



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

갯까치수영 추출물 및 발효물의
성분과 생리활성에 관한 비교 연구

濟州大學校 大學院

化學科

高 瑪 워

2017年 8月



갯까치수영 추출물 및 발효물의 성분과 생리활성에 관한 비교 연구

指導教授 李 南 昊

高 마 위

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2017年 8月

高마위의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長
委 員
委 員

玄 昌 久
金 原 亨
李 南 昊



濟州大學校 大學院

2017年 8月

Comparative Studies on the Constituents and
Bioactivities Using the Extracts and Fermentation
Products from *Lysimachia mauritiana* Lam.

Ko, Ma Wo

(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Master of Science

August, 2017

This thesis has been examined and approved

Committee Chairman, CHANG-GU HYUN
Dissertation Committee, Won Hyung Kim
Dissertation Committee, Nam Ho Lee

08/17
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Schemes	vii
List of Tables	vii
List of Figures	viii
List of Abbreviations	x
Abstract	xii
I. 서론	1
1. 천연물 연구의 중요성	1
2. “제주”의 유망 소재 중 하나인 염생식물	2
3. 미생물에 의한 천연물의 생물전환	3
4. 발효 후 어떤 효능이 강화될까?	5
II. 재료 및 방법	8
1. 시약 및 기기	8
2. 실험재료	9
3. 사용균주 및 배지	9
4. 추출, 분획 및 분리	11
4-1. 갯까치수영의 추출 및 분획	11
4-2. 갯까치수영 발효물의 추출 및 분획	12
4-3. 추출물에서 Compound 1의 분리 과정	12
4-4. 발효 후 증가된 화합물인 Compound 2, 3의 분리 과정	13
5. 균주 선정 및 발효	14
5-1. 발효 배지 조제	14
5-2. 발효 균주의 선정 및 배양	15

5-3. 갯까치수영 추출물의 최적 발효 조건 결정	16
5-4. 회분식(batch) 발효에 대한 평가	17
5-4-1. 환원당 분석	17
5-4-2. TLC 분석	17
5-4-3. HPLC 분석	18
6. 생리 활성 비교 평가	18
6-1. 항산화 활성 실험	18
6-1-1. 총 폴리페놀 함량 측정	18
6-1-2. 총 플라보노이드 함량 측정	19
6-1-3. DPPH radical 소거 활성 측정	20
6-1-4. Superoxide radical 소거 활성 측정(NBT/XO assay)	21
6-1-5. Xanthine oxidase 저해 활성 측정(XO assay)	22
6-2. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험	23
6-2-1. 세포배양	23
6-2-2. Nitric oxide 생성 억제 효능 평가	24
6-2-3. 세포독성 평가(LDH, MTT assay)	24
6-2-4. Pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β)과 PGE ₂ 생성 억제 효능 평가	25
6-3. 항균 활성 실험	26
6-3-1. 시험균주 배양	26
6-3-2. Paper disc diffusion assay	27
6-3-3. Minimum inhibitory concentration test	27
6-3-4. Minimum bactericidal concentration test	27
III. 결과 및 고찰	29
1. 화합물의 구조 결정	29
1-1. Compound 1의 구조해석	29
1-2. Compound 2의 구조해석	35

1-3. Compound 3의 구조해석	38
2. <i>A. sojae</i> 에 의한 갯까치수영 추출물의 발효	41
2-1. <i>A. sojae</i> 에 의한 갯까치수영 추출물 발효의 최적 조건	41
2-2. 발효의 역할에 대한 예측	43
3. 발효 전·후 생리 활성 비교 평가	46
3-1. 항산화 활성 실험 결과	46
3-1-1. 총 폴리페놀 함량 측정	46
3-1-2. 총 플라보노이드 함량 측정	47
3-1-3. DPPH radical 소거 활성	49
3-1-4. Superoxide radical 소거 활성	52
3-1-5. Xanthine oxidase 저해 활성	54
3-2. 항염 활성 실험 결과	55
3-2-1. RAW 264.7 cell에서의 nitric oxide 생성 억제 효능 및 세포독성 평가	55
3-2-2. Pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β)과 PGE ₂ 생성 억제 효능 평가	58
3-3. 항균 활성 실험 결과	60
3-3-1. Paper disc diffusion법에 의한 항균 활성 측정	60
3-3-2. MIC 및 MBC 측정	62
 IV. 요약 및 결론	 63
 V. 참고문헌	 65

List of Schemes

Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fractionation from <i>L. mauritiana</i> Lam.	11
Scheme 2. Procedure of extraction and solvent fractionation from fermented extracts of <i>L. mauritiana</i> Lam.	12
Scheme 3. Procedure of isolation for compound 1	13
Scheme 4. Procedure of isolation for compound 2, 3	14

List of Tables

Table 1. Strains used for fermentation	10
Table 2. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 1 (500 MHz, CD ₃ OD)	31
Table 3. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 2 (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	36
Table 4. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 3 (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	39
Table 5. Changes in total polyphenol and total flavonoid contents after fermentation of <i>L. mauritiana</i> Lam. extracts and solvent layers	49
Table 6. The Anti-oxidant potential of the extracts and solvent layers as calculated IC ₅₀ values from the DPPH assay	50
Table 7. The Anti-oxidant potential of the extracts and solvent layers as calculated IC ₅₀ values from the NBT/XO assay	53
Table 8. The Anti-oxidant potential of the extracts and solvent layers as calculated IC ₅₀ values from the XO assay	54
Table 9. Representative results of effect of extract and solvent layers from <i>L. mauritiana</i> Lam. and several antibiotics using paper disc diffusion method	61

Table 10. Minimum inhibitory concentration (MIC) & minimum bactericidal concentration (MBC) of extract and solvent layers from <i>L. mauritiana</i> Lam. against five disease microorganisms	62
--	----

List of Figures

Fig. 1. General glycosidase mechanisms.	5
Fig. 2. Picture of <i>Lysimachia mauritiana</i> Lam.	9
Fig. 3. Eight strains cultured at different temperatures in GKS2A2 medium.	15
Fig. 4. Graph showing the colour change of DPPH from purple to yellow when it is exposed to an antioxidant substance.	20
Fig. 5. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD.	32
Fig. 6. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD.	32
Fig. 7. HSQC spectrum of compound 1 in CD ₃ OD.	33
Fig. 8. HMBC spectrum of compound 1 in CD ₃ OD.	33
Fig. 9. Chemical structure of compound 1	34
Fig. 10. Mass spectrum of compound 1	34
Fig. 11. Chemical structure of compound 2	36
Fig. 12. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in DMSO- <i>d</i> ₆	37
Fig. 13. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 in DMSO- <i>d</i> ₆	37
Fig. 14. Chemical structure of compound 3	39
Fig. 15. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 in DMSO- <i>d</i> ₆	40
Fig. 16. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 in DMSO- <i>d</i> ₆	40
Fig. 17. The selected culture conditions for mass production of <i>A. sojae</i> by using one factor at a time.	42
Fig. 18. Time profiles of residual glucose concentration (■), pH (▲) and	

D.C.W. (●) in the batch culture at 30°C, pH 6, 300 rpm of inoculated with 3% <i>A. sojae</i>	43
Fig. 19. Comparison of HPLC chromatogram of non- and fermented extracts and solvent layers from <i>L. mauritiana</i> Lam.	44
Fig. 20. Prediction of the role of fermentation in compound changes.	45
Fig. 21. Total polyphenolic compound contents of non- and fermented <i>L. mauritiana</i> Lam. extracts and solvent layers.	46
Fig. 22. Total flavonoid contents of non- and fermented <i>L. mauritiana</i> Lam. extracts and solvent layers.	48
Fig. 23. Anti-oxidant potential on extract and solvent layers of non-fermented <i>L. mauritiana</i> Lam.	51
Fig. 24. Anti-oxidant potential on extract and solvent layers of fermented <i>L. mauritiana</i> Lam.	51
Fig. 25. DPPH radical scavenging activity of <i>L. mauritiana</i> Lam. extracts and solvent layers by concentration.	52
Fig. 26. Superoxide radical scavenging activity by concentration of <i>L. mauritiana</i> Lam. extracts and solvent layers.	53
Fig. 27. Xanthine oxidase inhibitory effect rates of extracts and solvent layers from <i>L. mauritiana</i> Lam.	55
Fig. 28. NO production inhibitory activities and cytotoxicity of extract and solvent layers of <i>L. mauritiana</i> Lam.	56
Fig. 29. NO production inhibitory activities and cytotoxicity of <i>n</i> -hexane, ethyl acetate layer and <i>n</i> -butanol layer of <i>L. mauritiana</i> Lam. by concentration.	57
Fig. 30. Effect of <i>n</i> -hexane, ethyl acetate and <i>n</i> -butanol layers from <i>L. mauritiana</i> Lam. on LPS-induced PGE ₂ production in RAW 264.7 cells by concentration.	58
Fig. 31. Effect of <i>n</i> -hexane, ethyl acetate and <i>n</i> -butanol layers from <i>L. mauritiana</i> Lam. on LPS-induced TNF- α , IL-1 β and IL-6 production in RAW 264.7 cells by concentration.	59

List of Abbreviations

<i>A. sojae</i>	<i>Aspergillus sojae</i>
CC	column chromatography
CD ₃ OD	methanol- <i>d</i> ₄
CFU	colony forming unit
CHCl ₃	chloroform
CH ₃ COCH ₃	acetone
CH ₃ COOH	acetic acid
COSY	correlation spectroscopy
COX-2	cyclooxygenase-2
d	doublet
dd	doublet of doublet
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	dimethylsulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
D.W	distilled water
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
Fr.	fraction
H ₂ SO ₄	sulfuric acid
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	high-performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
KCCM	korean culture center of microorganisms
<i>L. mauritiana</i> Lam.	<i>Lysimachia mauritiana</i> Lamarck
IC ₅₀	inhibition concentration of 50%
iNOS	inducible nitric oxide synthase
int	integration
IL-1β	interleukin-1 beta
IL-6	interleukin-6
<i>J</i>	coupling constant (Hz)
LPS	lipopolysaccharide
m	multiplet
MeOH	methanol

MP	MPLC fraction
MTT	dimethylthiazolyl diphenyl tetrazolium salt
Na ₂ CO ₃	sodium carbonate
NaOH	sodium hydroxide
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
NF- κ B	nuclear factor- κ B
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
NMR	nuclear magnetic resonance
NO	nitric oxide
O.D	optical density
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
PGs	prostaglandins
RT	retention time
s	singlet
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
sepha	sephadex LH-20 column chromatography sublayer
t	triplet
TLC	thin layer chromatography
TNF- α	tumor necrosis factor- α
V	vial
VLC	vacuum liquid chromatography

Abstract

Comparative Studies on the Constituents and Bioactivities Using
the Extracts and Fermentation Products from *Lysimachia mauritiana* Lam.

Ko, Ma Wo

Department of Chemistry, Graduate School

Jeju National University, Korea

Supervised by Professor Nam Ho Lee

In this study, the extracts and their fermentation products from *Lysimachia mauritiana*, a wild plant native to Jeju, was investigated. Especially, the chemical constituents and biological activities were compared between the raw (before fermentation) and fermented extracts.

For the fermentation of *Lysimachia mauritiana*, a strain *Aspergillus sojae* was selected under the condition of 30°C temperature, pH 6, 3% inoculum and 300 rpm agitation speed. Comparative analysis of HPLC spectrum revealed that peaks at RT 31.7 and 33.4 minutes were dramatically increased. And the compounds corresponding the peaks were isolated and analyzed by ¹H and ¹³C NMR spectra, and finally identified as flavonoids, kaempferol and quercetin. These results indicated that an enzyme glucosidase from *A. sojae* hydrolyzed the glycoside to produce the aglycon flavonoids. In addition, a flavonoid glycoside mauritianin was isolated from the *n*-butanol fraction of the raw extract.

Bioactivities (anti-oxidation, anti-inflammation, anti-bacteria) were also compared between the raw extracts and their fermentation extracts. For the DPPH radical scavenging activity tests, IC₅₀ was lowered from 445 µg/mL to

121 $\mu\text{g/mL}$ showing increased anti-oxidative activities after fermentation. On the superoxide radical scavenging activity studies, IC_{50} was also lowered from 158 $\mu\text{g/mL}$ to 104 $\mu\text{g/mL}$ after fermentation operation.

For the anti-inflammation activity studies, a macrophage RAW 264.5 cells were used. Nitric oxide (NO) production was monitored in the LPS-stimulated macrophage cells. High degree of NO inhibition was observed in *n*-hexane fraction of the fermented extract without cell-toxicities. Inhibition of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β) were also observed in *n*-hexane fraction.

Anti-bacterial activities were examined using paper disc diffusion method, and MIC/MBC were measured. For the strains of *P. acnes* CCARM 9010 and *C. albicans* KCTC 7965, *n*-butanol fraction of raw extract showed the anti-bacterial activities. However, these activities were almost disappeared in the fermented extracts.

The results demonstrated that the chemical constituents of the extracts from *L. mauritiana* were changed by the fermentation process. Upon the fermentation by *A. sojae*, the anti-oxidation and anti-inflammation activities were increased in the extracts.

I. 서론

1. 천연물 연구의 중요성

산업이 고도로 발달한 사회로 접어들면서 소득수준의 향상, 사회환경의 변화에 따른 식이의 서구화와 사무직 종사자의 증가 등으로 야기되는 암, 당뇨, 고혈압, 정신 질환 등 만성 또는 난치성 질환이 과거에 비해 급격히 증가하였다.^{1,2} 이에 따라 건강에 대한 관심이 고조되는 21세기 현대사회에서 의약품 오남용에 따른 부작용이 널리 인식되고 있고 이러한 만성 질환에 대해 치료보다는 예방적 개념이 도입되어 전통적으로 안전하게 사용되어 온 천연물(natural products) 혹은 천연물 유래 식품, 의약품, 화장품이 각광을 받고 있다.³⁻⁵

천연물은 미생물, 유기합성과 더불어 다양한 생리활성물질의 원천으로서 전체 생리활성물질의 약 1/3을 차지하고 있으며, 크게 1차 대사물(primary metabolite)과 2차 대사물(secondary metabolite)로 구별할 수 있다. 1차 대사물은 당, 지방, 단백질, 핵산과 같이 모든 생물에 존재하여 생명체의 기본대사에 관여하는 물질임에 반면, 2차 대사물은 알칼로이드(alkaloid), 터펜(terpene), 플라보노이드(flavonoid) 등과 같이 특정 생물에서 특징적으로 분포되어 있는 성분을 말한다. 일반적으로, 1차 대사물과 달리 2차 대사물은 생물체의 고유성분에 해당하고 독특한 생리활성을 보유하고 있다. 따라서 천연물화학의 연구 대상은 주로 2차 대사물에 치중되어 있다.⁶

현재까지 지구상에는 250,000 여종의 식물이 존재하지만 지금까지 탐색된 식물소재는 약 10% 만을 대상으로 해왔고, 미생물의 경우 1% 미만을 탐색 대상으로 삼아 왔다.⁷ 또한 새로운 생리활성물질의 발견 빈도가 점차 감소하여 현재에는 0.1-0.01% 수준이다.^{8,9} 그러나 현재 존재하는 합성 화합물 중에는 천연물 유래 화합물이 약 40%에 달하며 여전히 새로운 천연물자원으로부터 생리활성물질의 개발이 시도되고 있다.^{10,11}

우리나라와 중국, 일본 등에서는 오래전부터 자연으로부터 얻어지는 식물, 동물, 광물, 미생물 등을 가공하여 생약으로 사용하여 왔고, 따라서 천연물을 임상

에 사용한 경험이 역사적으로 풍부한 우리나라 경우 한의약이 발전되어 있다. 이를 현대 과학과 접목하려면 천연물 연구가 매우 중요한 수단이 된다. 예컨대 천연물과 전통약물 활용에 대한 연구의 발전 결과 고부가가치 천연물신약 개발 등으로 이어졌으며, 동아제약의 스티렌캡셀(2005년 기준 300억 매출)과 SK제약의 조인스의 경우가 시장에서 성공적인 천연물신약 제품화 사례로 손꼽히고 있다.¹² 천연물 유래 화합물을 합성 화합물과 비교했을 때 개발의 장점으로는 구조적, 생물학적 효능의 다양성, 표적단백질과의 상호작용에 의한 약리활성, 다양한 생리활성, 새로운 탐색법에 의한 새로운 생리활성물질의 발견, 새로운 생리활성 기작의 발견, 분자생물학, 화학 분야에 대한 생화학적 수단, 합성화합물을 위한 선도화합물(lead compounds) 등을 들 수 있다.¹³

이렇듯 비단 학술적 가치뿐 만 아니라 식품, 의약품, 화장품 분야의 산업적 가치도 뛰어난 천연물 소재의 개발은 날로 커져가는 세계시장과 함께 치열해지는 자원 경쟁에서 경쟁력을 갖추기 위해서도 우리 고유의 자원과 기술을 발전시킬 필요가 있기 때문에 이에 대한 연구는 더욱 중요해질 것으로 사료된다.

