 항산화 성분 함량과 free radical 소거작용과의 상관관계에서 폴리페놀 함량에 비례하여 활성이 증가한다고 보고하였으며, Kwon 등(2008)은 산겨릅나무 추출 분획물 중에 총 페놀함량이 가장 높았던 추출 분획물에서 가장 높은 DPPH radical 소거활성을 나타내었다는 보고와 일치하였다. 따라서 DPPH radical

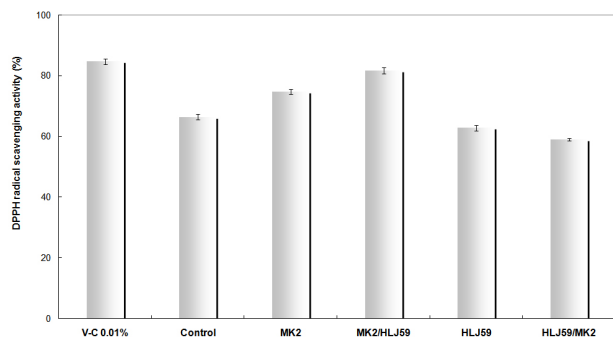


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of fermented *D. batatas* Dence by one stage fermentation and two stage fermentation (Data are expressed as mean±SE. Control, Not fermentation yam; MK2, *Monascus* sp. MK2-one step fermentation; MK2/HLJ59, *Monascus* sp. MK2→*L. brevis* HLJ59-two step fermentation; HLJ59, *L. brevis* HLJ59-one step fermentation; and HLJ59/MK2, *L. brevis* HLJ59→*Monascus* sp. MK2-two step fermentation).

소거활성의 경우에는 *Monascus* sp. MK2로 1단 발효를 실시하고 *L. brevis* HLJ59 균주로 2단 발효를 유도하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

발효마의 환원력 측정

환원력은 Fe³⁺ 이온을 Fe²⁺ 이온으로 환원시키는 능력을 측정하는 것으로 환원력이 클수록 강력한 항산화제가 되는데 이러한 환원력의 정도는 항산화 활성과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며 높은 환원력을 가지는 물질은 흡광도 수치가 높게 나타나게 된다(Gordon, 1990).

Fig. 5에 나타난 바와 같이 마 자체 추출물의 경우 흡광도 값이 0.87이었으나 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 1단 발효 하였을 때 흡광도 값이 1.32로 나타났으며, *Monascus* sp. MK2로 1단 발효를 실시하고 *L. brevis* HLJ59 균주로 2단 발효를 하였을 경우에는 흡광도 값이 1.50으로 증가하는 것으로 조사되었다.

또한 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 하였을 때와 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 후 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 2단 발효를 유도하였을 경우에는 흡광도 값이 각각 0.91와 0.81로 나타났다. 이상의 결과는 DPPH radical 소거활성의 결과와 일치하는 것으로 조사되었으며, 페놀성 화합물이 항산화능이 크게 관여한다는 기존의 보고와 유사하였다(Kim et al., 2004).

발효마의 Angiotensin converting enzyme (ACE) 저해활성

ACE는 renin-angiotensin-aldosterone system의 중요한 효소 물질로서 불활성형의 angiotensin-I로부터 C-terminal에서 dipeptide인 His-Leu를 분리시켜 가수분해 함으로서 강력한 혈관수축작용을 하는 angiotensin-II를 생성하는데, 혈압을 감소시키는 bradykinin을 불활성화시키는 효소로서 결국 본태성고혈압의 원인이 되고 있다(Noh and Song, 2001). 따라서 ACE 저해제는 ACE 활성을 저해함으로서 angiotensin-II의 생성저해, aldosterone의 분비 감소, 혈관확장제인 bradykinin의 증가 등의 과정을 통하여 신장혈관을 확장시켜 나트륨의 배설을 촉진시킴

