

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2022.8.2.399

JCCT 2022-3-53

녹용추출물의 유산균 발효에 의한 플라보노이드 생성과 항산화활성 효과

Flavonoid production and antioxidant activity effect by lactic acid bacteria fermentation of deer antler extract

김현경*

Hyun-Kyoung Kim*

요약 녹용 기능성 소재 개발 연구의 일환으로 녹용 추출물의 유산균 발효를 수행하였다. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 증가하고 항산화 활성이 강화된 기능성 소재를 개발하고자 하였다. 유산균 발효중 증식수, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거 및 항산화 활성을 평가하였다. 녹용 추출물 기질에 이들 4종의 유산균을 첨가한 결과, 측정된 유산균 수는 $2.04 \sim 5.00 \times 10^7$ 이었다. 한편, 녹용 추출물에 프로테아제(*Bacillus amyloliquefaciens* culture: Maxazyme NNP DS)를 첨가하여 함유된 단백질의 펩타이드 결합을 분해하였다. 그런 다음 이들 4종의 유산균을 첨가하여 배양한 결과 유산균의 수는 $2.84 \times 10^7 \sim 2.21 \times 10^8$ 로 증가하였다. 총 폴리페놀 함량은 유산균 발효추출물에서 $4.82 \sim 6.26 \text{ g/mL}$ 이었으며, 프로테아제 효소와 젖산발효 반응 후 $14.27 \sim 20.58 \text{ g/mL}$ 로 증가하였다. 총 플라보노이드 함량은 유산균 발효추출물에서 $1.52 \sim 2.21 \text{ g/mL}$ 이었고, 프로테아제 반응 및 발효 후에는 $5.59 \sim 8.11 \text{ mg/mL}$ 로 증가하였다. 유산균 발효 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 $17.03 \sim 22.75\%$ 였으나, protease 반응과 발효 후에는 $32.82 \sim 42.90\%$ 로 현저히 증가하였다.

주요어 : 녹용 추출물, 유산균 발효, 폴리페놀, 플라보노이드, DPPH 라디칼 소거능

Abstract As part of research on the development of functional materials for antlers, lactic acid fermentation of antler extract was performed. It was intended to develop a functional material with enhanced total polyphenol and flavonoid content and enhanced antioxidant activity. During the fermentation of lactic acid bacteria, the number of proliferation, total polyphenol and total flavonoid content, DPPH radical scavenging and antioxidant activity were quantified and evaluated. As a result of adding these four types of lactic acid bacteria to the antler water extract substrate, the number of lactic acid bacteria measured was $2.04 \sim 5.00 \times 10^7$. Meanwhile, a protease (*Bacillus amyloliquefaciens* culture: Maxazyme NNP DS) was added to the antler extract to decompose the peptide bonds of the contained proteins. Then, these four types of lactic acid bacteria were added and the number of lactic acid bacteria increased to $2.84 \times 10^7 \sim 2.21 \times 10^8$ as the result of culture. The total polyphenol contents were $4.82 \sim 6.26 \text{ g/mL}$ in the lactic acid bacteria fermentation extracts, and after the reaction of protease enzyme and lactic fermentation, increased to $14.27 \sim 20.58 \text{ g/mL}$. The total flavonoid contents were $1.52 \sim 2.21 \text{ g/mL}$ in the lactic acid bacteria fermentation extracts, and after the protease reaction and fermentation, increased to $5.59 \sim 8.11 \text{ mg/mL}$. DPPH radical scavenging activities of lactic acid bacteria fermentation extracts was $17.03 \sim 22.75\%$, but after the protease reaction and fermentation, remarkably increased to $32.82 \sim 42.90\%$.

Key words : Deer Antler Extract, Lactobacillus Fermentation, Polyphenols, Flavonoids, DPPH Radical Scavenging Activity

*정회원, 서원대학교 식품공학과 조교수 (제1저자)
접수일: 2022년 2월 28일, 수정완료일: 2022년 3월 1일
게재확정일: 2022년 3월 8일

Received: February 28, 2022 / Revised: March 1, 2022

Accepted: March 8, 2022

*Corresponding Author: Kimhk4@seowon.ac.kr

Dept. of Food Science and Engineering, Seowon Univ, Korea

I. 서론

녹용은 한방의서에 주요 약재로 기재되어 동양권을 중심으로 오랜 기간 동안 사용되어져 왔으며 조혈작용, 성장발육촉진작용, 신경쇠약 치료작용, 강장작용, 면역활성 증가 및 오장육부의 기능항진 등 다양한 효능이 보고되었다. 최근에는 과학적인 방법을 이용하여 녹용의 단백질 합성촉진, 동물의 발육에 미치는 녹용의 효과, 녹용의 면역활성 증가, 노화예방 효과 등외에 녹용과 한방약재료로 조제한 물 추출물이 여러 질병의 유발과 관련성이 높은 유리기를 소거하는 활성이 있다고 보고되었다[1-3].