2. “제주”의 유망 소재 중 하나인 염생식물

각종 식물과 생약의 천연 생리활성 물질은 산과 들, 강과 바다 등에서 대부분 채배하거나 자생한 것을 사용하게 되는데, 사면이 바다인 제주는 해양 유래의 천연생물자원을 풍부하게 획득할 수 있는 지리적 위치에 있다. 그 중 해안을 조망해보자면, 해안은 육상과 해양의 물리적, 화학적 및 생물학적 요인이 복잡하게 얽혀있고, 조수간만에 의하여 시간과 공간적으로 환경의 변화가 심하며 토양의 높은 염분농도로 인하여 식물의 분포가 제한되는 독특한 지역이다. 이러한 해안 염습지의 염분토양에서 발아, 성장, 생식 등의 전생활사를 마칠 수 있는 식물을 염분이 없는 곳에서 생육하는 중생식물(glycophytes)과 비교하여 염생식물(halophytes)이라고 한다.¹⁴

염생식물은 주로 갯벌과 강 하구의 연안습지, 사구, 염전, 간척지 등에 분포하는데 이곳들은 주로 끊임없이 바닷물이 드나드는 토양으로 염분농도의 잦은 변화와 장기간 침수되는 서식 환경을 제공한다. 이러한 환경에서 자라는 염생식물

은 스트레스 상황을 극복하고자 자기 방어 물질 등을 생성하게 됨에 따라 풍부한 미네랄과 함께 매우 다양한 천연 생리활성 물질을 함유하고 있다.¹⁵⁻²⁰ 이러한 염생식물은 전 세계적으로 1,560여종이 분포하는 것으로 알려져 있으며, 우리나라에는 62종이 보고되어 있다.²¹

우리나라 서·남해안 지역은 갯벌과 해안염습지가 발달되어 있어 다양한 염생식물이 자생하고 있으며²², 제주 지역 또한 2001년 제주도내 해안 염습지 주변의 생태 조사 연구²³에 따르면 갯잔디, 갈대, 모새달, 천일사초, 갯하늘지기, 지채, 칠면초, 갯까치수영, 가는갯능쟁이, 갯능쟁이, 갯개미취, 큰비쭉, 갯질경, 황근, 갯대추 등 다양한 염생식물이 자생하고 있다고 보고되어 있다. 제주에서는 이를 자원화 및 이용도를 높이기 위해 큰비쭉, 애기달맞이꽃, 암대극, 애기수영 등 다양한 염생식물 대상의 향균, 항염, 항알러지 효능을 규명해 DB화 했다. 또한, 제주대 화장품과학연구센터는 생물종다양성연구소의 추출물 지원을 통해 현재 제주에 서식하는 염생식물에 대한 향산화, 미백 및 주름개선 소재화 연구를 진행하였다.²⁴

과거에는 바닷가 잡초로 여겨졌었지만, 고농도 염 조건에서 생존을 위해 다양한 생리활성물질을 생산하는 등의 이로운 특성이 밝혀짐으로써 식품 및 화장품 소재로 가치가 높다고 평가 받음과 동시에 아직 다 밝혀지지 않은 기능성으로 인해 다양한 산업적 가능성이 부각되고 있는 염생식물은 기능성 소재로서의 관련 연구가 활발히 진행 중이나 함초나 칠면초 등을 제외하고는 기본적인 스크리닝 수준으로 진행되었을 뿐이다.^{25,26} 이에 다양한 소재의 주요 활성 성분과 발효 등의 가공에 따른 활성 변화를 보는 등의 보다 다각적인 연구를 통해 지역 자원 활용 가능성 확대를 검색할 필요가 있을 것으로 사료된다.

3. 미생물에 의한 천연물의 생물전환

미생물을 이용하여 *in vitro*에서 인위적으로 체내의 대사과정을 모방, 배당체 형태의 생리활성물질을 무배당체로 전환하여 흡수율과 생리활성 증강, 천연물에 배당체를 결합하여 용해도, 쓴맛의 감소 및 감미효과의 증대, 화학합성이 어려운 화합물이나 전구체를 전환하여 수율을 향상 시키는 등에 관한 결과들이 많이 보

고되고 있다.^{27,28} 천연물 내에 존재하는 비활성 형태의 물질로부터 당 결합을 끊을 수 있는 β -glucosidase, pectinase, hemicellulase, lactase 및 cellulase 등의 효소나 이를 생산하는 미생물을 사용하여 천연물 내의 배당체 화합물을 무배당체 형태로 전환시켜 이로부터 특정 활성 형태의 유효물질 양을 증가시키거나 유효활성 물질을 효율적으로 추출, 정제하는 연구들도 진행되고 있다. 다양한 종류의 분해 효소를 생산하는 미생물을 이용하여 감귤의 배당체 형태를 무배당체 형태로 전환시키거나, 천연물을 발효하여 발효산물을 건조 분말로 만들어 특정 성분의 함량 증가, 추출 효율의 증가, 장내 효과 개선 및 소화 흡수율 등을 높일 수 있을 뿐 만 아니라^{29,30}, 발효를 통해 원래의 천연물 보다 생리활성이 증가되거나 새롭게 생합성된 대사산물의 생리활성을 기대할 수 있다.³¹ 항체호르몬제, 근육강화제, 항암제, 경구피임제, 진정제로 사용되고 있는 steroid 화합물에 filamentous fungi, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Streptomyces sp.* 등의 세균을 사용한 생물 전환으로 화학 합성이 어려운 유도체, steroid 화합물의 낮은 용해도 극복, site-selective oxygenation 등 새롭고 유용한 유도체의 개발에 대한 연구도 많이 진행되어 왔다. 천연물의 유효성분은 장내 미생물에 의해 약리적 작용에 의해 생리활성물질로 전환되는 것으로, 사람의 분변을 이용하여 puerarin을 daidzein으로, poncirin을 ponciretin으로, glycyrrhizin을 18 β -glycyrrhetic acid로, ginsenoside Rb1을 compound K로, ginsenoside Rb2를 compound K 등의 유효 생리활성물질로 전환할 수 있었다.³²⁻³⁴ 또한 β -glycosidase, pectinase, cellulase, amylase 등으로 세포벽 성분을 가수분해하여 추출 효율을 증가하여 olive oil, coconut oil, chili peppers로부터 capsaicin, rice 추출 등에 응용되어 왔다.

이와 같이 천연물 자원에 미생물 등에 의한 생물전환을 접목하여 얻어진 신소재를 이용함으로써 고부가가치 산업을 도모하고자 하는 노력은 총성 없는 자원전쟁이 격화되는 현대사회에서 한정된 자원 활용에 있어 양질의 증대를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

4. 발효 후 어떤 효능이 강화될까?

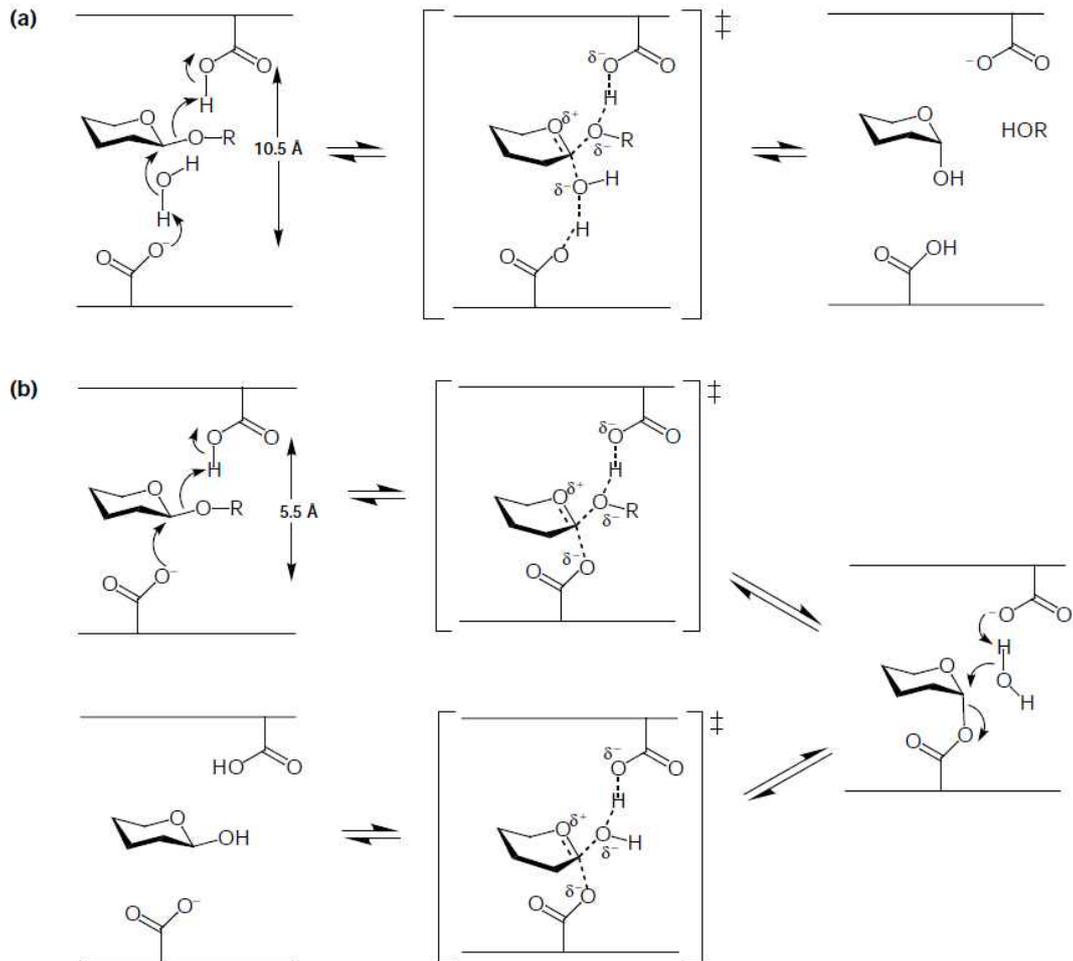


Fig. 1. General glycosidase mechanisms. (a) an inverting β -glycosidase; (b) a retaining β -glycosidase proceeding; R: ring segment of aglycon.

발효는 미생물이 생산하는 효소를 이용한 화학반응의 한 종류이다. 효소는 단백질의 일종으로 생체 내에서 일어나는 각종 화학반응을 촉매하는 역할을 한다. β -glycosidase는 당을 가수분해하는 효소로 주로 Fig. 1과 같은 두 가지 가수분해 기작인 구조역전(inversion)과 구조유지(retention)의 방식에 따라 반응을 촉매한다. β -glycosidase의 촉매활성부위는 일반적으로 두 개의 카르복실기(carboxyl)사이에 있으며, inversion 기작의 형식으로 가수분해가 일어날 때는

작용기 사이의 거리가 약 10 \AA ($\pm 2 \text{ \AA}$) 떨어진 위치에 있으며, 하나의 카르복실산이 일반 염기로 작용하고 다른 하나는 일반 산으로 작용하는 단일 치환 매커니즘을 통해 일어난다. Retention 기작의 형식으로 가수분해를 진행할 때는 두 개의 카르복실기의 거리가 약 5.5 \AA 떨어져 있으며 이중 변위 매커니즘을 통해 진행한다.³⁵ 효소에 의한 당의 가수분해에서 구조유지와 구조역전은 염기가수분해와 마찬가지로 모두 당 부분에서 일어나고 비당체 부분은 원래의 구조를 유지한다. 이와 같은 과정을 모방하여 배당체 형태의 생리활성물질을 무배당체로 전환하여 특정 활성형태의 유효물질의 양을 증가시킬 수 있다. 예를 들면, 감귤의 껍질 부분에 다량으로 함유되어 있는 flavanone 화합물인 naringenin과 hesperitin은 이의 배당체 형태인 naringin과 hesperidin 보다 우수한 항산화, 소염, 항암 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 최근 발효를 통하여 추출물 함유 활성 성분 및 생리활성의 증가를 목적으로 하는 다양한 연구가 보고되었다.^{27,28} 특히 미생물을 이용한 천연물 발효는 미생물의 에너지를 제외한 영양성분들은 대부분 그대로 보존되고 미생물이 분비하는 각종 가수분해효소들에 의해 세포내 조직에 결합되어 있던 생리활성 물질들이 유리되기 때문에 생체이용률 (bioavailability)이 훨씬 높아지는 것으로 알려졌다.^{29,30}

인체 내 산소를 이용한 대사 과정에서 발생하는 superoxide radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxy radical ($\cdot\text{OH}$), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 굉장히 불안정하여 생체 내 지질 과산화가 일어나는 부위 뿐 만 아니라 혈액을 타고 이동하여 다른 부위의 과산화를 유발하며 이로 인해 암, 고혈압, 동맥경화, 뇌졸중, 치매 등과 같은 뇌 질환 및 골다공증의 원인이 되는 등의 많은 질병을 유발하고 노화를 촉진시킨다.^{36,37} 플라보노이드는 이러한 산화적 스트레스의 원인으로 지목되는 ROS를 제거하는데 기여하기 때문에 항산화제로써의 역할을 기대할 수가 있다. 또한 ROS는 아토피피부염, 여드름, 건선 등을 유발 또는 악화시키고 세포 내 DNA 손상과 피부암, 피부노화를 초래하는 등의 염증 과정(inflammatory processes)과 알러지 반응(allergic responses)에도 관여하고 있다는 보고가 있다.³⁸ ROS를 제거하는 항산화 물질과 질병 치료 가능성이 있는 유용한 물질을 탐색하고 이를 개발하기 위한 연구는 활발히 이뤄졌다. 그 와중에 합성 항산화제의 부작용들이 밝혀

지면서 천연자원으로부터 향산화제를 개발하려는 노력이 더욱 많이 이루어지고 있고, 특히 페놀 화합물과 플라보노이드류 등이 항산화, 항암, 항균 등의 다양한 생리활성 기능을 가지는 것으로 보고되고 있다. 또한 천연자원에서 얻어진 항산화 물질들이 뛰어난 항염증 작용도 수반하고 있다고 알려진 경우도 많다.³⁹⁻⁴¹

식물에는 각각의 형태로 많은 종류의 플라보노이드가 존재하며, 앞서 언급하였듯이 염생식물은 조간대에서의 서식 환경으로 인한 독특한 생리활성 물질이 있다고 보고되고 있다. 생물체는 활성 물질에 당을 결합시켜 비활성인 배당체 상태로 보관하고 있는 경우가 있으며, 본 연구에서 소재로 선정된 갯까치수영은 kaempferol 배당체가 분리된 내용이 보고되어 있으나⁴², 갯까치수영을 발효하는 등의 생물전환 관련한 연구는 없다. 지속적으로 커져가는 수요에 따라 천연물 소재 탐색 및 개발 발전의 당위성에 비추어 보았을 때 다양한 시도는 불가결하다. 따라서 본 연구는 적합한 균주로의 발효를 통해 염생식물의 하나인 갯까치수영의 기능성 물질을 생산하는 발효 조건을 구축하고자 하였으며, 발효 전·후의 시료 비교와 동시에 항산화 및 항염, 항균 활성을 연구하여 화합물의 변화를 확인하고 그 구조와 효능을 조사해 봄으로써 천연물의 기능성 소재 탐색의 확장 가능성을 검토해 보기 위해 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

분석을 위한 시약인 gallic acid, quercetin, kaempferol, Na_2CO_3 , AlCl_3 , NaOH , CH_3COOH , 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

본 연구에서 시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 DAEJUNG chemical 및 OCI의 제품을 사용하였다. VLC (vacuum liquid chromatography)에는 silica gel (0.005-0.025 mm, Sigma Aldrich, USA), normal-phase silica gel column chromatography에는 silica gel (0.040-0.063 mm, Merck, Germany)을 사용하였고 reversed-phase silica gel column chromatography에는 silica gel RP-18 (25-40 μm , Merck, Germany)을 사용하였다. 분리과정과 pattern 분석에서 사용된 TLC (thin layer chromatography)는 pre-coated silica gel aluminum sheet (silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck, Germany)를 사용하였다. LPS (Difco, Detroit, MI, USA)와 MTT는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, antibody는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA) 그리고 FBS와 Antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였다. TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂의 ELISA Kit는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA)에서 구입하였다.