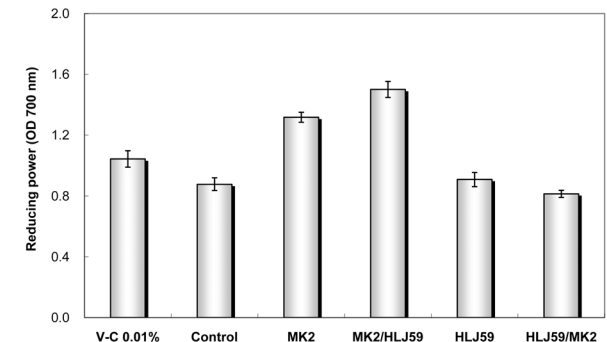


Fig. 5. Reducing power of fermented *D. batatas* Dence by one stage fermentation and two stage fermentation (Data are expressed as mean±SE. Control, Not fermentation yam; MK2, *Monascus* sp. MK2-one step fermentation; MK2/HLJ59, *Monascus* sp. MK2→*L. brevis* HLJ59-two step fermentation; HLJ59, *L. brevis* HLJ59-one step fermentation; and HLJ59/MK2, *L. brevis* HLJ59→*Monascus* sp. MK2-two step fermentation).

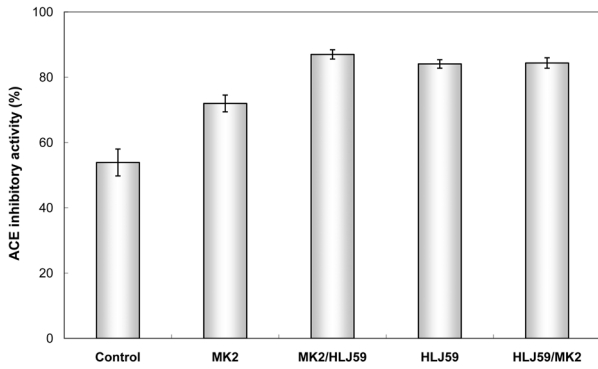


Fig. 6. ACE inhibitory activity of fermented *D. batatas* Dence by one stage fermentation and two stage fermentation (Data are expressed as mean±SE. Control, Not fermentation yam; MK2, *Monascus* sp. MK2-one step fermentation; MK2/HLJ59, *Monascus* sp. MK2→*L. brevis* HLJ59-two step fermentation; HLJ59, *L. brevis* HLJ59-one step fermentation; and HLJ59/MK2, *L. brevis* HLJ59→*Monascus* sp. MK2-two step fermentation)

으로서 혈압을 낮추어 줄 수 있으며, 이로 인해 심혈관질환 및 뇌혈관질환 등 고혈압과 관련이 깊은 질환을 치료하는데 사용될 수 있다(Oh et al., 1997).

Fig. 6에 나타난 바와 같이 마 자체 추출물의 경우 ACE 저해 활성이 53.9%이었으나 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 1단 발효 하였을 때 ACE 저해활성이 71.9%로 나타났으며, *Monascus* sp. MK2로 1단 발효를 실시하고 *L. brevis* HLJ59 균주로 2단 발효를 하였을 경우에는 ACE 저해활성이 86.9%로 증가하는 것으로 조사되었다.

또한 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 하였을 때와 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 후 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 2단 발효를 유도하였을 경우에는 ACE 저해활성이 각각 84.1%와 84.4%로 나타났다. 이러한 결과는 발효에 사용한 *L. brevis*

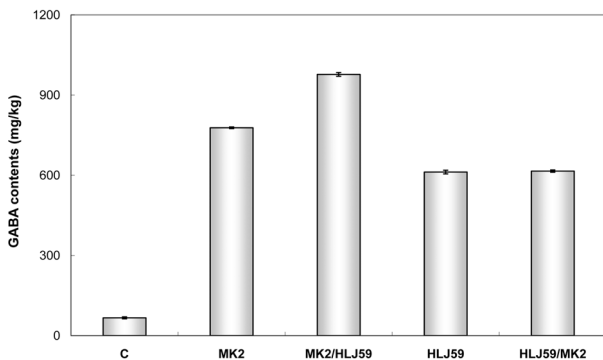


Fig. 7. GABA contents of Fermented *D. batatas* Dence by one stage fermentation and two stage fermentation (Data are expressed as mean±SE. Control, Not fermentation yam; MK2, *Monascus* sp. MK2-one step fermentation; MK2/HLJ59, *Monascus* sp. MK2→*L. brevis* HLJ59-two step fermentation; HLJ59, *L. brevis* HLJ59-one step fermentation; and HLJ59/MK2, *L. brevis* HLJ59→*Monascus* sp. MK2-two step fermentation)