현대사회는 지속적인 경제성장과 더불어 생활수준이 향상되어 인간의 수명은 연장되었으나 급속한 사회 변화와 식생활의 불균형으로 인하여 다양한 질병이 증가하는 추세이며, 건강기능 식품을 통하여 이를 예방하고 관리하기 위한 수요가 증가하고 있는 추세이다. 노화와 질병을 일으키는 원인은 다양하지만, 생체 내에서 생성되는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 축적으로 인하여 세포손상이 시작 된다. 인간을 비롯한 생물체들은 생체 대사과정 중에 활성산소종(ROS)으로 peroxides, superoxide, hydroxyl radical, singlet oxygen, and alpha-oxygen 등을 생성하게 되며 이들의 지속적인 생성 및 과다한 발현은 DNA 손상, 심장질환, 노화 등 여러 가지 질병을 일으킬 수 있는 원인이 될 수 있으며, 이러한 ROS를 제거하는데 관여하는 항산화제가 관심을 받게 되었다[4,5]. 이와 관련하여 항산화효과가 우수한 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxy-anisole (BHA)과 같은 합성 항산화제가 육류 식품이나 지방질식품에 사용되고 있으나 이들 합성 항산화제의 지속적인 섭취는 변이원성과 독성을 초래할 수 있다고 알려졌다. 따라서 최근에는 산화억제 효과가 탁월하고 안전하면서 경제적인 항산화제를 천연물로부터 탐색하려는 많은 연구가 진행 중이다. 과채류에 많이 분포되어 있는 폴리페놀성 화합물과 플라보노이드, 아스코르빈산, 토코페롤과 같은 물질은 활성산소 종의 작용을 억제하여 암, 심혈관계 질환 등 성인병을 예방하고 노화의 지연과 방지에 기여할 수 있다[7,8]. 폴리페놀(polyphenols)에 존재하는 다수의 히드록실기(-OH)는 수소 공여작용을 함으로써 산화가 용이한 지방질 및 활성 산소종 등 불안정한 화합물에 안정화 시키는 특성을

가지고 있어 항산화 효과 및 항암, 항염 효과가 뛰어나다. 플라보노이드는 C6-C3-C6를 기본골격으로 하며 노란색 내지는 담황색을 나타내며 꽤넓게 화합물의 범위에 속하며 폴리페놀과 같이 채소류와 식물의 거의 모든 부위에 함유 되어 있다. 플라보이드는 활성산소종을 효과적으로 제거하여 항산화능이 높다고 알려져 있으며 폴리페놀과 마찬가지로 항바이러스, 항염증, 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있다[9-11].

따라서 본 연구에서는 새로운 기능성 소재의 연구 일환으로 녹용추출물의 유산균 발효 과정에서 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 증가와 연계하여 항산화능에 대한 연구의 필요성을 인지하고 관련 연구를 수행코자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1.1. 녹용재료

한국에서 사육한 꽃사슴 3년생의 녹용을 7월에 채취하여 상대, 중대 및 하대로 부위별로 구분한 다음에 두께가 5mm 이하가 되도록 얇은 편으로 절단된 것을 상대: 중대: 하대(1: 1: 1)의 중량비율로 배합하여 물 추출물의 원료로 사용하였다. 한편, 일반성분 분석용 시료는 부위별 녹용편을 각각 취하여 컷팅믹서로 조쇄한 다음 막자사발에 각각 갈아서 미세분말을 상대: 중대: 하대(1: 1: 1)의 중량비율로 배합하여 사용하였다.

1.2. 유산균 및 단백질 가수분해 효소류

본 실험의 유산균 발효과정에서 유산균 starter로 사용된 것은 식약처 유산균 허가 고시형 제품 중 다음과 같은 4종 제품을 사용하였다. *Bifidobacterium longum* (비피롱 비피더스균-10), *Lactobacillus plantarum* (플란타 김치유산균-10), *Lactobacillus acidophilus* (에시도 필러스유산균-10), Mixture of 8 lactobacilli (8종 알파 혼합유산균-엘(L2)). 한편 유산균 발효과정에 전에 녹용의 단백질을 가수분해하기 위하여 식약처 protease 허가 고시형 제품 중 다음 제품을 사용하였다. Maxazyme NNP DS (*Bacillus amyloliquefaciens*).

1.3. 시약류

Folin & ciocaltue's phenol reagent (Sigma F-9252), aluminum chloride 6-hydrate (YAKURI PURE

CHEMICAL CO., Japan: Test No. 01709), gallic acid (SAMCHUN, G0448) 및 quercetin (Sigma Q-0125)을 폴리페놀 및 플라보노이드 발색시약과 정량용 표준품으로 각각 사용하였다. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma, D9132)은 DPPH라디칼 소거능 측정용으로 linoleic acid(Aldrich S2240-250mL) 및 2-thiobarbituric acid (Sigma-Aldrich T5500-25g)은 TBA 항산화능 측정용 시약으로 각각 사용하였다. 기타 시약류와 용매류는 extra pure grade 시약류를 사용하였다.

1.4. 시험 기기

Microplate reader(Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific: Type 1510), Incubator(SANYO, CO2 incubator), Evaporator(EYELA, Type N-N), Centrifuge (Hanil, Mega 17R), Shaking incubator (Vision Scientific, VS-8480SF)

2. 실험방법

2.1. 녹용 추출물의 제조

절편화된 녹용시료를 상대: 중대: 하대(1: 1: 1)의 비율로 혼합하여 509.7g을 스테인리스 추출기에 정제수를 7배량(v/w) 넣고 100°C에서 24시간 추출하였다. 추출액을 여과한 후 70°C에서 evaporator로 감압 농축하여 약 10 Brix로 조제하여 저장용 반제품 상태로 4°C냉장고에 저장하였다. 유산균 발효시험 사용전에 정제수를 가하여 5 Brix로 희석하여 2,940 mL로 정용하여 분실험에서 녹용 물추출물의 기질로 사용하였다. 녹용 물추출물 기질은 500 mL씩 PP 용기에 옮겨 담고 냉동고(-20°C)에 저장한 다음 사용 전에 꺼내어서 50°C water bath에서 용해시켜 유산균 발효 및 프로테아제 효소반응 후 유산균 발효 기질로 사용하였다.

2.2. 일반성분 분석

국산 녹용의 상대, 중대 및 하대 부위별로 분쇄된 시료를 동량(1: 1: 1)으로 배합 후 식품공전의 일반시험방법에 준하여 분석하였다. 수분은 105°C 건조법, 조지방은 soxhlet 추출법, 조단백질은 세미마이크로 킬달법, 조회분은 550°C 회화법으로 정량하였고, 탄수화물은 100에서 이들 함량을 뺀 값으로 하였다.