발효 전후 화합물의 분리 및 분석을 위해 사용한 기기는 HPLC (high performance liquid chromatography, Waters alliance HPLC system)와 LC-MS/MS (liquid chromatography-mass spectrometry, LCQ Fleet, Thermo Fisher Scientific)이었고, 분리된 화합물의 생리활성 연구를 위한 흡광도 측정에는 효소면역측정기(MQX-200R, Biotek, USA)를 사용하였다.

구조분석에 이용된 NMR (nuclear magnetic resonance) spectrometer는 AVANCE III 500 (FT-NMR system, Bruker)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge isotope laboratories, Inc.)의 NMR 전용용매로 CD_3OD , $\text{DMSO}-d_6$ 를 사용하였다.

2. 실험재료

본 실험에서 사용한 갯까치수영은 2016년 3월 제주특별자치도 서귀포시 남원읍 태흥2리 해안가에서 채취하여 음건한 후 세절한 것을 (재)제주테크노파크 생물종다양성연구소에서 분양받아 사용하였다.

갯까치수영은 갯까치수염, 갯좁살풀, 해변진주초로도 불리우며 학명은 *Lysimachia mauritiana* Lam.이다. 어린 잎은 식용으로 쓰이며⁴³ 관상초로도 활용되는 다육질의 2년생 초본류인 갯까치수영은 앵초과로 주로 제주도와 울릉도를 비롯하여 남해안 지역에 분포한다. 햇빛이 잘 드는 해안가의 바위틈이나 사구에서 잘 자란다.⁴⁴

2017년 3월 말에 생태 현황을 직접 모니터링 한 결과 서귀포시 남원읍 표선면의 해안 바위틈에서 다수 분포하고 있음을 관찰할 수 있었다.



Fig. 2. Picture of *Lysimachia mauritiana* Lam.

3. 사용균주 및 배지

발효를 위해 사용한 미생물은 Table 1에서 보는 바와 같이 고초균인 *Bacillus subtilis* 1균주, 젖산균인 *Lactobacillus sp.*, *Sreptococcus sp.* 2균주, 유산균인 *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* 1균주, 누룩균류

인 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Rhizopus oryzae*, *Monascus purpureus* 4균주를 사용하였다. 총 8균주 모두는 한국미생물보존센터에서 분양을 받아 사용하였다. *B. subtilis*는 nutrient 배지(beef extract 3 g/L, peptone 5 g/L, pH 7.0, Difco, USA)에, *Lactobacillus* 속과 *L. mesenteroides*는 lactobacilli mrs broth 배지(protease peptone 10 g/L, beef extract 10 g/L, yeast extract 5 g/L, glucose 20 g/L, sorbitan monooleate complex 1 g/L, ammonium citrate 2 g/L, sodium acetate 5 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L, MnSO₄·4H₂O 0.05 g/L, pH 6.5, Difco, USA)에 *Streptococcus* 속 균주는 brain heart infusion 배지(calf brains infusion from 200 g 7.7 g/L, beef heart infusion from 250 g 9.8 g/L, proteose peptone 10 g/L, dextrose 2.0 g/L, sodium chloride 5.0 g/L, disodium phosphate 2.5 g/L, pH 7.4, Difco, USA)에 각각 계대 배양한 후 균체를 25% glycerol이 포함된 저장액에 넣어 -80℃에 보관하였으며, 실험 전에 계대 배양 후 starter로 사용하였다.

Table 1. Strains used for fermentation

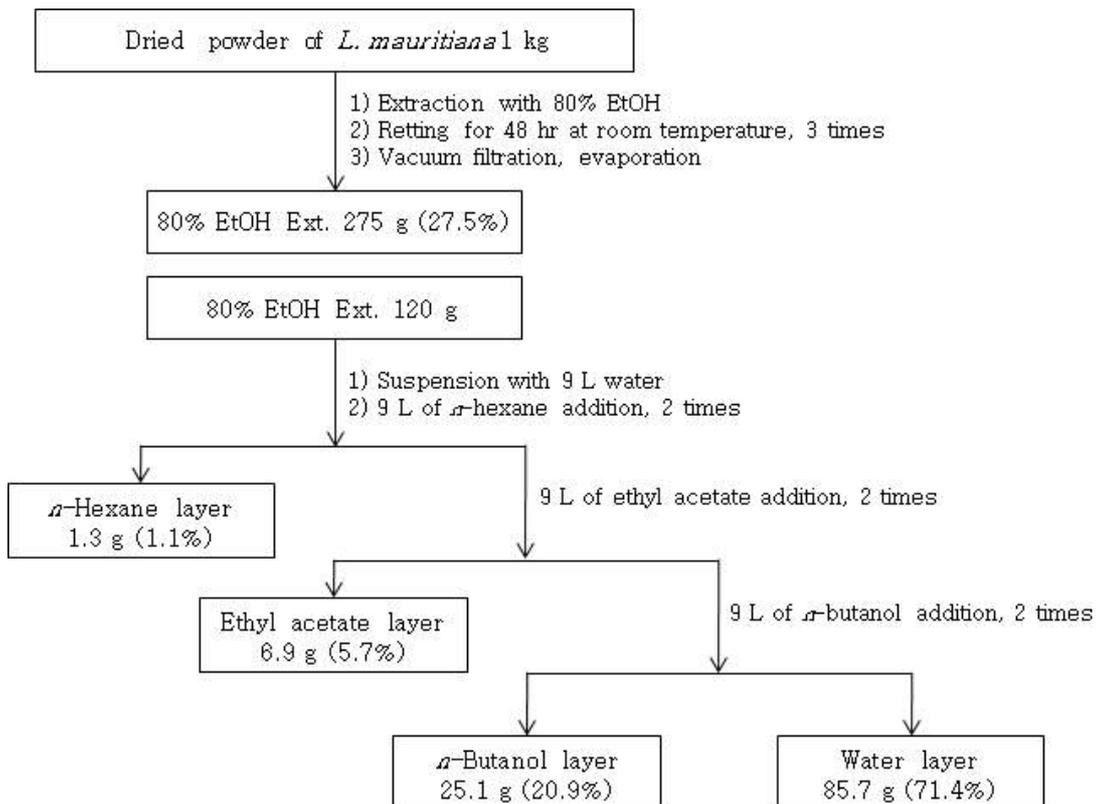
strains	KCCM No.	taxon	medium
<i>Bacillus subtilis</i>	11315	bacteria	NB
<i>Lactobacillus sp.</i>	32821	bacteria	MRS
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	11325	bacteria	MRS
<i>Streptococcus sp.</i>	41831	bacteria	BHI
<i>Aspergillus oryzae</i>	32319	fungi	PDB
<i>Aspergillus sojae</i>	60354	fungi	PDB
<i>Rhizopus oryzae</i>	60386	fungi	PDB
<i>Monascus purpureus</i>	12002	fungi	PDB

4. 추출, 분획 및 분리

4-1. 갯까치수영의 추출 및 분획

세절한 갯까치수영(전초) 1 kg을 80% ethanol에 넣고 48시간 동안 침지시켜 3회 반복 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 용매를 제거하고 동결 건조하여 분말상의 추출물 275 g (27.5%)을 얻었다.

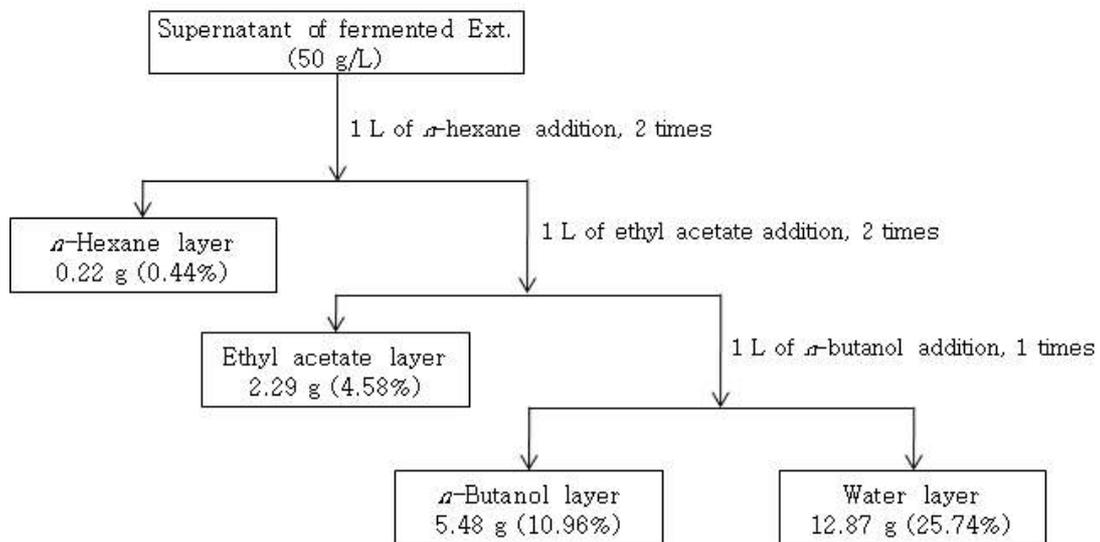
이와 같이 얻은 추출물 중 120 g을 증류수 9 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성이 낮은 것부터 높은 순서에 따라 순차적으로 분획하였다. 극성 순서에 따른 용매 분획 층은 *n*-hexane 층, ethyl acetate 층, *n*-butanol 층, water 층으로 총 4개이며 용매별 분획을 2회씩 반복하여 각각 1.3 g (1.1%), 6.9 g (5.7%), 25.1 g (20.9%), 85.7 g (71.4%)의 분획물을 얻었다(Scheme 1).



Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fractionation from *L. mauritiana* Lam.

4-2. 갯까치수영 발효물의 추출 및 분획

갯까치수영 추출물을 50 g/L로 발효 후 원심분리하여 얻은 상층액 1 L에 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol를 각 1 L씩 2회 반복 실시하여 극성 순서에 따른 용매 분획 추출을 수행하였다. 이를 통해 각 용매별 분획물을 각각 0.22 g (0.44%), 2.29 g (4.58%), 5.48 g (10.96%), 12.87g (25.74%)을 얻었다(Scheme 2).

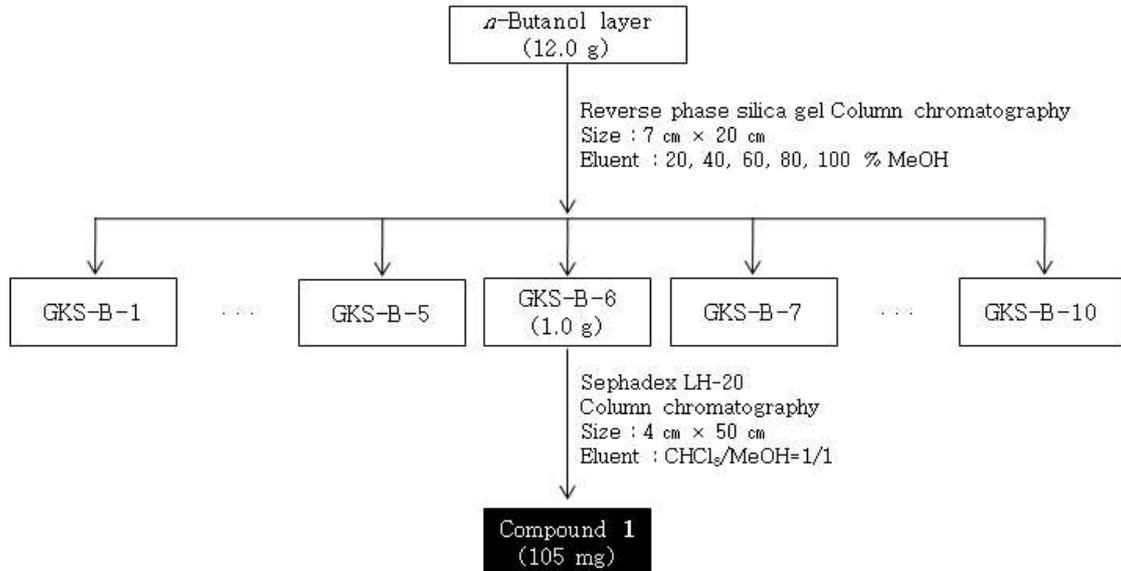


Scheme 2. Procedure of extraction and solvent fractionation from fermented extracts of *L. mauritiana* Lam.

4-3. 추출물에서 compound 1의 분리 과정

HPLC로 주요 성분의 peak가 *n*-butanol 분획물에 있음을 확인한 후 갯까치수영 *n*-butanol 분획물 12 g으로 Reverse phase silica gel column chromatography (7 cm × 20 cm)를 실시하였다. 이동상은 20~100% methanol을 순차적으로 사용하여 총 10개의 분획을 얻었다. 각 분획에 대해 TLC 및 HPLC 분석을 실시하여 함량이 가장 많은 성분이 포함된 6번 분획(1 g)에 대해 다시 sephadex LH-20 column chromatography를 실시했다(4 cm

× 50 cm). 이동상으로 CHCl₃ : MeOH을 1 : 1로 사용하였으며 총 7개의 분획을 얻었다. 그 중 3번 분획(GKS-B-6-3)을 NMR로 구조 동정하였다.