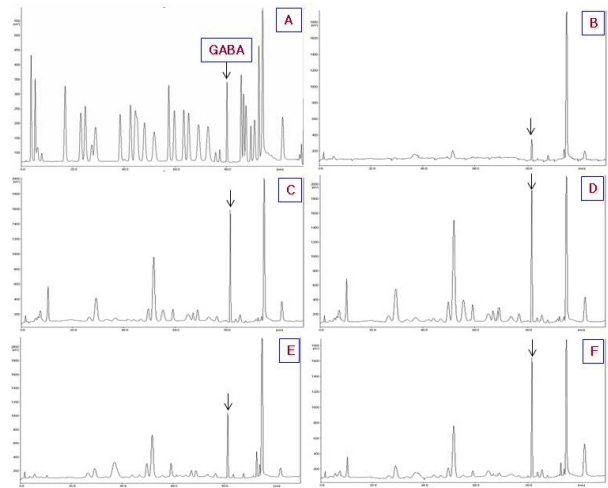


Fig. 8. Gama-aminobutyric acid chromatogram of amino acid analyzer by one stage fermentation and two stage fermentation (A, GABA standard; B, Not fermentation yam; C, *Monascus* sp. MK2-one step fermentation; D, *Monascus* sp. MK2→*L. brevis* HLJ59-two step fermentation; E, *L. brevis* HLJ59-one step fermentation; F, *L. brevis* HLJ59→*Monascus* sp. MK2-two step fermentation)

HLJ59 균주는 본 연구진에서 높은 ACE 저해활성이 있다고 보고한 바 있는 균주로서 *L. brevis* HLJ59 균주가 생산하는 peptide 계열의 ACE 저해물질이 영향을 미친 것으로 사료된다 (Jeon et al., 2010).

발효마의 GABA 함량

γ-Aminobutyric acid (GABA)는 단백질에서 발견되지 않는 비단백질성 아미노산으로 신경전달 물질 중 아미노산계 신경전달물질의 대표적인 물질로서 동식물계에 널리 분포되어 있는데 (Flora et al., 2004), 식물에서는 녹차(Hsueh et al., 2006) 등에 존재하며 홍곡(red yeast rice) 중에도 다량 존재하는 것으로 알려져 있다(Isato and Kunio, 2000).

Fig. 7과 Fig. 8에 나타난 바와 같이 마 자체로서는 GABA 함량이 66.6 mg/kg으로 조사되었으나 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 1단 발효 하였을 때 GABA 함량이 777.8 mg/kg으로 나타났다. *Monascus* sp. MK2로 1단 발효를 실시하고 *L. brevis* HLJ59 균주로 2단 발효를 하였을 경우에는 GABA 함량이 977.4 mg/kg으로 증가하는 것으로 조사되었다.

또한 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 하였을 때와 *L. brevis* HLJ59 균주로 1단 발효 후 *Monascus* sp. MK2를 이용하여 2단 발효를 유도하였을 경우에는 GABA 함량이 각각 612.1 mg/kg 과 615.6 mg/kg으로 나타났다. 이러한 결과는 발효에 사용한 *L. brevis* HLJ59 균주는 ACE 저해물질 뿐만 아니라 GABA 생성 능 또한 우수한 균주로서 *L. brevis* HLJ59 균주가 생산하는 GABA가 영향을 미친 것으로 사료된다(자료 미제시).

본 연구에서 실시한 마의 2단 발효는 다양한 생리활성 물질의 생산성 증대에 효과적임을 나타내었으며, 향후 발효마를 활용한 기능성 식품 소재로서의 개발 가능성이 크다고 사료된다.