2.3. 유산균 배양 및 유산균 수 측정

유산균 배양은 유산균 배양과정에서 유산균 배양 starter로 사용되는 4종의 유산균제품을 국산녹용 물추출물 (5 Brix)에 2%(w/v)를 첨가하여 37°C에서 2일 간 배양하였다. 한편, 동물성 단백질의 가수분해에 주로 사용되는 protease 효소제품(Maxazyme NNP DS)을 선정하여 녹용 물추출물 (5 Brix)에 2%(w/v)를 가하여 50°C에서 24시간 효소반응을 한 다음 유산균 starter제품 4종을 2% (w/v)를 첨가하여 유산균을 배양 배양하였다. 유산균 수 측정은 녹용 물추출물에 유산균 starter제품 4종을 각각 2% 농도(W/V)로 첨가하여 37°C에서 2일간 배양한 다음 증식된 유산균 수를 다음과 같이 측정하였다. 유산균 수의 측정은 식약처 기능성식품공전 시험법의 유산균 수 측정방법에 준하여 BCP 사례 배지에 첨가하여 37°C에서 2일간 배양하여 그 수를 측정하였다[12].

2.4. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 흥 등의 방법을 참조하여 다음과 같은 실험조건으로 정량하였다. 시료별로 조제된 검액 및 gallic acid 농도별 표준액을 각각 400 uL을 취한 다음 50 % Folin & ciocaltue's phenol reagent을 100 uL을 가하였다. 실온에서 5분 방치 후 2% sodium carbonate을 200 uL을 가한 다음에 진탕하고 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 시료별로 상등액을 각각 200 uL씩 취하여 96 well cell culture plate에 가한 다음에 실온에서 10분 경과한 다음 microplate reader를 이용하여 750nm에서 흡광도를 측정하여 총 폴리페놀 함량을 gallic acid 표준 검량선을 이용하여 정량한 다음 gallic acid equivalent로 환산하였다.

2.5. 총 플라보노이드 측정

녹용 물추출액과 유산균 발효액의 총 flavonoid 정량은 Lee 등의 방법 (21)을 다소 변형하여 다음과 같은 방법으로 정량하였다. 검액 및 quercetin 표준액 500 uL을 EP튜브에 취하고 0.05% NaNO₂ 시액 200 uL을 가한 다음에 실온에서 5분간 방치하였다. 그 다음에 1% AlCl₃을 300 uL을 가하고 실온에서 6분간 방치하였다. 그 후에 0.1N NaOH을 500 uL를 가하고 EP튜브를 10초간 위아래로 흔들어서 혼합한 다음에 12,000rpm에서 5분 간 원심분리를 하였다. 그 다음 실온에서 10분간 방치하여 안정화시킨 후 각각 200 uL씩 취하여 96 well

cell culture plate에 각각 가한 다음에 실온에서 10분 경과한 다음에 microplate reader를 이용하여 430nm에서 흡광도를 측정하였다[13].

2.6. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능 측정은 김 등의 방법을 다소 변형하여 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 녹용 물추출물, 유산균 발효균 및 protease 반응 후 유산균 발효균을 5 mL씩 취하고 여기에 동량의 ethanol을 각각 첨가한 다음 시험관 진탕기로 균질화 하였다. 그 다음 상등액 1 mL을 취하여 12,000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 검액으로 사용하였다. 한편 본 실험에서 양성 대조군으로 사용한 gallic acid, quercetin 및 BHT는 각각 50% ethanol에 용해시켜 0.1 mM농도로 조제하여 사용하였다. DPPH 라디칼 소거용 측정용 시약은 사용 직전에 DPPH를 ethanol에 용해시켜 5 x 0.1 mM 농도로 조제하여 사용하였다. 시료용액 및 대조군 용액을 각각 200 mL을 EP튜브에 취하고 여기에 DPPH 용액을 200ml씩 가한 다음 뚜껑을 닫고 5초간 상하로 맹렬히 진탕하였다. 그 다음 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 각각 microplate reader에 200ul씩 취하여 총 10분 경과 후 517 nm에서 3반복으로 검액의 흡광도를 동시에 측정하고 평균값을 제시하였다. 측정한 값은 다음과 같은 공식을 이용하여 EDA(electron donating ability, %) 값으로 산출하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \frac{\text{Abs of blank} - \text{Abs of sample}}{\text{Abs of blank}} \times 100$$

2.7. TBA값 측정 항산화능 비교

2.7.1. 기질용액과 반응액의 조제

linoleic acid 기질에 대한 말론알데히드(malon dialdehyde: TBA)의 생성 억제효과를 TBA값을 측정하여 산패 억제효과를 조사하였다[12,13].

0.1M phosphate buffer(pH 7.0)와 ethanol을 4:1로 혼합한 용매에 linoleic acid을 0.03 M이 되도록 첨가하여 기질용액으로 사용하였다. 50 mL의 팔콘 튜브에 기질

용액 5 mL와 0.1M phosphate buffer(pH 7.0) 4.5 mL을 가하고 여기에 검액 0.5 mL을 가한 다음에 shaking air bath(37°C)에서 130 rpm으로 1주일 동안 연속적으로 진탕 한 다음 TBA 값을 측정하였다.