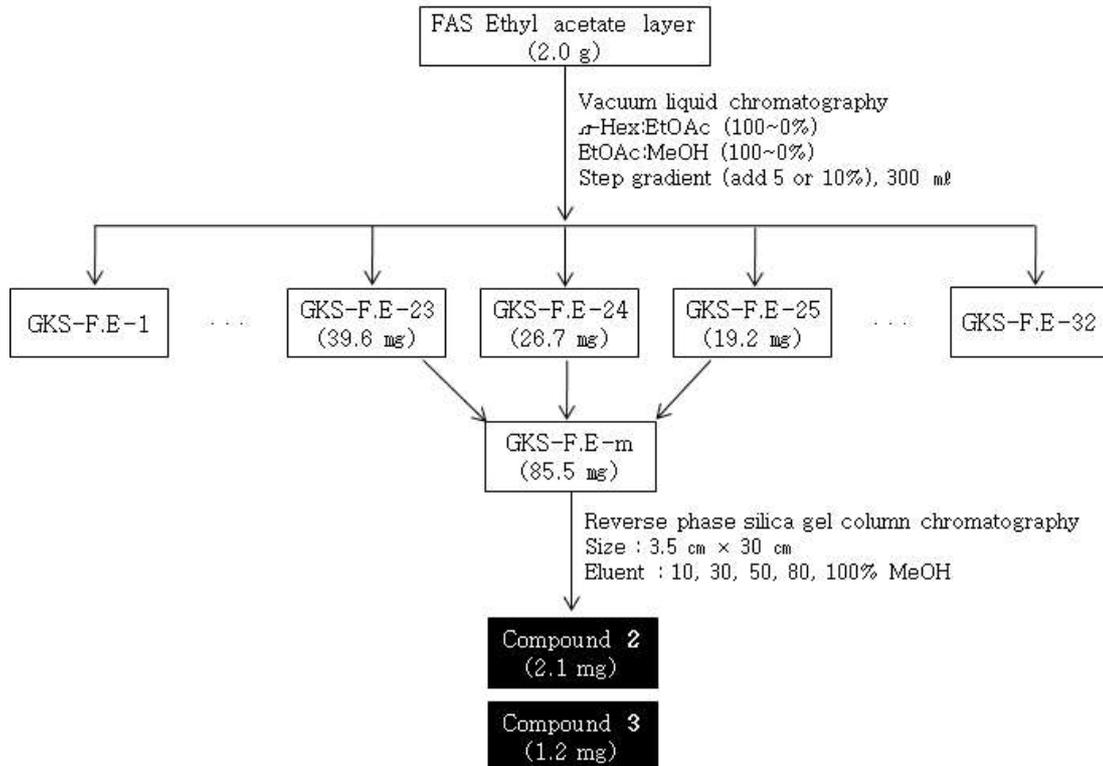


Scheme 3. Procedure of isolation for compound 1

4-4. 발효 후 증가된 화합물인 compound 2, 3의 분리 과정

발효한 추출물의 분획들을 HPLC로 확인하였을 때 ethyl acetate 분획물에서 새로운 peak를 확인할 수 있었고, 이를 분리하기 위해 VLC (vacuum liquid chromatography)를 수행하였다. 발효 후 ethyl acetate 분획물 2.0 g을 methanol을 이용하여 동량의 silica gel (5~25 μm, pore size 60A, Sigma-aldrich, USA)에 흡착시키고, 이를 80 g의 silica gel로 충전한 glass filter에 얇고 평평하게 충전하였다. 용매를 step gradient 방법으로 n-Hex-EtOAc (100~0%), EtOAc-MeOH (100~0%)의 순서로 분획당 300 mL씩 용출하여 총 32개의 분획을 얻었다. VLC 분획물을 모두 TLC로 pattern을 확인하고 TLC spot이 유사하고 활성 성분이 포함된 것으로 보이는 분획인 Fr.23~25을 모아 reverse phase silica gel column chromatography (3.5 cm × 30 cm)를 실시하였다. 충전제는 LiChroprep RP-18 (25~40 μm, Merck,

Germany)를 사용하였고, 이동상은 10, 30, 50 80, 100% MeOH을 순차적으로 사용하여 총 5개의 분획을 얻었다. 각 분획에 대해 TLC 및 HPLC 그리고 NMR을 통해 compound 2와 3을 확인하였다.



Scheme 4. Procedure of isolation for compound 2, 3

5. 균주 선정 및 발효

5-1. 발효 배지 조제

천연물을 구성하고 있는 성분들은 탄수화물, 질소화합물(단백질, 아미노산, 핵산 등), 지용성 화합물(지질, 지방산, terpenoids 등) 및 기타 미네랄 등으로 종속영양생물(heterotroph)인 미생물이 발효하는데 필요한 모든 성분을 함유하고 있다.⁴⁵ 필요한 경우 일부 성분만을 보충해 줌으로써 미생물을 이용한 발효를 수행하기도 하지만, 본 실험에서는 별도의 영양분을 첨가하지 않아도 일부

균주의 생장을 확인할 수 있었기 때문에 증류수에 5%의 추출물을 첨가하여 고압멸균기(DH.WACO1100, Daihan Co., Korea)에서 121℃로 15분 멸균한 것을 GKS5B로 표기하고 최적 조건 탐색을 위한 기본 배지로 사용하였다.

5-2. 발효 균주의 선정 및 배양

갯까치수영 추출물 발효 가능균주를 선정하기 위하여 고체 평판배지를 만들어 사용하였다. 고체배지는 증류수에 마쇄한 갯까치수영 추출물 2%와 한천 2%를 첨가하여 조제하고 멸균 후 petri dish에 15~20 mL을 분주하여 제작하였고, GKS2A2 (2% extract, 2% agar)로 표기하였다. 한 개의 plate는 4등분 하여 구획 당 1균주를 streaking하였고, 총 8균주를 일반적인 미생물 배양 온도인 25℃, 30℃, 37℃에 각각 정치하여 48시간 배양하였다. 발효 균주는 주어진 배양 조건에서 증식이 확인 된 균주인 *Aspergillus sojae*를 최종 선택하였다(Fig. 3).

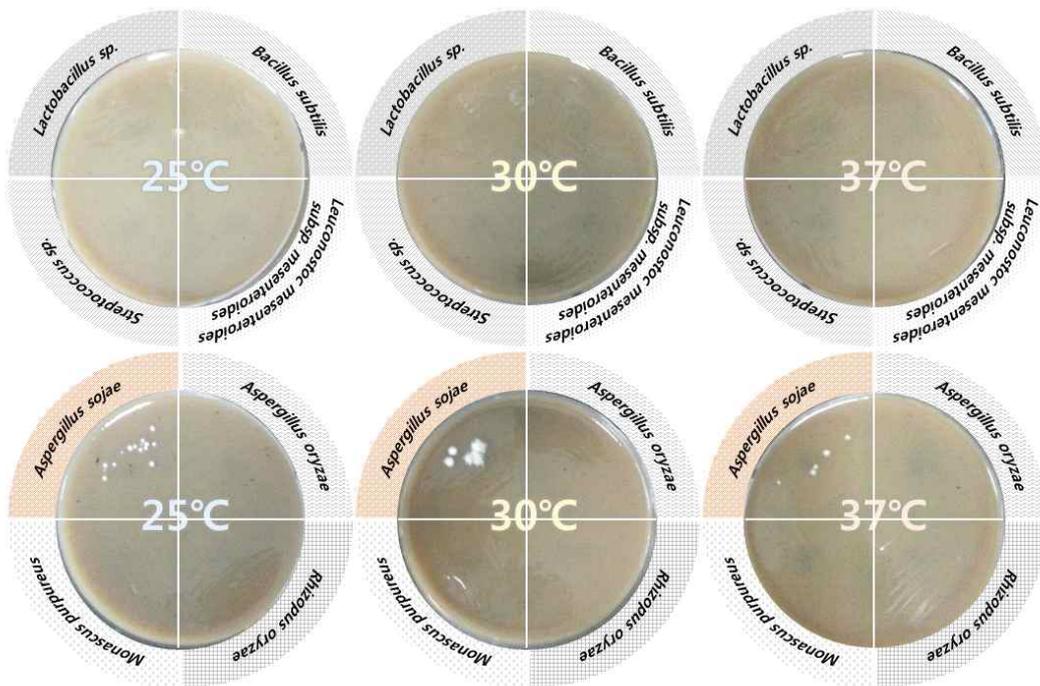


Fig. 3. Eight strains cultured at different temperatures in GKS2A2 medium.

5-3. 갯까치수영 추출물의 최적 발효 조건 결정

본 연구의 목적에 부합하는 발효를 수행하기 위하여 갯까치수영 추출물에서의 *Aspergillus sojae* 최적 배양 조건을 조사하였다. 하나의 요인을 제외한 나머지 요인들을 고정시키는 OFAT (one factor at a time) method⁴⁶을 응용하여 실시하였고, 조사할 요인으로는 미생물 성장에 중요한 pH와 배양온도, 그리고 접종량 및 교반 속도에 따른 영향을 조사하였다. 요인을 하나씩 변경하며 찾은 결과를 반영하여 배양시간에 따른 변화를 알아보았고, 조건 결정에서 실시한 발효는 회분식(batch)으로 공기의 주입은 고려하지 않았다. 종균은 2일 전에 계대 배양하여 균주를 미리 활성화시켰고, 균수는 1.8×10^3 CFU (colony forming unit)/mL이었다.

먼저 최적 배양 온도 조건을 찾기 위하여 종균 배양액을 GKS2A2 배지에는 100 μ L를, GKS5B 배지에는 4%(v/v)를 접종하고 배양기를 이용하여 각각 20°C, 25°C, 28°C, 30°C, 35°C 조건에서 정치하여 42시간 배양하였다. *A. sojae*는 fungi로써 포자로 성장하므로 균체의 생장은 각각의 배양액을 filter한 후 항량까지 건조하여 측정된 균체의 무게를 측정하여 성장정도를 확인하였다. GKS2A2 배지는 배양 종료 시점에 균사의 길이를 측정하여 비교하였다.

두 번째로 배양 최적 pH 조건을 찾기 위하여 pH meter (3510, Jenway Ltd., USA)를 이용하여 GKS5B 배지의 pH를 20% HCl과 20% NaOH로 각각 3, 4, 5, 6, 7로 조절하고 종균 배양액 4%(v/v)를 접종하였다. 30°C, 200 rpm으로 42시간 진탕 배양하였고 균주의 생육과 배양액의 pH를 측정하였다.

세 번째로 *A. sojae*의 접종량이 균체의 생육과 pH에 미치는 영향을 알아보기 위하여 GKS5B 배지에 종균의 접종량을 각각 1, 3, 5, 10%(v/v)가 되도록 접종한 후 30°C에서 200 rpm으로 42시간 진탕 배양하였다. 배양을 마치면 균주의 생육과 배양액의 pH를 측정하였다.

네 번째로 교반 속도에 따른 영향을 알아보기 위하여 100, 200, 300 rpm으로 30°C에서 42시간 진탕 배양하였다. 배양을 마치면 균주의 생육과 배양액의 pH를 측정하였다.

마지막으로 앞서 구한 발효 최적 조건을 적용하여 시간에 따른 변화를 확인하기 위하여 발효 배양액을 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168시간에 채취하여 균주의 생육과 pH, 환원당 함량을 확인하였다.

5-4. 회분식(batch) 발효에 대한 평가

5-4-1. 환원당 분석

배양액 내의 환원당(reducing sugar)을 분석하기 위하여 dinitrosalicylic acid (DNS)법⁴⁷을 응용하여 실시하였다. 환원당이란 반응성 있는 알데히드기(R-CHO), 케톤기(R-CO-R')를 갖고 금속염 알칼리용액을 환원시키는 성질이 있는 당의 총칭이며, glucose, fructose, maltose, lactose, galactose 등이 포함된다. saccharides에 free carbonyl group (C=O)가 있으면 환원력이 나타난다. 이러한 환원력을 이용하여 발색시약인 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)와 rochelle 염으로 알칼리 조건에서 환원시키면 이 DNS는 3-amino-5-nitrosalicylic acid로 환원되면서 540~575 nm 범위의 빛을 흡수하게 되고 이 흡광도를 측정하여 물질을 정량 분석하는 방법이다.

시료액 1 mL에 DNS 시약 2 mL을 가하고 중탕으로 끓는 물에 10분간 반응시킨 후 반응의 정지를 위해 얼음으로 급냉시켰다. UV-visible spectrophotometer (Ultrospec 2100 *pro*, Amersham Biosciences Co., Sweden)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 D-glucose를 표준물질로 사용하여 상기의 방법으로 작성한 표준곡선식에 대입하여 당의 함량을 계산하였다.

5-4-2. TLC 분석

TLC 분석은 발효 전후 갯까치수영 추출물이나 분리 과정의 물질을 비교하기 위해 수행하였다. 먼저 갯까치수영 추출물은 동결건조기(FDU-1200, EYELA Co., Japan)를 통해 수분을 증발시킨 후 methanol을 이용하여 5

mg/mL의 농도로 조정하여 TLC 분석에 사용하였다. 농도를 조정한 갯까치수영 추출물은 TLC plate (silica gel 60 F254, Merck, Germany)에 5 μ L를 spotting하고 chloroform, methanol과 acetic acid를 2 : 1 : 0.1로 혼합한 전개용매를 포화시킨 TLC chamber에 넣어 전개하였다. 검출은 UV lamp를 사용하여 254 nm에서 조사한 후 확인하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent는 5% H₂SO₄, 10% CH₃COOH, 85% MeOH를 혼합한 용액에 0.5% anisaldehyde를 첨가하여 제조한 후 필요에 따라 사용하였다.

5-4-3. HPLC 분석

시료의 발효 전·후와 분리 과정 중의 물질 비교를 위하여 HPLC 분석을 실시하였다. 갯까치수영 추출물과 분획물, 발효물을 methanol에 녹여 10,000 또는 5,000 ppm으로 희석하고 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 시료로 사용하였다. 추출물 분획은 C18 column (Cadenza CD-C18 3 μ m, 4.6 \times 150 mm, 45 $^{\circ}$ C)을 이용한 HPLC (Waters alliance HPLC system)에 10 μ L를 주입하여 분석하였다. 이동상은 1.0 mL/min의 유속으로 H₂O (0.5% acetic acid)/ACN을 용매조건으로 90:10에서 20:80까지 60분간 gradient하였다. 검출기는 여러 파장을 동시에 분석할 수 있는 PDA (photodiode array)를 사용하였고, 크로마토그램은 353 nm로 나타내었다.

6. 생리 활성 비교 평가

6-1. 항산화 활성 실험

6-1-1. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀은 녹색 식물의 광합성 작용에 의해 생성된 당의 일부가 변화한 2차 대사산물 중 하나로 벤젠고리(C₆H₆)의 수소 중 하나가 수산기(OH-)로

치환된 물질을 페놀이라 하고 2개 이상 갖고 있는 물질을 폴리페놀 또는 다가페놀이라고 한다. 식물에 함유되어 있는 페놀 화합물은 다양한 구조와 분자량을 가지며 phenolic hydroxyl이 있어 단백질 및 거대분자들과 결합하는 성질을 가지고 있기 때문에 각각의 특징적인 생물학적 활성을 가질 수 있는데 항산화 효과는 총 페놀함량과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.^{48,49}

발효 전후 갯까치수영 추출물과 용매 분획 층의 총 폴리페놀 함량의 측정을 위해 folin-denis법⁵⁰을 응용하여 수행하였다. 1 mg/mL 농도의 시료 100 μ L에 증류수 900 μ L를 넣어 total volume 1 mL로 희석 후 1N folin-ciocalteu's phenol reagent 100 μ L를 첨가하여 실온에 3분간 반응시켰다. 반응액에 0.4 M Na_2CO_3 용액 200 μ L과 증류수 700 μ L를 차례로 혼합하여 실온에서 1시간 정치하였다. 그 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 취해 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 이용하여 작성한 검량선에 따라 함량을 구하였으며 측정 단위로는 μ g GAE (garlic acid equivalent)/mg을 사용하였다.

6-1-2. 총 플라보노이드 함량 측정

플라보노이드는 식물이 함유하고 있는 노란색을 띤 천연 물질을 총칭하고 식물 자신이 태양의 자외선으로부터 자기 자신을 방어하기 위해 만들어낸 페놀성 천연물질로 이들은 당과 결합하여 배당체로 존재하는 경우가 많으므로 보통은 수용성을 띠고 있다. 일반적으로 이들은 화학구조 중 산화 정도에 따라 안토시아닌류, 플라바논류, 플라바놀류, 플라보놀류, 플라본류, 이소플라본류로 6개 그룹으로 나뉘고 구조에 따라 특정 플라보노이드는 항산화, 항균성, 면역증강, 순환기 질병예방, 모세혈관 강화 등 다양한 생리활성을 나타낸다.⁵¹⁻⁵³

총 플라보노이드 함량 시험은 aluminum chloride colorimetric assay을 응용하여 실시하였다.⁵⁴ 농도를 1 mg/mL로 맞춘 각 시료를 100 μ L씩 취하고 증류수 400 μ L를 가하여 잘 혼합하였다. 다시 여기에 5% sodium nitrate

solution 30 μL 를 첨가하고 5분간 상온에서 반응시켰다. 이어서 10% aluminum chloride solution을 30 μL 첨가하고 다시 5분간 상온에서 반응시킨 후 1 M의 sodium hydroxide를 첨가하고 1분간 상온에서 반응시켰다. 마지막으로 증류수를 240 μL 첨가하고 micro-plate reader로 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 ethanol에 녹인 quercetin을 이용하여 검량선을 작성하고 이에 대입하여 플라보노이드 함량(μg QUE/mg)을 구하였다.