적 요

본 실험에서는 약용작물인 마(산약)를 *Monascus* sp.와 *Lactobacillus* sp.를 이용하여 발효를 통해 기능성 식품 소재로의 활용 가능성을 알아보기 위해 발효마의 색소 생산량, monacolin K 생산량, 총 polyphenol과 flavonoid 함량, DPPH radical 소거 활성, 환원력(reducing power), ACE 저해활성 및 GABA 함량 등을 측정하였다. 그 결과, 발효마의 색소 생산량은 *Monascus* sp. MK2로 1단 발효하였을 때 황색, 오렌지색 및 적색 색소가 각각 14.03, 13.88, 15.71로 나타났으며, monacolin K 생산량 역시 *Monascus* sp. MK2로 1단 발효하였을 때 487.9 mg/kg 생산되었다. 총 polyphenol과 flavonoid 함량은 각각 1단 발효와 2단 발효 하였을 때 723.8, 326.4 mg/kg이었으며, DPPH radical 소거활성과 환원력은 각각 2단 발효 하였을 때 81.7%, 1.5 (OD)으로 조사되었다. 또한 ACE 저해활성과 GABA 함량 역시 2단 발효 하였을 때 86.9%와 977.4 mg/kg로 조사되었다.

감사의 말

본 연구는 2011년 안동과학대학 교육역량강화사업 교원 R&D 지원에 의한 연구결과의 일부이며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Baek, Y.J., Bae, H.S., and Kim, H.Y. 1991. *In vivo* antitumor effects of lactic acid bacteria on Sarcoma 180 and mouse Lewis Lung Carcinoma. *Cancer Res.* **23**, 188–197.
- Baek, S.H., Kim, S.H., Son, K.H., Chung, K.C., and Chang, H.W. 1994. Inactivation of human pleural fluid phospholipase A2 by dioscin. *Arch. Pharm. Res.* **17**, 218–222.
- Bilheimer, D.W., Grundy, S.M., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1983. Mevinolin and colestipol stimulate receptor mediated clearance of low density lipoprotein from plasma in familial hypercholesterolemia heterozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4124–4128.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199–1200.
- Chung, H.J. 1999. Antioxidative effect of ethanolic extracts of some tea materials on red pepper seed oil. *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 1316–1320.
- Cushman, D.W. and Cheung, H.S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1637–1648.
- Endo, A. 1979. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J. Antibiot. (Tokyo)* **32**, 852–854.
- Ferreres, F., Gomes, D., Valentão, P., Gonçalves, R., Pio, R., Chagas, E.A., Seabra, R.M., and Andrade, P.B. 2009. Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: Variation of phenolics and antioxidative potential. *Food Chem.* **114**, 1019–1027.
- Flora, J., Doreen, C., Lim, H.K., Tom, N., and Stephen, L. 2004. Production of GABA by cultured hippocampal glial cells. *Neurochem. Int.* **45**, 273–283.
- Gordon, M.H. 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*, Food antioxidants, pp. 1–8. In Hudson, B.J.F. (ed.), Elsevier Applied science, London, UK.
- Ha, Y.D., Lee, S.P., and Kwak, Y.G. 1998. Removal of heavy metal and ACE inhibition of yam mucilage. *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 751–755.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., and Katan, M.B. 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2379–2383.
- Hsueh, F.W., Yung, S.T., Mu, L.L., and Andi, S.O. 2006. Comparison of bioactive components in GABA tea and green tea produced in Taiwan. *Food Chem.* **96**, 648–653.
- Isato, K. and Kunio, H. 2000. Change in γ -aminobutyric acid content during beni-koji making. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 617–619.
- Jeon, C.P., Kim, Y.H., Lee, J.B., Jo, M.S., Shin, K.S., Choi, C.S., and Kwon, G.S. 2010. Physiological characteristics and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus brevis* HLJ59 isolated from salted shrimp. *Kor. J. Microbiol.* **46**, 9–14.
- Jeon, C.P., Lee, J.B., Choi, C.S., and Kwon, G.S. 2011. Physiological effect of yogurt with powder two stage fermented *Dioscorea batatas* Dence by *Monascus* sp. and *Lactobacillus* sp. *Kor. J. Microbiol.* **47**, 151–157.
- Jeon, C.P., Lee, J.B., Choi, S.Y., Lee, O.S., Choi, C.S., and Kwon, G.S. 2006. Optimal conditions for production of water-soluble monascus natural pigments by *Monascus purpureus* MK2. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 250–256.
- Jia, Z., Tang, M., and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and they scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555–559.
- Judie, D.D. 1987. Applications and colorants. *Food Technol.* **23**, 78–88.
- Jung, D.H. 2007. Encyclopedia of health and functional foods, pp. 191–192. Shinil Books Publishing Co., Seoul, Korea.
- Kim E.Y., Baik, J.H., Kim, J.H., Kim, S.R., and Rhyu, M.R. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J. Food Technol.* **36**, 333–338.
- Kim, J.Y. and Kim, K.H. 1997. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. PY123 producing water-soluble yellow pigment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 454–458.
- Kim, S.B., Kim, K.Y., and Lim, J.W. 1998. The physicochemical and microbiological properties of yam-yoghurt. *Kor. J. Dairy Sci.* **20**, 177–190.
- Kim, C.M., Son, K.H., Kim, S.H., and Kim, H.P. 1991. Steroidal sapogenin contents in some domestic plants. *Arch. Pharm.* **14**, 305–310.
- Kwon, H.N., Park, J.R., and Jeon, J.R. 2008. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Acer tegmentosum* M. extracts. *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 1389–1394.
- Kwon, C.S., Shon, H.Y., Kim, S.H., Kim, J.H., Son, G.H., Lee, J.S., Lim, J.K., and Kim, J.S. 2003. Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 1451–1456.
- Kwon, C.S., Son, I.S., Shim, H.Y., Kwon, I.S., and Chung, K.M. 1999. Effects of yam on lowering cholesterol level and its mechanism. *Kor. J. Food Nutr.* **32**, 637–643.
- Lee, S.Y., Ahn, J.J., and Kwak, H.S. 2011. Effects of the extract yam powder addition on yogurt properties during storage. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **31**, 66–73.
- Lee, I.S., Chung, S.Y., Shim, C.S., and Koo, S.J. 1995. Inhibitory effect of yam (*Dioscorea batatas* Dence) extracts on the mutagenicity. *Kor. J. Soc. Food Sci.* **11**, 351–355.
- Lee, S.P., Ha, Y.D., and Kim, H.I. 1999. Effect of yam on the growth