2.7.2 TBA 값의 측정

TBA 값은 Mitsuda 등 및 Sidwell 등 방법을 참조하여 다음과 같이 본 실험에 적합한 방법으로 변경하여 측정하였다. 반응액을 각각 37°C에서 1주일 동안 연속적으로 진탕추출을 한 다음에 시료별로 각각 2.0 mL씩을 취하고 여기에 35% trichloroacetic acid 1.0 mL, 0.75% TBA 시액 2.0 mL을 가한 다음에 시험관 진탕기로 진탕시켜 30초 동안 진탕하여 균질화 시킨 후 water bat (95°C)에서 40분간 발색시켰다. 발색반응이 끝난 후 수돗물 수조에서 냉각시키고 acetic acid 1.0 mL, chloroform 2.0 mL을 가한 다음에 시험관 진탕기로 다시 진탕시킨 후 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. 그 다음 상등액을 각각 microplate reader에 200 uL씩 3반복으로 취하고 532 nm에서 흡광도를 동시에 측정하고 평균값을 제시하였다. TBA value를 측정하고 다음과 같은 공식을 이용하여 Antioxidant activity(%) 값으로 산출하였다.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{\text{Abs of blank} - \text{Abs of sample}}{\text{Abs of blank}} \times 100$$

III. 실험결과

1. 국산 녹용의 일반성분 조성

국산녹용의 물 추출물 원료로 사용한 상대, 중대 및 하대를 각각 분쇄하여 동일 중량비(1: 1: 1)로 배합하여 일반성분 분석결과는 Table 1과 같다. Lee 등은 국산녹용의 상대와 중대를 구분하여 사용한 녹용시료의 조단백질 함량은 52.64~66.91%로 높았고 조회분 함량은 22.70~34.54 %로 Table 1 보다 낮았다. 그러나 본 실험에서 사용한 녹용시료는 조단백질의 함량이 낮고 조회분의 함량이 높은 하대를 동일양으로 첨가하여 국산녹용의

표 1. 국내산 녹용 추출물의 일반성분 분석
Table 1. Proximate composition of deer antlers

Samples	Moisture	Crude protein	Crude ash	Carbohydrate	Crude fat
Korean antlers	5.20%	46.51%	39.36%	8.12%	0.81%

※ The antler sample was mixed at the same weight ratio (1: 1: 1) of the upper, middle and lower parts for each country of origin.

표 2. 국내산 녹용 발효추출물의 유산균수 측정

Table 2. Measurement of the number of lactic acid bacteria after fermentation of antler extract

Culture strain name	Culture substrate	Number of viable cells
<i>Bifidobacterium(B.) longum</i> *	Distilled water	Lactobacillus was not detected
<i>Lactobacillus(LB.) plantatarum</i> *	Distilled water	Lactobacillus was not detected
<i>Lactobacillus acidophilus</i> *	Distilled water	2.52 x 10 ⁴ (cfu/ml)
Mixture of 8 types of lactic bacteria*	Distilled water	Lactic bacteria was not detected
<i>Bifidobacterium longum</i> *	Antler water extract (AWE)	2.04 x 10 ⁷ cfu/ml
<i>Lactobacillus plantatarum</i> *	Antler water extract (AWE)	2.38 x 10 ⁷ cfu/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i> *	Antler water extract (AWE)	2.56 x 10 ⁷ cfu/ml
Mixture of 8 types of lactic bacteria*	Antler water extract (AWE)	5.0 x 10 ⁷ cfu/ml
Protease and <i>B. longum</i> **	AWE after protease reaction***	9.54 x 10 ⁷ cfu/ml
Protease and <i>Lb. plantatarum</i> **	AWE after protease reaction	2.84 x 10 ⁷ cfu/ml
Protease and <i>Lb. acidophilus</i> **	AWE after protease reaction	3.00 x 10 ⁷ cfu/ml
Protease and 8 types of lactic bacteria**	AWE after protease reaction	1.97 x 10 ⁸ cfu/ml

* Fermentation of lactic acid bacteria for 2 days at 37°C.

** Fermentation of lactic acid bacteria for 2 days at 37°C after protease reaction with Maxazyme NNPs DS for 1 days at 50°C.

상대: 중대: 하대 (1: 1: 1, w/w)의 비율을 동일하게 배합하여 시료로 사용한 데 그 원인이 있는 으로 고찰되었다(Table 1).

2. 녹용 물추출물의 유산균 발효

증류수를 기질로 하여 본 실험에서 사용한 유산균 starter 4종을 각각 가하여 배양 시험결과는 Table 2에 서와 같이 유산균이 거의 배양되지 않았다. 다만 *Lactobacillus acidophilus* 배양시험에서는 극히 일부 배양이 되었으나, 측정된 유산균 수는 2.52 x 10⁴ (cfu/mL) 으로 녹용 물추출물을 기질로 하여 배양된 결과에 비하여 매우 낮았다. 그러나 녹용 추출물을 기질로 하여 유산균 starter 제품 4종을 각각 가하여 배양 시험결과 유산균배양 결과 측정된 유산균수는 2.04 x 10⁷ ~ 1.12 x 10⁸으로 대체로 이들 유산균의 배양은 양호하였다.

따라서 증류수를 기질로하여 배양한 결과와 대비하여 비교해 볼 때 녹용 추출물은 유산균 배양에 매우 적합한 영양원으로 활용이 가능함을 알 수 있었다. 녹용의 단백질 함량이 부위에 따라서 다소 상이하나 약 40 ~ 50% 함유된 것으로 보고되었다. 본 실험에서 프테아제 제품류 Maxazyme NNP DS을 녹용 물추출물에 2%(w/v) 농도로 첨가하여 50°C에서 1일간 효소반응의 과정에서 단백질을 가수분해하였다. 그 다음에 유산균 starter 제품 4종을 각각 첨가하여 유산균배양 결과 측정된 유산균 수는 2.84 x 10⁷ ~ 1.97x 10⁸ cfu/mL으로 유산균 배양효과가 더 양호하였다. 따라서 유산균 배양

과정에 녹용 추출물에 함유된 단백질을 물 가용성 물질이 증가되도록 펩티드나 아미노산으로 가수분해 전환 과정은 유산균을 배양에서 유산균의 증식효과가 있었다(Table 2).