6-1-3. DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 시료의 free radical 소거 능력이나 수소 공여 능력을 평가하는 방법 중에 하나이다. 대부분의 radical은 반응성이 커서 매우 불안정하지만, DPPH radical은 안정한 free radical을 가진 물질로써 517 nm 근처의 파장에서 강한 흡수를 나타내는 보라색의 화합물이다. 하지만 free radical을 소거할 수 있는 항산화제로부터 수소를 공여 받아 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H)이 되면 노란색을 띠게 되며 517 nm에서의 흡광도가 감소되는데 이러한 원리를 이용하여 시료의 항산화 활성을 측정할 수 있다(Fig. 4).⁵⁵

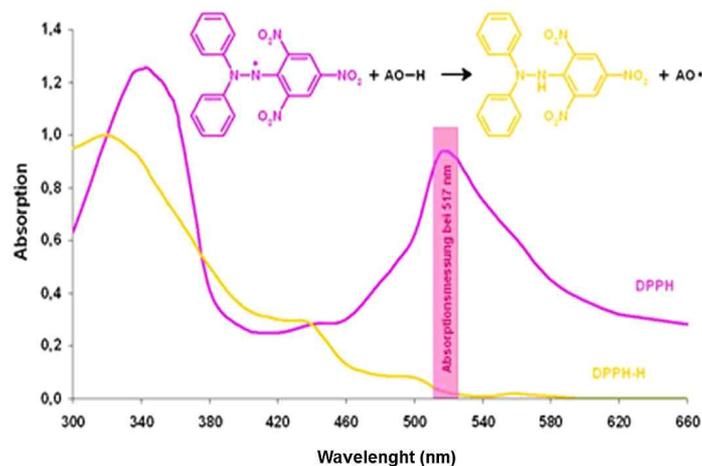


Fig. 4. Graph showing the colour change of DPPH from purple to yellow when it is exposed to an antioxidant substance. (2013 Mendoza Pérez and Fregoso Aguilar)

이와 같은 원리를 이용하여 항산화 활성 능력을 측정하고자 하였고, DPPH radical 소거 활성에 의한 항산화 활성 검색은 blois방법⁵⁶을 활용하여 실행하였다. DPPH 2 mg을 ethanol과 DMSO를 이용하여 용액 제조 후 517 nm의 파장에서 0.95~0.99가 되도록 조정하여 준비하였다. 시료는 flat-bottom 96 well plate에 최종 1 mg/mL 농도로 만든 후, 이를 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL 농도로 희석하였다. 이를 위해 준비한 DPPH 100 µL에 시료 100 µL를 첨가하며, 반응을 위해 10분간 실온에서 방치하였다. 이후 micro plate reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. blank에는 DPPH 용액 대신 methanol을 사용하였고, 각 시료는 3회 반복하여 실험하였으며 결과는 평균값을 구하였다. DPPH radical 소거 활성은 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC₅₀)를 구하였다. 양성대조군(positive control)으로는 ascorbic acid, kaempferol, quercetin을 사용하였다.

$$Scavenging\ activity(\%) = \left\{ 1 - \frac{(A - B)}{C} \right\} \times 100$$

A : 시료와 DPPH 반응액의 흡광도(517 nm)

B : 시료 자체의 흡광도(517 nm)

C : DPPH 용액의 흡광도(517 nm)

6-1-4. Superoxide radical 소거 활성 측정(NBT/XO assay)

Superoxide는 xanthin oxidase에 의해 hypoxathine에서 요산으로 전환되는 과정에 의해 생성되며, NBT (nitro blue tetrazolium)에 대한 반응으로 제거되어 항산화제의 능력을 검사하는 표준 시험이 될 수 있는 NBT reduction 방법⁵⁷을 일부 수정하여 실시하였다. 시료는 최종 농도가 1 mg/mL이 되도록 만든 후, 이를 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL 농도로 연속 희석하였다. 이를 위해 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액

각 50 μ L와 200 mM sodium phosphate buffer 50 μ L를 혼합한 후, 1 mM xanthine (in buffer)과 2 mM EDTA (in buffer), 0.1 mM NBT (in buffer)를 혼합한 용액을 50 μ L 첨가하였다. 마지막으로 50 mU/mL xanthine oxidase를 각각 100 μ L 넣고 상온에서 15분 동안 반응 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. superoxide radical 소거율(%)은 아래의 식에 의해 계산하였으며, 각 시료를 적용하였을 때 NBT/XO의 흡광도가 50% 감소할 때의 시료 농도(IC₅₀)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 양성대조군(positive control)으로는 ascorbic acid, kaempferol를 사용하였다.

$$Scavenging\ activity(\%) = \left\{ 1 - \frac{(A - B)}{C} \right\} \times 100$$

A : NBT, xanthine 용액에 시료와 효소액 반응 흡광도(550 nm)

B : A에서 효소 대신 buffer를 첨가한 혼합액의 흡광도(550 nm)

C : A에서 시료 대신 buffer를 첨가한 혼합액의 흡광도(550 nm)

6-1-5. Xanthine oxidase 저해 활성 측정(XO assay)

Xanthine oxidase는 purine 대사에 관여하는 효소로 hypoxanthine을 xanthine으로 전환시키고 분자상의 산소를 전자수용체로 이용해 uric acid로 산화하는 반응을 촉매하는 효소이다. Uric acid가 혈장 내 증가하면 요산염이 골절에 축적되어 통증을 동반하는 통풍을 일으킨다는 보고가 있다.⁵⁸ 이러한 xanthine oxidase를 저해하는 물질의 대부분은 천연물에 함유된 페놀성 화합물과 플라보노이드가 그 원인 물질이라는 보고가 있으며⁵⁹⁻⁶¹, 특히 차류에 함유된 플라보노이드 화합물 중에서 galloyl기를 함유한 플라보노이드 화합물과 폴리페놀 화합물이 xanthine oxidase를 경쟁적으로 저해한다는 연구도 보고된 바 있다.⁶²

XO 저해 활성 실험은 Wang 등의 방법⁶³을 응용하였고 실험은 다음과 같

이 진행하였다. 시료를 최종 농도가 1 mg/mL이 되도록 만든 후, 이를 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL 농도로 연속 희석하였다. 이를 위해 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 각 50 µL와 200 mM sodium phosphate buffer 50 µL를 혼합한 후, 1 mM xanthine (in buffer)과 2 mM EDTA (in buffer)를 혼합한 용액을 50 µL 첨가하였다. 마지막으로 50 mU/mL xanthine oxidase를 각각 100 µL 넣고 상온에서 15분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 290 nm에서 흡광도를 측정하였다. xanthine oxidase 저해 효과(%)는 아래의 식에 의해 계산하였으며, 각 시료를 적용하였을 때 xanthine의 흡광도가 50% 감소할 때의 시료 농도(IC₅₀)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 양성대조군으로는 kaempferol를 사용하였다.

$$\text{Inhibitory effect}(\%) = \left\{ 1 - \frac{(A - B)}{C} \right\} \times 100$$

A : Xanthine 용액에 시료와 효소액 반응 흡광도(290 nm)

B : A에서 효소 대신 buffer를 첨가한 혼합액의 흡광도(290 nm)

C : A에서 시료 대신 buffer를 첨가한 혼합액의 흡광도(290 nm)

6-2. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험

6-2-1. 세포배양

대식세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 cell은 ATCC (American type culture collection, VA, USA)으로부터 분양 받아 penicillin-streptomycin 100 units/mL과 10% FBS (fetal bovine serum)이 함유된 DMEM 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂항온기에서 배양하였으며, 2~3일에 한 번씩 계대배양을 시행하였다.

6-2-2. Nitric oxide 생성 억제 평가

NO는 NOS효소에 의해 만들어지며, 체내의 염증과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관절염을 비롯한 각종 급성 혹은 만성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NOS는 I형, II형, III형의 3종류가 있는데, 이중 생체에서 항상성과 관련해 중요한 역할을 담당하는 I형이나 III형과 달리 II형은 iNOS로 cytokine이나 세균 등에서 분비되는 LPS나 calcium ionophore에 의해 일부 세포에서 생성되며, 생성된 iNOS는 과량의 NO를 생성해 각종 염증질환에 작용하는 것으로 알려져 있다.

RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5 cells/mL로 조절한 후 48 well plate 에 접종하고, 갯까치수영 추출물과 그 분획물, 발효물과 그 분획물 총 10점과 LPS (1 μ g/mL)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약[1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphthylethylenediamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. 세포배양 상층액 100 μ L와 Griess 시약 100 μ L를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO_2)를 standard로 비교하였다.

6-2-3. 세포독성 평가 실험(LDH, MTT assay)

① LDH assay

RAW 264.7 (1.8×10^5 cells/mL)를 DMEM 배지에 갯까치수영 추출물과 발효물 그리고 각 분획물, 총 10점과 자극물질 LPS (1 μ g/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양 한 후 배양 배지를 얻어 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. LDH (lactate dehydrogenase) assay는 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심 분리하여 얻은 배양 배지 50 μ L와 reconstituted substrate mix를 50 μ L를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 50 μ L의 stop solution을 넣은 후

microplate reader (Bio-TEK Instruments Inc., Vermont, WI, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군(LDH control, 1:5000)의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

② MTT assay

MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay를 이용하였다. RAW 264.7 cell을 48 well plate에 1.8×10^5 cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양 후, 500 µg/mL 농도로 MTT를 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후, 상층액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 다음, 이를 96 well plate에 옮긴 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6-2-4. Pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6, IL-1β)과 PGE₂ 생성 억제 효능 평가

염증의 발병은 cytokine 네트워크와 다양한 염증인자(pro-inflammatory mediator)들의 유발 등에 의해서 조절되는 복합적인 과정을 통해서 일어나게 된다. cytokine은 인체에 바이러스가 침투하면 면역체계가 가동되는데, 이 과정에서 분비되는 면역물질을 말한다. 면역과 염증에 관련된 여러 cytokine중 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine은 IL-1β, IL-6 및 TNF-α로, 대식세포는 염증 반응 시에 IL, TNF-α와 같은 cytokine을 생산하고, COX-2를 활성화시켜 PG를 생산하여 감염초기의 생체 방어에 중요한 역할을 수행한다.^{64,65} 또한 COX-2에 의해 생성되는 PGE₂는 세포자멸사의 억제, 세포분열 및 암세포 전이, 혈관신생을 유도하여 종양의 형성에 기여하는 것으로 알려져 있다.⁶⁶

RAW 264.7 (1.8×10^5 cells/mL) 세포를 DMEM 배지를 이용하여 48

well plate 에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18시간 전 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도(1 mg/mL)로 조제된 시료와 자극물질 LPS (1 μg/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3 min.)하여 얻어진 상층액의 pro-inflammatory cytokines과 PGE₂ 생성 함량을 측정하였다. 모든 시료는 실험 전까지 -20℃ 이하에 보관하였다. 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐으며 standard에 대한 표준곡선의 r2값은 0.99 이상이었다.

6-3. 항균 활성 실험

6-3-1. 시험균주 배양

항균 활성을 평가하기 위해 피부상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)와 여드름 원인균인 *Propionibacterium acnes* (CCARM 9010), 칸디다균인 *Candida albican* (KCTC 7965)을 사용하였다. 이들 시험균주는 항생제내성균주은행(culture collection of antimicrobial resistant microbes, CCARM)과 생명자원센터(Korean collection for type cultures, KCTC)로부터 분양받았다. *S. epidermidis*는 TSB (tryptic soy broth)로 37℃에서 3 계대 배양하여 활성 시킨 후 실험에 사용하였다. *P. acnes*는 배양배지로 GAM broth를 사용하여 37℃에서 3 계대 배양 후 실험에 사용하였다. *C. albican*은 균 활성화를 위해 YM broth를 사용하여 25℃에서 3 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 계대 방법으로는 멸균한 액체 배지 10 mL에 상온으로 식힌 후 stock 상태의 균을 100 μL 접종하고 각 균의 적정온도에서 24 시간 배양한 것을 다시 배지와 접종량을 100:1의 비율로 접종한 것을 24시간 배양하기를 두 차례 더 반복하였다.

6-3-2. Paper disc diffusion test

항균 활성 측정은 paper disc diffusion assay⁶⁷ 방법을 사용하였다. 각 시험균주를 10 mL의 액체배지에 접종하고 37°C에서 18시간씩 3회 계대 배양하여 항균활성 시험균주로 사용하였으며, 각 시험균 농도를 0.5 McFarland로 $10^6 \sim 10^8$ CFU/mL 되게 한 후 pour-plate 방법으로 균점종 평판배지를 만들어 사용하였다. 항균 활성 평가할 시료는 5 mg/mL 농도로 조제하여 paper disc (Whatman No.5, 8 mm)에 천천히 흡수 시킨 후, 용매를 완전히 증발시켰다. 그 후 시험용 평판배지 표면에 disc를 부착하고 각 시험균의 최적온도(37°C 및 25°C)에서 배양한 후 disc 주변에 생성된 생육저해환(clear zone, mm)의 크기를 측정하여 항균 활성을 비교하였다.

6-3-3. Minimum inhibitory concentration test

MIC (minimum inhibitory concentration)는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최소농도이다. 시험균주에 대한 낮은 MIC 값은 시료물질이 그 시험균주에 대해 높은 감수성이 있다고 할 수 있다.

3 계대로 활성시킨 균의 O.D (optical density)값이 0.2~0.3이 되도록 0.85% 멸균생리식염수를 이용하여 희석하였다. 그리고 96 well plate의 각 well에 배지 150 μ L씩 넣어주고, 이어 첫째 well에 준비한 sample 150 μ L를 넣어준 후 pipetting하여 혼합하였다. 같은 방법으로 반복하여 차례대로 sample을 반씩 희석하는 과정을 거치고난 후, 각 well에 O.D 값으로 농도를 보정한 균액을 15 μ L씩 처리하고 각 균의 배양조건으로 배양 후 결과를 확인하였다.

6-3-4. Minimum bactericidal concentration test

낮은 MIC값이 그 농도에서 모든 균의 사멸을 의미하는 것은 아닌데 그 이유는 시료의 영향으로 시험균의 성장을 방해하여 시험균이 자라지 않아

마치 죽은 것처럼 보일 수 있기 때문이다. 따라서 MBC (minimum bactericidal concentration)를 통해 MIC 값으로 정한 그 이상의 농도의 시료들을 plate에 처리하여 colony를 형성하는지 확인함으로써 균의 사멸한 최소 농도를 확인하였다. 먼저 agar plate를 준비하고 plate 뒷면에 구획을 나누어 표시한 뒤, MIC를 진행한 96 well plate에서 loop로 시료를 묻힌 후 구획별로 streaking 하여 각 균의 배양조건으로 배양하여 결과를 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조 결정

1-1. Compound 1의 구조해석

갯까치수영 *n*-butanol 분획물에 대해 RP-silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 하나의 화합물을 분리하였으며 HSQC, HMBC와 같은 2D NMR 실험기법을 이용하여 구조분석을 실시하였다. 또한 LC-MS/MS 분석을 통해 예상구조를 검증하였다.