- of lactic acid bacteria. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 805–809.
- Lee, E.H. and Kahng, G.G.** 1995. The effect of yam powder on the quality of plain yoghurt. *J. Agric. Tech. Res. Inst.* **8**, 42–46.
- Lee, C.L., Wang, J.J., Kuo, S.L., and Pan, T.M.** 2006. *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol-lowering agent—monacolin K and antiinflammation agent-monascin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 1254–1262.
- Lin, C.F.** 1973. Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture. *J. Ferment. Technol.* **51**, 107–114.
- Lin, C.F. and Iizuka, H.** 1982. Production of extracellular pigments by mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 671–676.
- Noh, H. and Song, K.B.** 2001. Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitor from *Oenanthe javanica*. *Agric. Chem. Biotechnol.* **44**, 98–99.
- Oh, S.J., Kim, S.H., Kim, S.K., Baek, Y.J., and Cho, K.H.** 1997. Angiotensin I- converting enzyme inhibitory activity of the K-casein fragments hydrolysed by chymosin, pepsin, and trypsin. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 1316–1318.
- Purseglove, J.W.** 1972. Dioscoreaceae, tropical crops monocotyledons, p. 97. In Longman, I. (ed.). London, UK.
- Swain, T., Hillis, W.E., and Oritega, M.** 1959. Phenolic constituents of *Prunus domestica*. 1. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **10**, 83–88.