3. 총 폴리페놀 함량 측정

3.1. Gallic acid 표준검량선 작성

녹용 물추출액, 유산균 발효구 및 protease 효소 반응 후 유산균 발효액의 총폴리페놀 함량을 정량하기 위하여 gallic acid 농도별 표준액을 50% Folin & ciocaltue's phenol reagent 방법으로 발색 후 microplate reader를 이용하여 750nm에서 흡광도를 측정하여 Fig. 1과 같이 표준 검량선을 작성하여 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

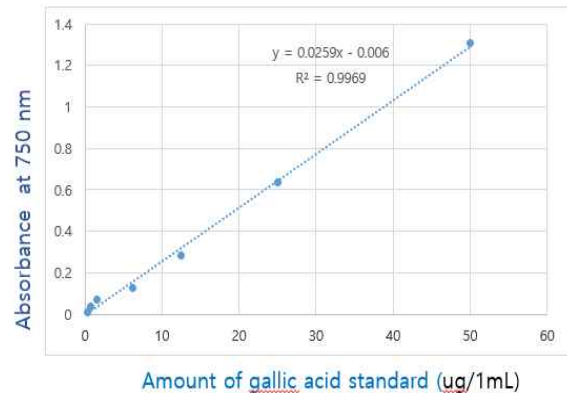


그림 1. 총폴리페놀 측정을 위한 갈산의 표준검량선

Figure 1. Standard calibration curve of gallic acid for determining total polyphenols

표 3. 국내산 녹용 발효추출물의 총 폴리페놀 함량 측정

Table 3. Total polyphenol Content of lactic acid fermentation of deer antler water extract

Samples	Amounts (mg/ml)	Remarks
Antler water extract(AWE)	8.47 ± 0.32	Water extract of Korea deer antler
AWE with <i>B. longum</i>	5.40 ± 0.19	lactic fermentation*
AWE with <i>Lb. Plantarum</i>	5.79 ± 0.11	lactic fermentation*
AWE with <i>Lb. acidophilus</i>	6.26 ± 0.11	lactic fermentation*
AWE with 8 types of lactobacillus	4.82 ± 0.12	lactic fermentation*
AWE with Maxazyme NNP DS (M**)	20.51 ± 0.68	Protease reaction of Maxazyme NNP DS(M**)
Lactobacillus acidophilus*	Antler water extract (AWE)	2.56 x 10 ⁷ cfu/ml
AWE with M** and <i>B. longum</i> *	15.13 ± 0.43	M** and lactic fermentation*
AWE with M** and <i>Lb. Plantarum</i> *	14.27 ± 0.52	M** and lactic fermentation*
AWE with M** and <i>Lb. acidophilus</i> *	20.58 ± 0.62	M** and lactic fermentation*
AWE with M** and 8 types of lactic bacteria*	16.86 ± 0.64	M** and lactic fermentation*

* Fermentation of lactic acid bacteria for 2 days at 37°C.

** Protease reaction with Maxazyme NNP DS for 1 day at 50°C.

3.2. 총 폴리페놀 함량 측정

녹용 추출물 대조구의 총 폴리페놀 함량은 8.47% 였으나 유산균 starter 4종류로 각각 직접 발효한 발효 배양물 중에는 총 폴리페놀의 함량이 4.82~6.26 mg/mL로 대조구 보다 오히려 감소되는 경향이였다. 이것은 유산균 발효과정에서 포도의 폴리페놀성분이 유산균 증식에 효과가 있었다는 보고를 고려해 볼 때, 본 실험에서 녹용 추출물 대비 녹용 추출물을 유산균 starter 4종류로 발효한 경우에 총 폴리페놀 함량이 감소된 것은 유산균이 증식되는 과정에서 폴리페놀이 먹이로 일부 사용되었을 가능성이 있을 것으로 고찰되었으며 이점에 대하여 추후 검토가 요망된다. 한편, 유산균 starter 4종을 각각 첨가하여 37°C에서 2일 간 발효시킨 유산균 직접 발효구에 비하여, 프로테아제 Maxazyme NNP DS 효소반응 후 유산균 stater 4 종 발효구에서는 14.27~20.58 ug/mL로 높은 증가율을 보였다. 따라서 유산균 발효과정에서 총 폴리페놀의 함량 증대를 위해서는 녹용추출물에 함유된 단백질을 가수분해 공정이 필요함을 알 수 있었다. 그러므로 유산균 발효 전 공정에서 적합한 프로테아제 효소반응으로 물에 불용성인 단백질을 물에 가용성인 유리아미노산이나 펩티드 같은 저분자 질소화합물로 전환 한 다음에 유산균 발효가 매우 효과적인 공정임을 확인할 수 있었다(Table 3).

4. 총 플라보노이드 함량 측정

4.1. Quercetin 표준검량선 작성

녹용 추출액 및 유산균 발효구의 총 플라보노이드 함량을 정량하기 위하여 Fig. 2와 같이 quercetin 농도별 표준 검량선을 작성하였다. 측정 방법은 녹용 물추출액, 유산균 stater 4종 발효구, protease 효소 반응구 및 protease 효소 반응 후 유산균 starter 4종 발효구를 각각 aluminum chloride reagent 방법으로 발색 한 다음 microplate reader를 이용하여 430nm에서 흡광도를 측정하여 Fig. 2 와 같이 표준 검량선을 작성하여 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

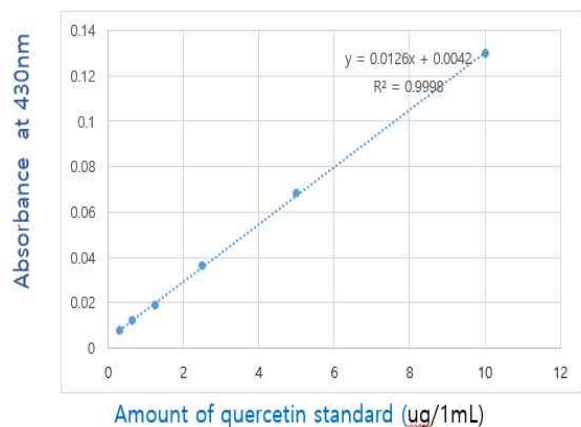


그림 2. 총플라보노이드 측정을 위한 퀘르세틴 표준검량선
Figure 2. Standard calibration curve of quercetin for determining total flavonoids