Compound 1은 흰색 무정형의 분말로 얻었으며 ^1H NMR 분석 결과 δ_{H} 8.07 (2H, d, $J=9.0$ Hz) 및 6.90 (2H, d, $J=9.0$ Hz)의 proton signal 이 서로 coupling 하고 있으며, coupling constant 값이 9.0 Hz 인 것으로 보아 서로 ortho-coupling하는 flavonoid B-ring의 proton이 관찰되었다. 또한 δ_{H} 6.38 (1H, d, $J=2.0$ Hz)의 proton과 δ_{H} 6.18 (1H, d, $J=2.0$ Hz)에서 서로 meta-coupling 하는 flavonoid A-ring의 H-8과 H-6의 전형적인 peak이 관찰되었다. 그리고 δ_{H} 5.62 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 5.25 (1H, brs), 4.52 (1H, brs)의 3개의 anomeric proton과 δ_{H} 4.07-3.25 부근의 복잡한 signal로 미루어 당이 세 개 치환된 구조임을 알 수 있었다. 특히 δ_{H} 1.18 (3H, d, $J=6.5$ Hz), 0.97 (3H, d, $J=6.0$ Hz)에서 doublet으로 나타나는 특징적인 CH_3 peak로부터는 치환된 세 개의 당 중 2개는 rhamnopyranoside인 것으로 추정하였다. ^{13}C NMR의 δ_{C} 158.5 (C-2), 134.5 (C-3), 179.5 (C-4)의 carbon peak 으로부터 flavone-3-ol의 골격임을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 aglycon 은 kaempferol인 것으로 예상하였으며 kaempferol의 NMR spectrum과 비교했을 때 3번 carbon이 저자장 shift 되었으므로 당이 3번 탄소에 치환된 것으로 예상하였다. 당의 carbon signal은 ^{13}C NMR 과 DEPT spectrum에서 2개의 rhamnopyranose의 δ_{C} 100.9 (Rha-1), 99.9 (Rha-1'), 72.4 (Rha-2), 72.1 (Rha-2'), 72.5 (Rha-3), 72.3 (Rha-3'), 75.8 (Rha-4), 75.3 (Rha-4'), 69.9 (Rha-5), 69.7 (Rha-5'), 18.0 (Rha-6), 17.6 (Rha-6') signal을 제외

한 δ_C 102.7, 77.6, 74.1, 73.9, 70.7, 67.1의 6개의 signal로부터 나머지 당 하나는 D-galactopyranose이며, galactopyranose의 2번, 6번이 저자장으로 shift 된 것으로 보아 2번과 6번 위치에 각각 rhamnopyranose가 치환된 것으로 예측하였다. 또한 HMBC spectrum에서 δ_C 77.6의 Gal-2 탄소와 δ_H 5.25 (1H, brs)의 Rha-1이 co-relation을 확인하였으며 δ_C 67.1의 Gal-6 탄소와 δ_H 4.52 (1H, brs)의 Rha-1'가 co-relation을 확인하였다. D-galactopyranose의 anomer δ_H 5.62 (1H, d, $J=7.5$ Hz)의 coupling constant로 보아 D-galactopyranose는 kaempferol 3번 위치에 β 형태로 결합하고 있으며 각 rhamnopyranose의 anomer δ_H 5.25 (1H, brs), 4.52 (1H, brs) signal이 broad singlet이므로 2개의 rhamnopyranose는 각각 α 형태로 1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 6 위치에 galactopyranose 결합하고 있음을 확인하였다. 이상의 결과로부터 compound **1**을 kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O-[L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-galactopyranoside, mauritianin (Fig. 9)으로 동정하였고, Ken 등의 선행연구⁴²⁾와 비교하여 결과가 일치함을 확인하였다.

분석의 확인을 위하여 ion trap 검출기의 LC-MS/MS를 이용하였다. 분석에 이용한 이온화 소스는 ESI (electrospray ionization) negative mode로 분석하였다. 그 결과 총 분자량인 739 $[M-H]^-$ 를 확인하였으며 그 외 중요한 fragment 이온으로 574 $[M-H-rha]^-$, 472 $[M-H-2rha]^-$, 285 $[M-H-2rha-gal]^-$ 도 확인하였다(Fig. 10).

Table 2. ¹H and ¹³C NMR data of compound **1** (500 and 125 MHz, CD₃OD)

No.	compound 1		references ^{42)*}	
	δ _C	δ _H (int, multi, <i>J</i> Hz)	δ _C	δ _H (int, multi, <i>J</i> Hz)
2	158.5		156.5	
3	134.5		132.9	
4	179.5		177.5	
5	163.2		161.3	12.7 (1H, s)
6	101.9	6.38 (1H, d, 2.0)	98.9	6.41 (1H, d, 1.9)
7	165.9		164.0	
8	94.8	6.18 (1H, d, 2.0)	93.8	6.21 (1H, d, 1.9)
9	158.7		156.5	
10	105.9		104.2	
1'	123.1		121.3	
2'	132.3	8.07 (2H, d, 9.0)	130.6	8.05 (2H, d, 8.3)
3'	116.3	6.90 (2H, d, 9.0)	115.2	6.88 (2H, d, 8.3)
4'	161.4		159.7	
5'	116.3	6.90 (2H, d, 9.0)	115.2	6.88 (2H, d, 8.3)
6'	132.3	8.07 (2H, d, 9.0)	130.6	8.05 (2H, d, 8.3)
Gal-1	102.7	5.62 (1H, d, 7.5)	99.2	5.56 (1H, d, 7.3)
Gal-2	77.6		75.6	
Gal-3	74.1		73.7	
Gal-4	73.9		68.3	
Gal-5	70.7		74.0	
Gal-6	67.1		65.8	
Rha-1	100.9	5.25 (1H brs)	100.7	5.05 (2H, s)
Rha-2	72.4		70.9	
Rha-3	72.5		70.8	
Rha-4	75.8		72.3	
Rha-5	69.9		68.8	
Rha-6	18.0	1.18 (3H, d, 6.5)	17.2	1.05 (3H, d, 5.4)
Rha-1'	99.9	4.52 (1H brs)	100.3	5.05 (2H, s)
Rha-2'	72.1	4.07-3.25 (sugar H)	70.9	
Rha-3'	72.3		70.5	
Rha-4'	75.3		72.3	
Rha-5'	69.7		68.3	
Rha-6'	17.6	0.97 (3H, d, 6.0)	17.7	0.79 (3H, d, 5.4)

* ¹H and ¹³C NMR data of mauritianin from reference (100 and 25.5 MHz, DMSO-*d*₆).

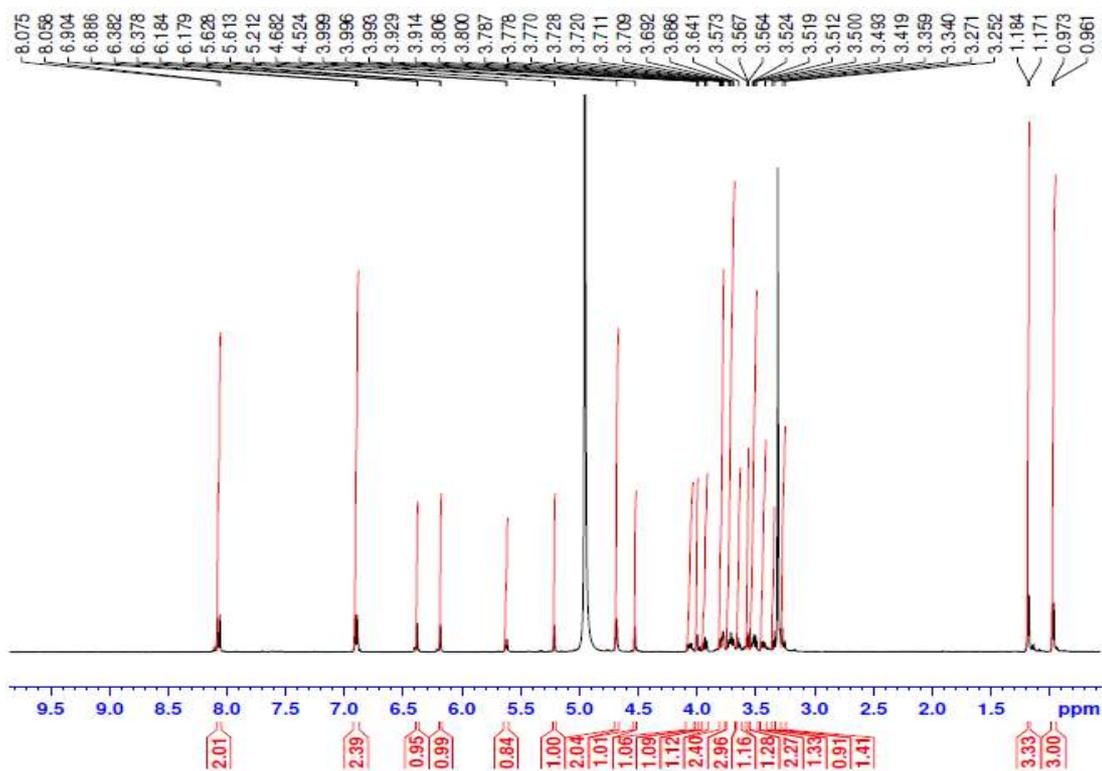


Fig. 5. ^1H -NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD .

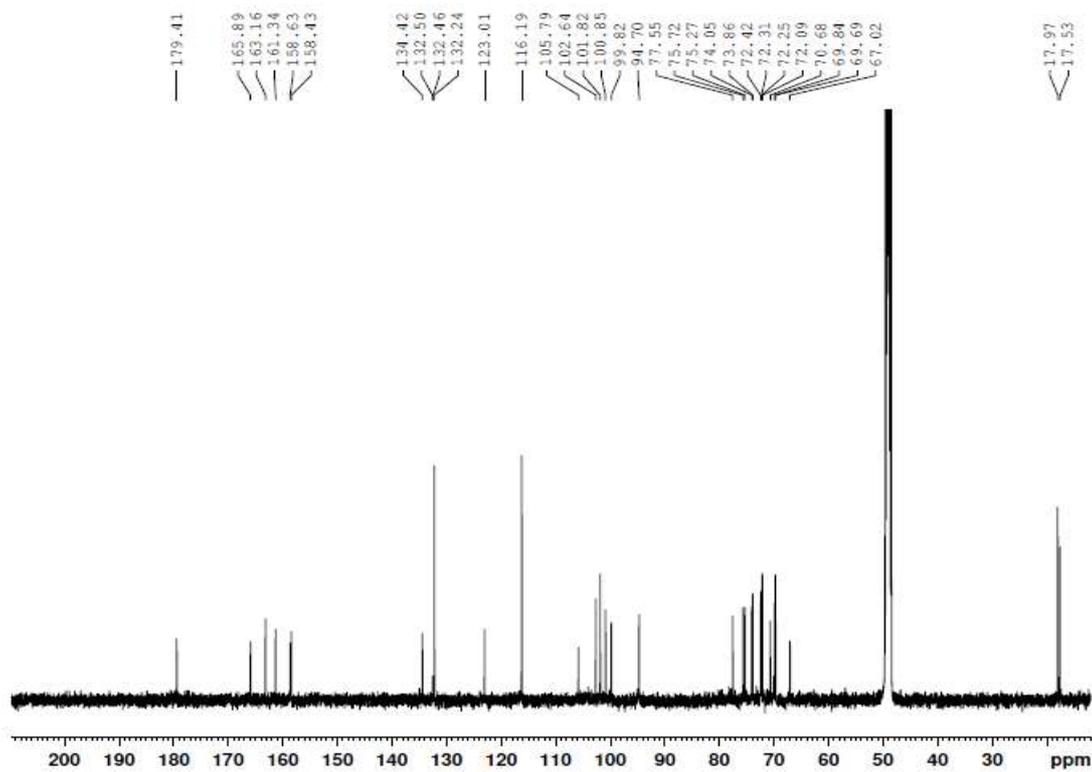


Fig. 6. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD .

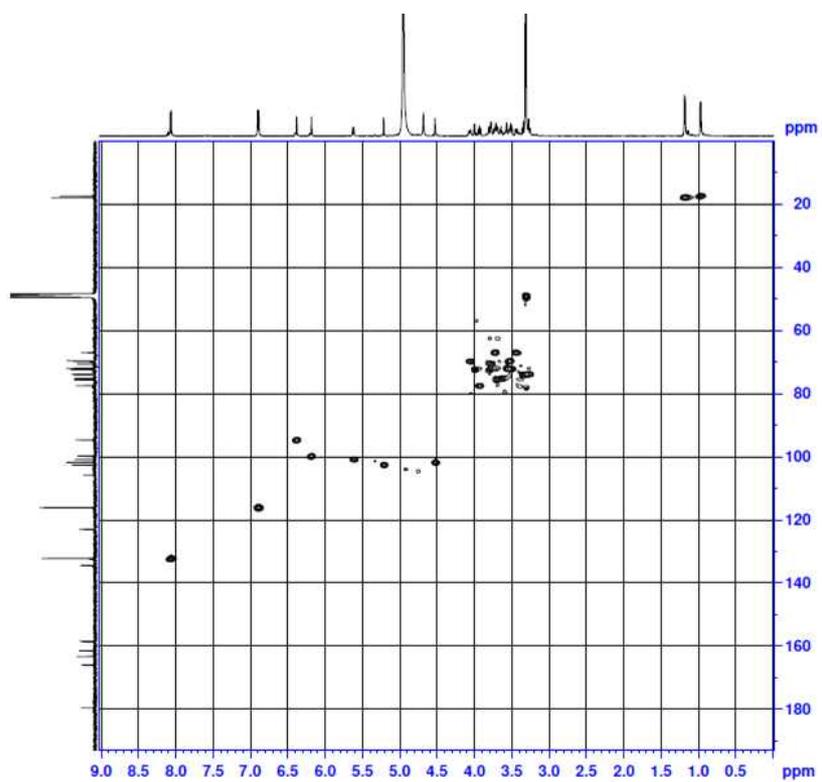


Fig. 7. HSQC spectrum of compound 1 in CD₃OD.

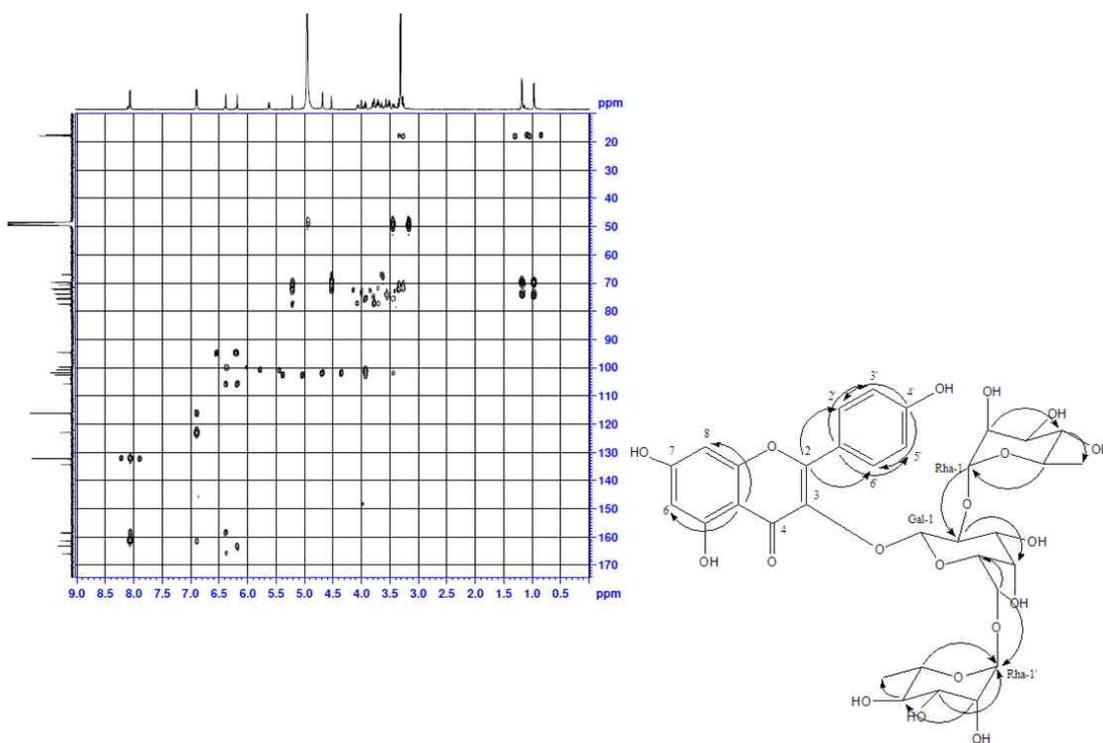


Fig. 8. HMBC spectrum of compound 1 in CD₃OD.

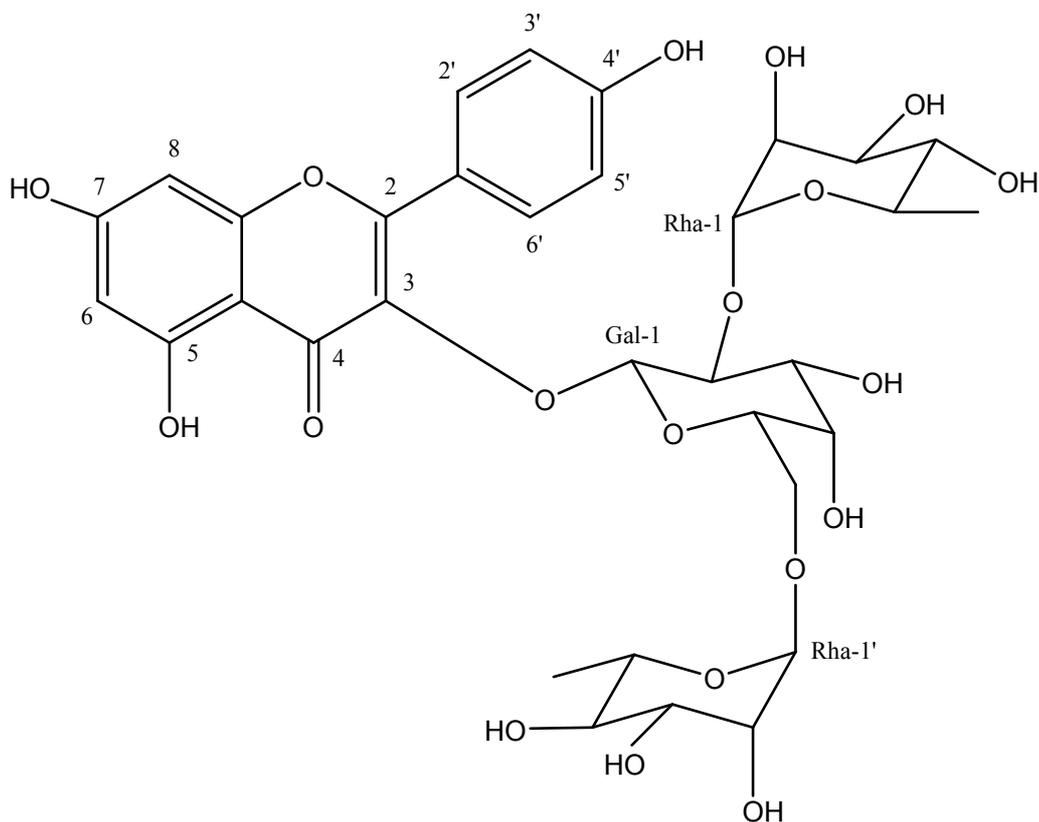


Fig. 9. Chemical structure of compound 1.

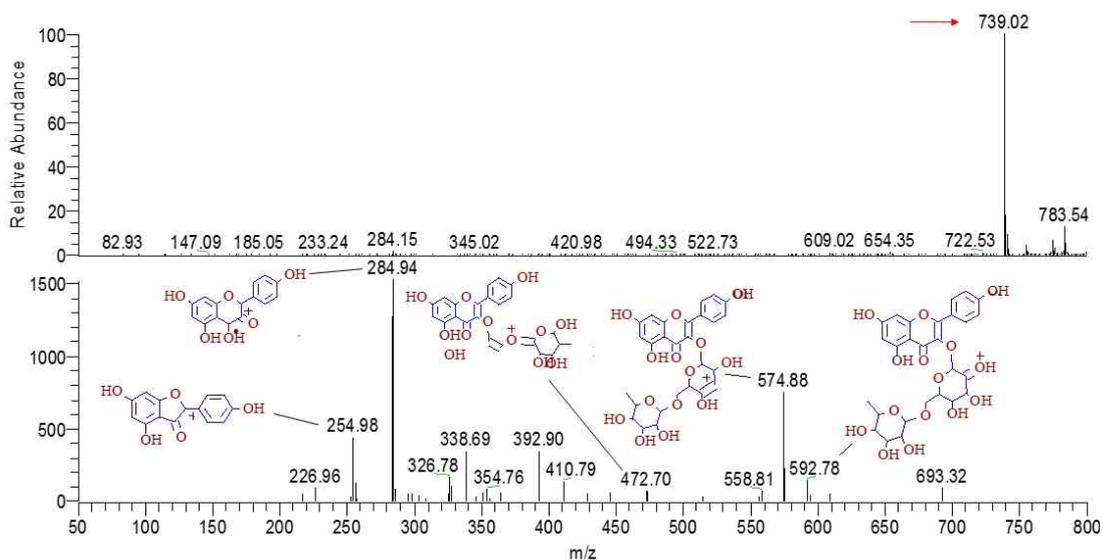


Fig. 10. Mass spectrum of compound 1.

1-2. Compound 2의 구조해석

Compound 2는 reverse phase silica gel column chromatography 후 얻어진 분획을 TLC 상에서 단일 spot으로 나타나 순도가 매우 높은 것으로 판단하여 ^1H 및 ^{13}C NMR 분석을 실시하였다. 그 결과 ^1H -NMR spectrum (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)로부터 δ_{H} 8.58 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-6'), 7.44 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3')이 서로 coupling 하고 있고, 그 값이 8.5와 9.0 Hz로 상수 값이 정확히 일치하지는 않지만 doublet인 것으로 보아 서로 ortho-coupling함을 예상하였다. 그리고 δ_{H} 6.94 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8)의 proton과 δ_{H} 6.69 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-6)에서 서로 meta-coupling한다고 보았을 때, flavonoid A-ring의 H-8과 H-6의 전형적인 peak로 예상되었다. 또한 δ_{H} 12.72 (1H, s, H-5)의 peak를 통하여 주변에 전기음성도가 큰 산소가 결합해 있는 proton을 예상 할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum 분석을 통해 탄소수가 13개 이상일 것으로 예측하였고, C-3이 δ_{C} 136.0으로 저자장 shift되어 proton이 hydroxyl기로 치환되어 있음을 알 수 있었고, δ_{C} 176.1에서 C-4의 carbonyl기를 관찰할 수 있었다. 또 δ_{C} 159.9에서 C-4'의 carbon signal이 관찰되어 proton이 치환되어 있음을 알 수 있었다. 그리고 δ_{C} 146.7 (C-2), 136.0 (C-3), 176.1 (C-4)의 carbon peak으로부터 flavone-3-ol의 구조를 예상할 수 있었다. 이러한 결과를 문헌⁶⁸과 비교하여 compound 2는 kaempferol (Fig. 11)로 동정하였다.

kaempferol은 다양한 식물군으로부터 동정된 바 있으며 특히 땃두릅 (*Araliaceae*)⁶⁹, 줄갈매나무 (*Rhamnus taquetii*)⁷⁰, 홍화 (*Carthami flos*)⁷¹, 양마 (*Hibiscus cannabinus L.*)⁷² 및 꾸지뽕나무 (*Cudrania tricuspidata*)⁷³ 등에서 분리가 보고되어 있다. 이 화합물의 생리활성에 대한 연구로는 항산화 활성, 미백, 그리고 대장암이나 전립선암 등에 대한 항암 효과 등이 보고된 바 있다.⁷⁴⁻⁷⁵

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **2** (500 and 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	compound 2		references ^{68)*}	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
2	146.7		146.8	
3	136.0		135.6	
4	176.1		175.9	
5	161.6	12.72 (1H, s)	160.7	12.60 (1H, s)
6	98.6	6.69 (1H, d, 1.5)	98.2	6.21 (1H, d, 2.0)
7	164.8		163.9	
8	93.8	6.94 (1H, d, 2.0)	93.5	6.43 (1H, d, 2.0)
9	157.0		156.4	
10	103.3		103.2	
1'	122.4		121.8	
2'	129.7	8.58 (2H, d, 8.5)	128.6	8.02 (2H, d, 8.8)
3'	115.7	7.44 (2H, d, 9.0)	115.0	6.86 (2H, d, 8.8)
4'	159.9		159.2	
5'	115.7	7.44 (2H, d, 9.0)	115.0	6.86 (2H, d, 8.8)
6'	129.7	8.58 (2H, d, 8.5)	128.6	8.02 (2H, d, 8.8)

* Reference compound (kaempferol) was isolated from *Cornus officinalis* (400 and 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

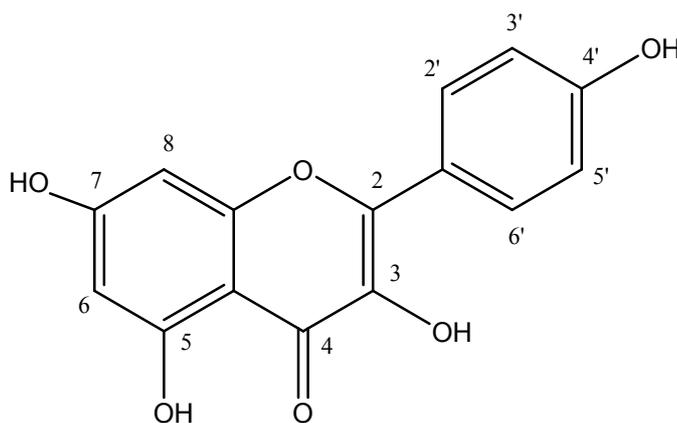


Fig. 11. Chemical structure of compound **2**.

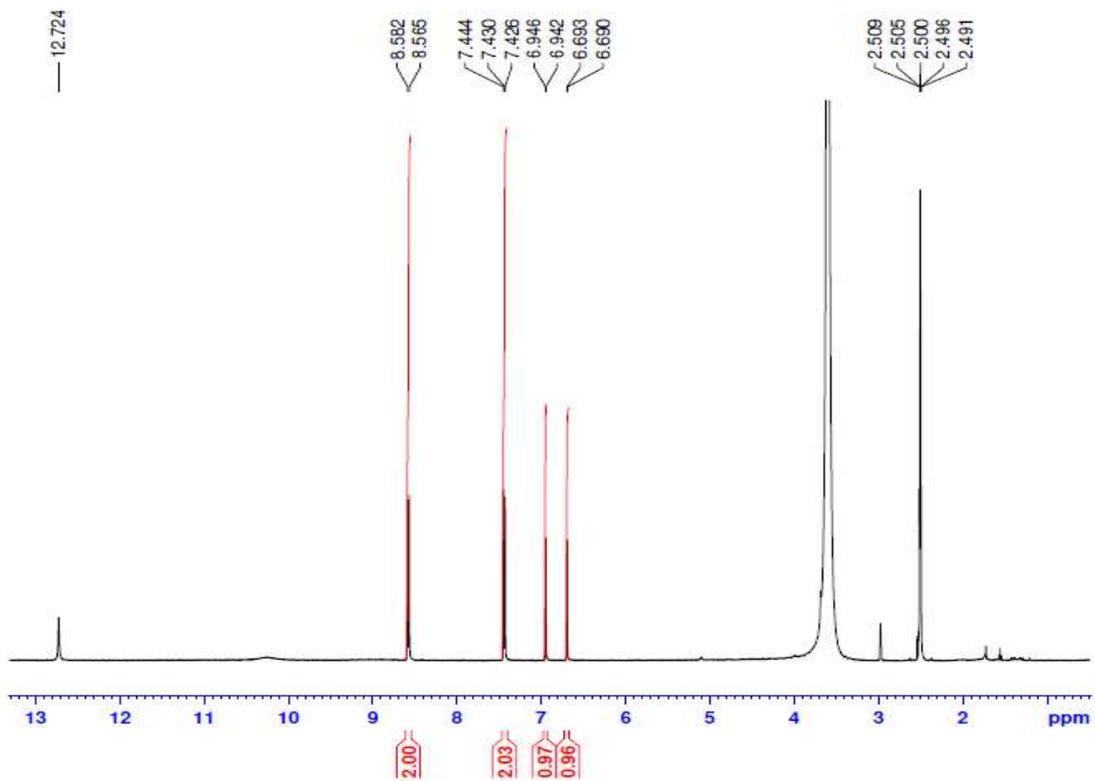


Fig. 12. ^1H -NMR spectrum of compound 2 in $\text{DMSO}-d_6$.

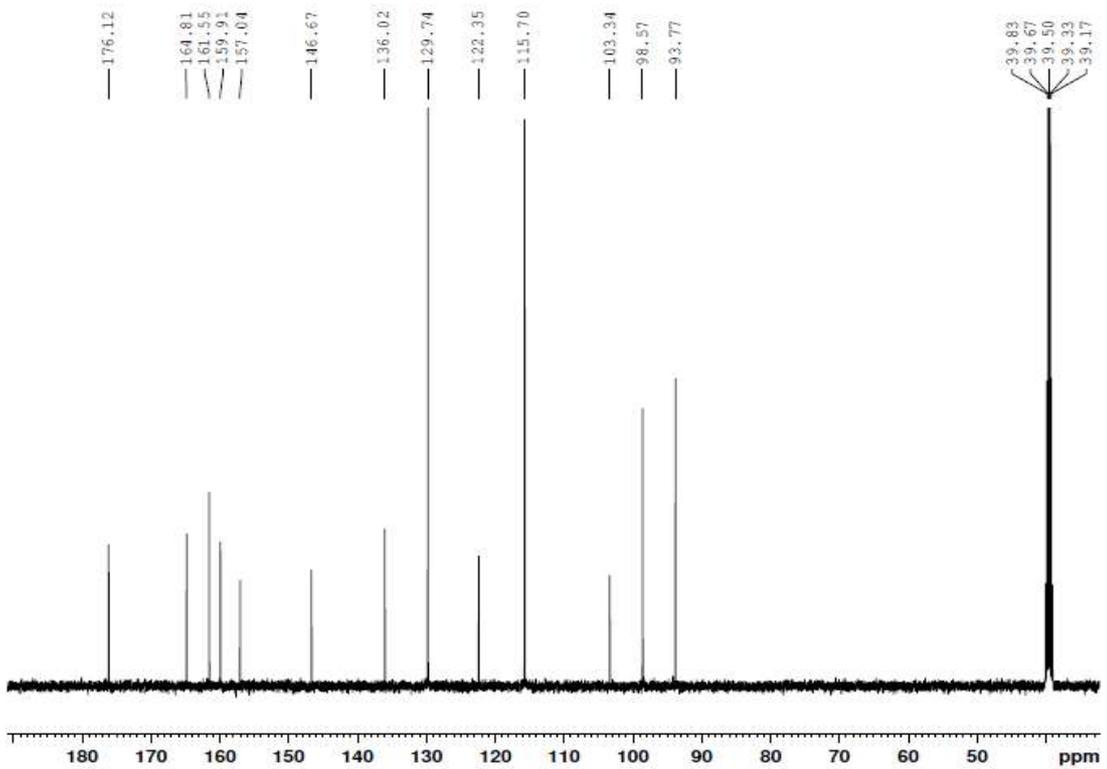


Fig. 13. ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 in $\text{DMSO}-d_6$.

1-3. Compound 3의 구조해석

Compound 3은 reverse phase silica gel column chromatography 후에 compound 2보다 앞선 분획에서 얻어졌으며 그 구조를 확인하기 위해 ^1H 및 ^{13}C NMR을 분석을 수행하였다. ^1H -NMR spectrum (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)로부터 flavonoid B ring에 해당되는 3종의 sp^2 carbon proton signal들 [δ_{H} 7.66 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-2'), 6.88 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 7.53 (1H, dd, $J=8.5, 2.5$ Hz, H-6')]을 제외하고 compound 2와 매우 유사하였고, proton들의 chemical shift, 분열 패턴 및 coupling constant 값으로부터 이 화합물은 C-3' 위에 hydroxyl group이 존재하는 quercetin으로 예상하였다. 이후 문헌의 NMR data와 비교하였고 결과와 일치함을 확인함에 따라 compound 3은 quercetin (Fig. 14)으로 동정되었다.

Quercetin은 가장 분포가 넓은 flavonoid로 70종이 넘는 많은 수의 배당체를 형성하고 있으며, 복분자(*Rubus coreanum* Miquel)⁷⁶, 진달래(*Jindalrae*)꽃⁷⁷, 달단메밀(*Fagopyrum tataricum*)⁷⁸, 곧은 나무이끼(*Climacium dendroides*)⁷⁹ 및 노각나무(*Stewartia pseudocamellia*)⁸⁰ 등에서 성분 분리 및 항산화 활성이 보고되어 있다.