표 4. 국내산 녹용 발효추출물의 총플라보노이드 함량 측정

Table 4. Total flavonoids Content of lactic acid fermentation of deer antler water extract

Samples	Amounts (mg/ml)	Remarks
Korea deer antler extract (AWE)	2.31 ± 0.22	Water extract of Korea deer antler
AWE with <i>B. longum</i>	2.05 ± 0.18	lactobacillus fermentation*
AWE with <i>Lb. Plantarum</i>	2.21 ± 0.23	lactobacillus fermentation*
AWE with <i>Lb. acidophilus</i>	1.52 ± 0.23	lactobacillus fermentation*
AWE with 8 types of lactobacillus	1.68 ± 0.06	lactobacillus fermentation*
AWE with Maxazyme NNP DS(M	5.61 ± 0.31	Protease reaction of Maxazyme NNPDS(M**)
AWE with M** and <i>B. longum</i> *	5.71 ± 0.05	M** and lactic fermentation*
AWE with M** and <i>Lb. Plantarum</i> *	7.22 ± 0.09	M** and lactic fermentation*
AWE with M** and <i>Lb. acidophilus</i> *	8.31 ± 0.14	M** and lactic fermentation*
AWE with M** and 8 types of lactic bacteria*	7.12 ± 0.05	M** and lactic fermentation*
AWE with M** and 8 types of lactic bacteria*	16.86 ± 0.64	M** and lactic fermentation*

* Fermentation of lactic acid bacteria for 2 days at 37°C.

** Fermentation of lactic acid bacteria for 2 days at 37°C after protease reaction with Maxazyme NNP DA for 1day at 50°C.

4.2. 총 플라보노이드 함량 측정

녹용 추출물 대조구의 총 플라보노이드 함량은 2.31 ug/mL이었으며, 유산균 starter 4종류로 각각 발효한 결과 총 플라보노이드 함량은 1.52~2.21 ug/mL로 함량 변화가 거의 없거나 다소 감소되는 경향이였다. 따라서 녹용 추출물의 유산균 단독 발효과정에서는 총 플라보노이드의 함량이 증가되는 경향은 없었으며 오히려 약간 감소되는 경향을 보였다. 이것은 유산균 발효과정에서 포도의 폴리페놀성분이 유산균 증식에 효과가 있었다는 보고를 고려해 볼 때, 본 실험에서 녹용의 유산균 발효구에서도 폴리페놀에 속하는 플라보노이드의 감소와도 관련이 있을 것으로 고찰되었으며 이점에 대하여 추후 검토가 요망된다. 한편 녹용 추출물에 protease을 첨가하여 효소 반응구에서는 총 폴리페놀 함량은 5.61 mg/mL로 대조구 녹용추출물 대비 2배 이상이 증가되었으며, protease 첨가 효소반응 후 유산균 starter 4종 발효구의 총 폴리페놀의 함량도 5.82 ~ 8.33 mg/mL로 증가를 보였다(Table 4).

결론적으로 녹용 추출물은 유산균 단독 배양만으로는 따라서 유산균 starter 4종 배양구에서는 총 플라보노이드의 함량이 거의 변화가 없거나 다소 감소 경향을 보였으나, protease 효소 반응 후 starter 4종 유산균 배양구에서는 증가되는 경향을 뚜렷하게 보였다. 이것은 protease로 고분자 단백질이 가수분해 되는 과정에서 가용성 저분자의 펩티드 및 유리아미노산류를 증가시

킴으로써 유산균이 증식이 증가되고 유산균 발효과정 이 촉진됨에 따라서 플라보노이드 생성이 촉진되었음을 시사해 준다. 플라보노이드 함량을 증가시킬 수 없었다. 그러나 단백질 가수분해 효소인 protease 효소 반응구 및 protease 효소 반응 후 유산균 발효과정에서는 플라보이드 함량의 증가 경향이 뚜렷하였다. 따라서 유산균 발효과정에서 총 플라보노이드 함량 증대를 위해서는 protease 효소 반응 후 유산균 발효방식이 매우 효과적임을 확인할 수 있었다(Table 4).

5. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능을 처리구 별로 비교해 볼 때 대조구는 17.98% 였으며 *B. longum*, *Lb. Plantarum* 및 *Lb. acidophilus*의 3종 유산균 발효구는 18.94%, 17.03% 및 18.97%로 거의 유사하였다. 그러나 8종의 유산균이 혼합된 8 types of lactobacillus 유산균 발효구에서는 DPPH 라디칼 소거능이 22.75%로 현저한 증가를 보였다. 한편 Maxazyme NNP DS 프로테아제 효소 반응구에서는 DPPH 라디칼 소거능이 41.98%로 그 활성이 현저하게 증가되었으며, Maxazyme NNP DS 효소반응 후 *B. longum*, *Lb. acidophilus* 및 *Lb. acidophilus* 유산균 발효구는 40.06~42.90으로 거의 유사하였으나 *Lb. Plantarum* 유산균 발효구는 32.82%로 감소를 보였다. 전반적으로 볼 때 녹용추출물 대조구의 DPPH 라디칼 소거능 17.98%에 비하여 protease 효소 반응구는 41.98%

표 5. 국내산 녹용 발효추출물의 DPPH 라디칼 소거능 분석

Table 5. DPPH radical scavenging activity of lactobacillus fermentation of deer antler water extract

Samples	Activity (%) ¹⁾	Remarks
Korea deer antler extract (AWE)	17.98 ± 1.62	Water extract of Korea deer antler
AWE with <i>B. longum</i>	18.94 ± 3.62	lactic fermentation*
AWE with <i>Lb. Plantarum</i>	17.03 ± 2.38	lactic fermentation*
AWE with <i>Lb. acidophilus</i>	18.97 ± 1.52	lactic fermentation*
AWE with 8 types of lactobacillus	22.75 ± 1.22	lactic fermentation*
AWE with Maxazyme NNP DS	41.98 ± 0.63	Protease reaction of Maxazyme NNPS(M**)
AWE with M** and <i>B. longum</i>	40.07± 3.00	M** and lactic fermentation*
AWE with M** and <i>Lb. Plantarum</i>	32.82 ± 2.23	M** and lactic fermentation*
AWE with M** and <i>Lb. acidophilus</i>	40.06 ± 3.43	M** and lactic fermentation*
AWE with M** and 8 types of lactobacillus	42.90 ± 2.15	M* and lactic fermentation**
Gallic acid	72.50 ± 1.95	A standard of natural phenol component
Quercetin	69.72 ± 2.18	Standard of natural flavonoid component
Butylated hydroxytoluene(BHT)	43.00 ± 3.86	A representative synthetic antioxidant

* Fermentation of lactic acid bacteria for 2 days at 37°C.

** Fermentation of lactic acid bacteria for 2 days at 37°C after protease reaction with Maxazyme NNP DS for 1 day at 50°C.

및 protease 효소반응 후 유산균 발효구에서는 32.82~42.90%로 현저한 증가효과가 있었다. 따라서 녹용 추출물의 유산균 발효공정의 전처리 공정에서 protease 효소반응 공정은 DPPH 라디칼 소거능의 증대를 위하여 매우 필요한 공정임을 시사해 주었다. 한편 프로테아제 효소 반응 후 유산균 발효구는 표준성분 대조구로 사용된 gallic acid 및 quercetin에 비하여 이와 같은 유산균 발효구들은 DPPH 라디칼 소거능 낮았으나, 육류 가공품에 주로 사용되고 있는 합성 항산화제인 BHT와는 그 활성이 대체로 유사한 경향이었다(Table 5).

6. TBA 값 측정에 의한 항산화능 평가

Linoleic acid/phosphate buffer 기질에 대한 녹용 추출물 대조구의 TBA 값 측정에 의한 항산화능은 20.61% 였다. 유산균 발효구에서는 *Lb. acidophilus* 41.41% > 8 types of lactobacillus 38.54% > *Lb. Plantarum* 32.13% > *B. longum* 20.18% 순으로 유산균 종류에 따라서 차이는 있었으며 녹용 추출물의 발효과정에서 Table 6 에서와 같이 유산균 증식과 더불어 항산화능 증대 효과는 현저하였다. 한편 녹용 추출물의 Maxazyme NNP DS 프로테아제 효소 반응구의 항산화능은 16.70%로 녹용 추출물 대조구 20.61%에 비하여 그 효능이 다소 낮았다. 그러나 프로테아제 반응 후 유산균 발효구에서는 *B. longum* 29.22%, 8 types of lactobacillus 28.84% 및

Lb. acidophilus 28.57% 으로 거의 유사하게 녹용 추출물 대조구 대비 항산화 증대 효과를 보였다. 그러나 녹용 추출물의 Maxazyme NNP DS 프로테아제 효소 반응 후 유산균 발효구는 *Lb. Plantarum* 16.79%로 Maxazyme NNP DS 효소 반응구 16.70과 거의 유사하였다. 전반적으로 볼 때 항산화능은 녹용 추출물의 20.61%에 비하여 유산균 4종의 각각 발효구는 20.18~41.41%로 그 효과가 대체로 양호하였다. 또한 protease 효소반응 후 유산균 3종 발효구는 28.57~29.22%로 녹용 추출물 대비 증가되었다. 그러나 *Lb. Plantarum* 유산균 발효구에서는 32.13%로 증가를 보였으나 protease 효소반응 후 *Lb. Plantarum* 유산균 발효구에서는 16.79로 감소를 보였다. 본 실험에서 녹용 추출물의 항산화능을 비교하기 위하여 사용한 표준성분의 항산화능은 BHT 76.93% > gallic acid 36.91% > quercetin 21.26%로 항산화제 성분에 따라서 항산화능의 차이가 매우 크게 나타났다. 합성 항산화제인 BHT의 경우 DPPH 라디칼 소거능은 gallic acid 및 quercetin에 비하여 매우 낮으나 TBA 값 측정에 의한 항산화능은 현저하게 높았다(Table 6).

V. 결 론

녹용 물추출물에 유산균 starter 제품 4종을 각각 가하여 유산균배양 결과 측정된 유산균 수는 $2.04 \times 10^7 \sim$

표 6. 국내산 녹용 발효추출물의 TBA value 분석

Table 6. Antioxidant activity of lactic acid fermentation products using water extract of antler as a substrate

Samples	Activity (%) [#]	Remarks
Korea deer antler extract (AWE)	20.61 ± 1.92	Water extract of Korea deer antler
AWE with <i>B. longum</i>	20.18 ± 2.81	lactic fermentation*
AWE with <i>Lb. Plantarum</i>	32.13 ± 0.69	lactic fermentation*
AWE with <i>Lb. acidophilus</i>	41.41 ± 2.26	lactic fermentation*
AWE with 8 types of lactic bacteria*	38.54± 1.80	lactic fermentation*
AWE with Maxazyme NNP DS(M**)	16.70 ± 1.72	Protease reaction of Maxazyme NNP DS(M**)
AWE with M** and <i>B. longum</i> *	29.22± 1.20	M** and lactic fermentation*
AWE with M** and <i>Lb. Plantarum</i> *	16.79± 1.72	M** and lactic fermentation*
AWE with M** and <i>Lb. acidophilus</i> *	28.57 ± 2.56	M** and lactic fermentation*
AWE with M** and 8 types of lactic bacteria*	28.84 ± 2.93	M* and lactic fermentation**
Gallic acid	36.91 ± 2.14	A standard of natural phenol component
Quercetin	21.26 ± 1.07	Standard of natural flavonoid component
Butylated hydroxytoluene(BHT)	76.93 ± 0.20	A representative synthetic antioxidant

[#] Antioxidant activity of lactobacillus fermentation products determined by TBA value on the linoleic acid/phosphate buffer substrate. * Lactic fermentation** : culture for 2 days at 37°C.

** M: Protease reaction of Maxazyme NNP DS for 1 day at 50°C.

5.0 x 10⁷였고 프로테아제를 첨가 반응 후 유산균 4종의 배양구에서는 2.84 x 10⁷ ~ 1.97 x 10⁸으로 증가를 보였다. 유산균 4종으로 직접 발효할 경우는 총 폴리페놀의 함량이 4.58 ~ 6.02 mg/mL로 낮았으나 protease 처리 단백질 가수분해 후 유산균 발효구는 14.03~ 20.34 mg/mL로 그 함량이 현저하게 증가되었다. 녹용 추출물의 총 플라보노이드 함량은 대조구 2.51 mg/mL였고 유산균 4종 발효구에서는 1.76 ~ 2.42 mg/mL로 유사한 경향이였다. 그러나 녹용 추출물에 protease 효소반응 후 유산균 4종 발효구의 총 플라보노이드 함량은 5.82 ~ 8.33 mg/mL로 증가 경향을 보였다. DPPH 라디칼 소거능은 대조구의 17.98%에 비하여 4종 유산균 발효구는 17.03~22.75%로 증가를 보였다. 한편 프로테아제 효소 반응구에서는 41.98%였으며 프로테아제 효소 반응 후 *B. longum*, *Lb. acidophilus* 및 *Lb. acidophilus* 유산균 발효구는 40.06~42.90으로 현저한 증가를 보였다(Table 6).

녹용 추출물 대조구의 항산화능은 20.61% 였고, 유산균 발효구에서는 *Lb. acidophilus* 41.41 % > 8 types of lactobacillus 38.54% > *Lb. Plantarum* 32.13% > *B. longum* 20.18% 순으로 항산화능 증대 효과는 현저하였다. 그러므로 녹용 추출물의 유산균 증식을 촉진하고 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 증가시키고 DPPH 라디칼 소거능과 항산화능의 증대를 위하여 녹용 추출물의 단백질을 가수분해 할 수 있는 protease

효소반응 공정을 거친 다음에 유산균 발효가 효과적이였다.

References

- [1] H. Y. Kim, "The effects of fruit and vegetable bark extract on learning ability and memory improvement," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4, No.3, pp. 261-267, 2018. <http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.3.261>.
- [2] D.B. Kim, E.Y. Ahn, and E.J. Kim, "Improvement of insulin resistance by curcumin in high fat diet fed mice", *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4, No. 1, pp. 315-323, 2018. <http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.1.315>.
- [3] H.K. Kim, "The functional effects of anti-microbial activity and anti-inflammatory seaweed polysaccharide extracts," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4, No.2, pp. 155-163, 2018. <http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.2.155>.
- [4] P. J. Park, Y. J. Jeon, S. H. Moon, S. M. Lee, C. H. Lee, B. T. Jeon and D. K. Ahn, "Free radical scavenging activity of nokjoongtang prepared from antler and various oriental medicinal materials," *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* Vol. 25, pp. 344-349, 2005.
- [5] H. Y. Chung, B. Sung, K. J. Jung, Y. Zou and B. P. Yu, "The molecular inflammatory process

- in aging,” *Antioxid. Redox Sign.* Vol. 8, pp. 572–581, March 2006. DOI : <http://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2010.30.6.989>
- [6] S. H. Lee, L. J. Hong, H. G. Park, S. S. Ju and G. T. Kim, “Functional characteristics from the barley leaves and its antioxidant mixture,” *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* Vol. 46, pp. 333–337, March 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.9721/KJFST.20003.46.3.337>
- [7] Y. Christen, “Oxidative stress and Alzheimer disease,” *Am J. Clin. Nutr.* Vol. 71, pp. 621–629, 2000. DOI : <http://dx.doi.org/10.14478/ace.2016.1027>.
- [8] E. K. Han, E. J. Jung, J. Y. Lee, Y. X. Jin and C. K. Chung, “Antioxidative activity of ethanol extracts from different parts of *Taraxacum officinale*,” *J. Korean. Soc. Food.Sci. Nutr.* Vol. 40, pp.56–62, January 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.14478/ace.2016.1027>.
- [9] J. H. Lee and J. W. Jhoo, “Antioxidant activity of different parts of *Lespedeza bicolor* and isolation of antioxidant compound,” *Korean. J. Food. Sci. Technol.* Vol.44, pp. 763–771, September 2012. DOI: <https://doi.org/10.9721/KJFST.2012.44.6.763>.
- [10] H. I. Kang, J. Y. Kim, S. J. Kwon, K. W. Park, J. S. Kang and K. I. Seo, “Antioxidative effects of peanut sprout extracts,” *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* Vol. 39, pp. 941–946, March 2010. DOI: <https://doi.org/10.3746/jkfn.2010.39.7.941>.
- [11] Y. Lu and L. Y. Foo, “Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace,” *Food Chem.* Vol. 68, pp. 81–85, January, 2000. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00167-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00167-3).
- [12] J. Y. Cha, H. J. Kim, C. H. Chung and Y. S. Cho, “Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*,” *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* Vol. 28, pp.1310–1315, November 1999.
- [13] R. Tsao, “Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols,” *Nutrients.* Vol. 2, No. 12. pp. 1231–1246, December, 2010. DOI:<https://doi.org/10.3390/nu2121231>.