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **3** (500 and 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	compound 3		references ^{68)*}	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
2	146.9		146.6	
3	135.8		135.8	
4	175.9		175.7	
5	160.8	12.48 (1H, s)	160.8	12.50 (1H, s)
6	98.2	6.18 (1H, d, 2.0)	98.2	6.18 (1H, d, 1.8)
7	163.9		163.9	
8	93.4	6.40 (1H, d, 2.0)	93.4	6.40 (1H, d, 1.8)
9	156.2		152.4	
10	103.1		103.2	
1'	122.0		122.0	
2'	115.1	7.66 (1H, d, 2.5)	115.0	7.68 (1H, d, 2.1)
3'	145.1		145.0	
4'	147.8		147.5	
5'	115.7	6.88 (1H, d, 8.5)	115.6	6.89 (1H, d, 8.5)
6'	120.1	7.53 (1H, dd, 8.5, 2.5)	120.1	7.54 (1H, dd, 8.5, 2.1)

* Reference compound (quercetin) was isolated from *Cornus officinalis* (400 and 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

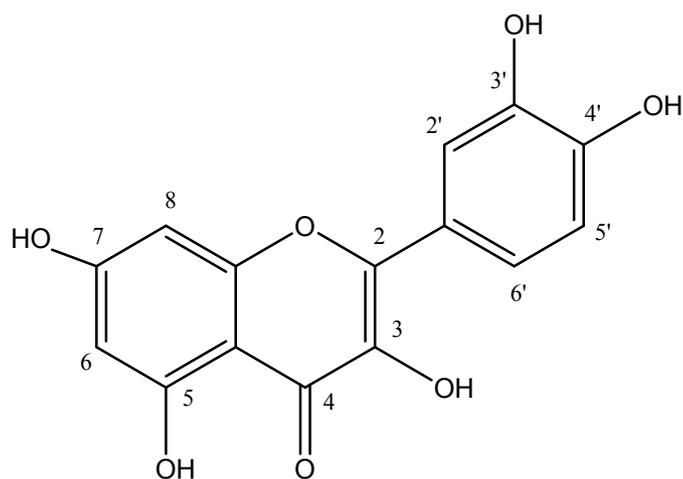


Fig. 14. Chemical structure of compound **3**.

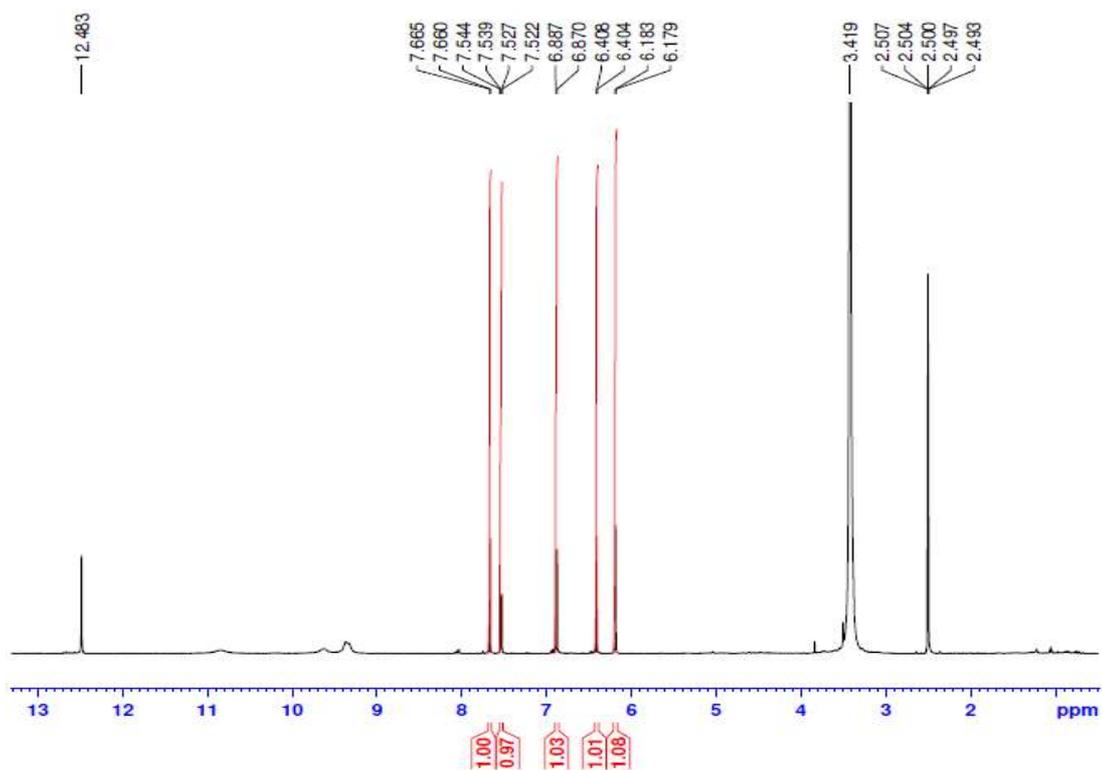


Fig. 15. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in $\text{DMSO}-d_6$.

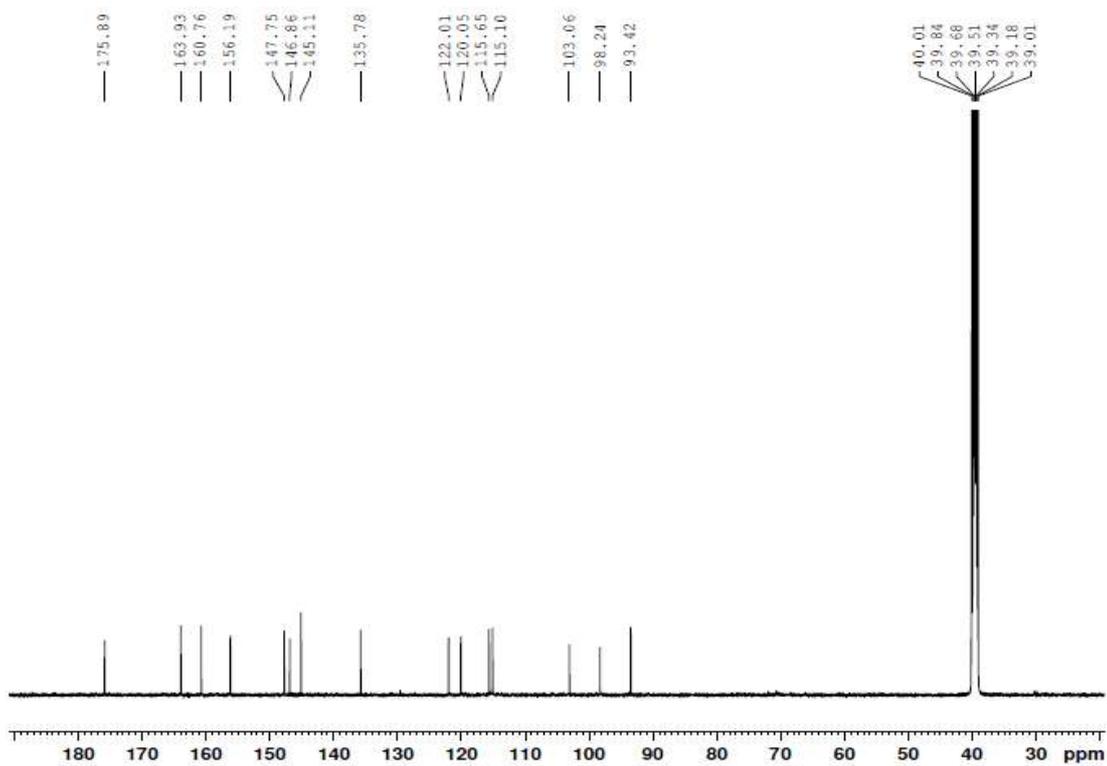


Fig. 16. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in $\text{DMSO}-d_6$.

2. *A. sojae*에 의한 갯까치수영 추출물의 발효

2-1. *A. sojae*에 의한 갯까치수영 추출물 발효의 최적 조건

갯까치수영 추출물 발효에서 *A. sojae*의 균체 성장에 효과적인 배양 조건을 선별하는 실험을 수행하였다. 발효를 위한 배양 조건 중 하나의 변수만 달리하여 비교하는 실험으로 성장한 균체 증가량과, 배양 중 생산되는 유기산에 의해 낮아질 것으로 예측한 배양액의 pH의 저감 정도를 아래의 수식으로 계산하여 단순 비교하였다.

$$\text{Variation ratio} = \frac{B}{A}$$

A : 배양 전 균체량(g) 또는 배양 전 pH

B : 배양 후 균체량(g) 또는 배양 후 pH

먼저 배양 온도의 선정 실험에서 설정한 온도는 각 20, 25, 28, 30, 35℃이었다. 고체인 GKS2A2 배지에서 성장 결과는 25℃에서 0.2 mm, 28℃에서 2 mm, 30℃에서 7 mm, 35℃에서 6 mm이었고, 20℃에서는 생장이 확인되지 않았다. 또한 액상인 GKS5B 배지에서는 30℃의 균체량과 pH의 변화가 가장 컸으므로 배양 온도로 선정하였다(Fig. 17a).

두 번째로 배양액의 pH를 각 3, 4, 5, 6, 7로 조정된 실험에서는 pH 6의 변화가 가장 컸으므로 배양 pH로 선정하였다(Fig. 17b).

세 번째로 종균의 접종량을 1, 3, 5, 10%(v/v)으로 주어 준 실험에서는 3%(v/v)일 때 가장 좋았으며 접종량이 증가할수록 생육도는 감소하는 결과를 보였다(Fig. 17c). 이는 증식을 위해 이용할 수 있는 당의 고갈에 일차적인 원인이 있는 것으로 추정된다.

네 번째로 교반 속도를 100, 200, 300 rpm으로 다르게 해서 실험을 수행하였을 때 300 rpm에서 가장 큰 변화를 확인 할 수 있었다(Fig. 17d).

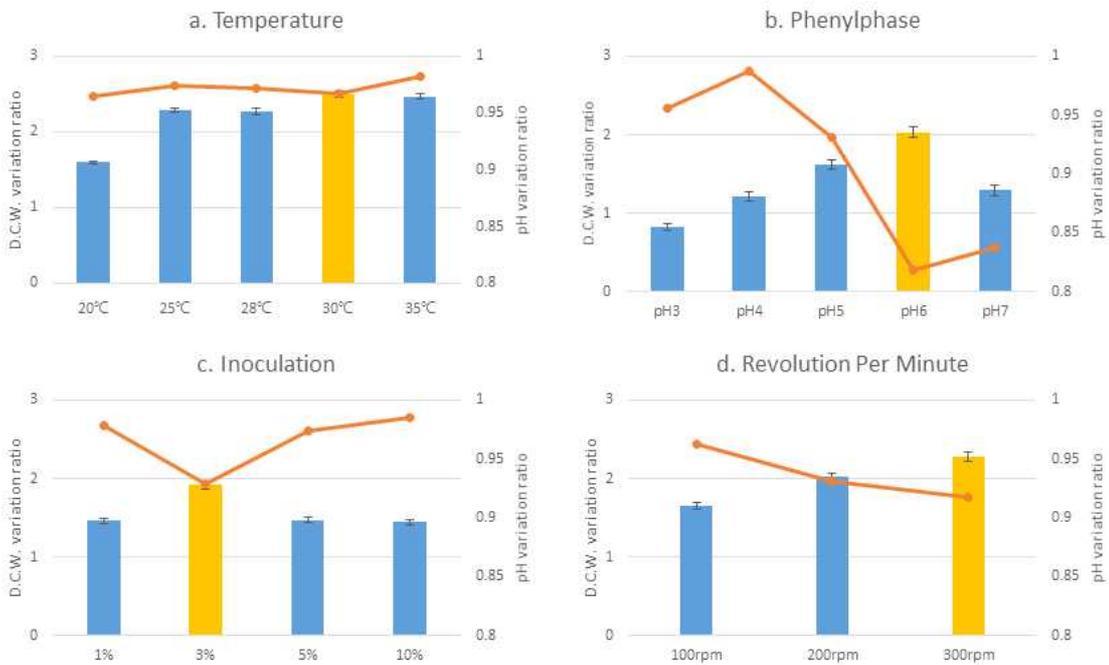


Fig. 17. The selected culture conditions for mass production of *A. sojae* by using one factor at a time. Each temperature, pH, inoculum and rpm conditions for optimal culture were determined by simple changes in mass and pH.

배양 조건 최적화 실험으로 구한 30°C, pH 6, 3% 접종량 그리고 300 rpm의 배양 조건을 적용하여 시간에 따른 탄소원, 균체량과 pH 변화를 나타내었다(Fig. 18). 발효 6시간까지는 영양물질이 풍부한 배지에서 부족한 배지로 옮김(shift-down)에 따른 지체기로 보이며 이후 96시간까지의 일정한 성장 추세를 보아 GKS5B 배지에서의 *A. sojae*의 대수기로 판단된다. 본 실험에서의 발효 목적은 2차 대사물의 획득이므로 정체기에 접어든 것으로 보이는 120시간 이상의 발효물을 이 후 실험에 사용하였다.

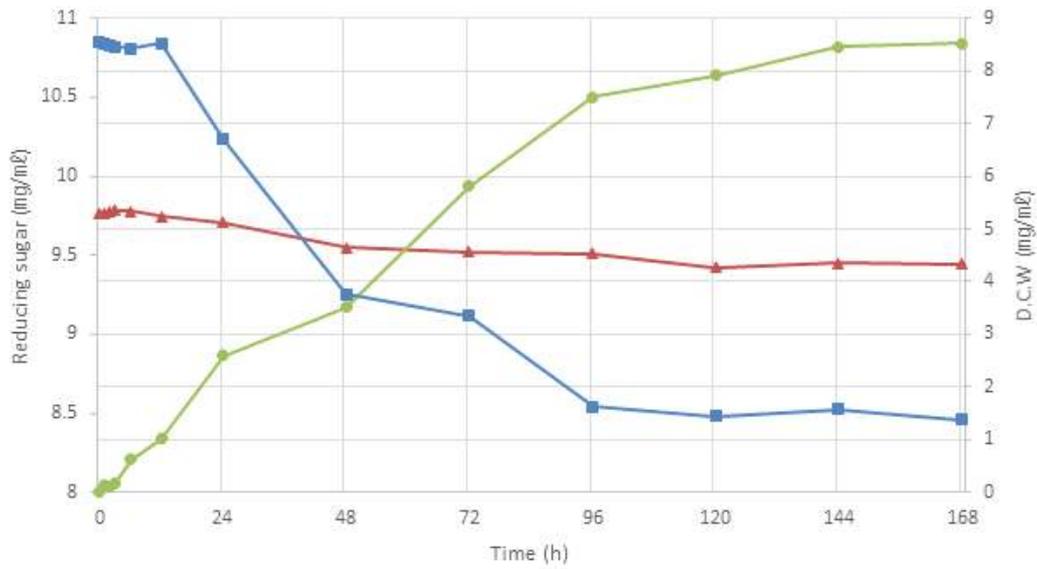


Fig. 18. Time profiles of residual glucose concentration (■), pH (▲) and D.C.W. (●) in the batch culture at 30°C, pH 6, 300 rpm of inoculated with 3% *A. sojae*.

2-2. 발효의 역할에 대한 예측

갯까치수영 추출물의 발효 전과 발효 후의 HPLC를 비교한 결과(Fig. 19) 발효 전에 비해 발효 후에서 머무름시간(RT) 약 23.1분, 27.0분의 피크가 줄어들고 RT 약 31.7분의 피크의 크기가 늘어나고 약 33.4분의 피크가 새로 생겨남을 확인하였다. 본 연구에서는 mauritianin만을 얻을 수 있었지만 문헌⁴⁶⁾ 조사에 따르면 갯까치수영(*Lysimachia mauritiana* Lam.)에서 분리된 물질은 다음과 같다.

- ▶ Quercetin-3-O-galactoside,
- ▶ Kaempferol-3-O-robinobioside,
- ▶ Kaempferol-3-O- α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -galactopyranoside,
- ▶ Kaempferol-3-O-(2,6-di-O- α -rhamnopyranosyl- β -galactopyranoside)

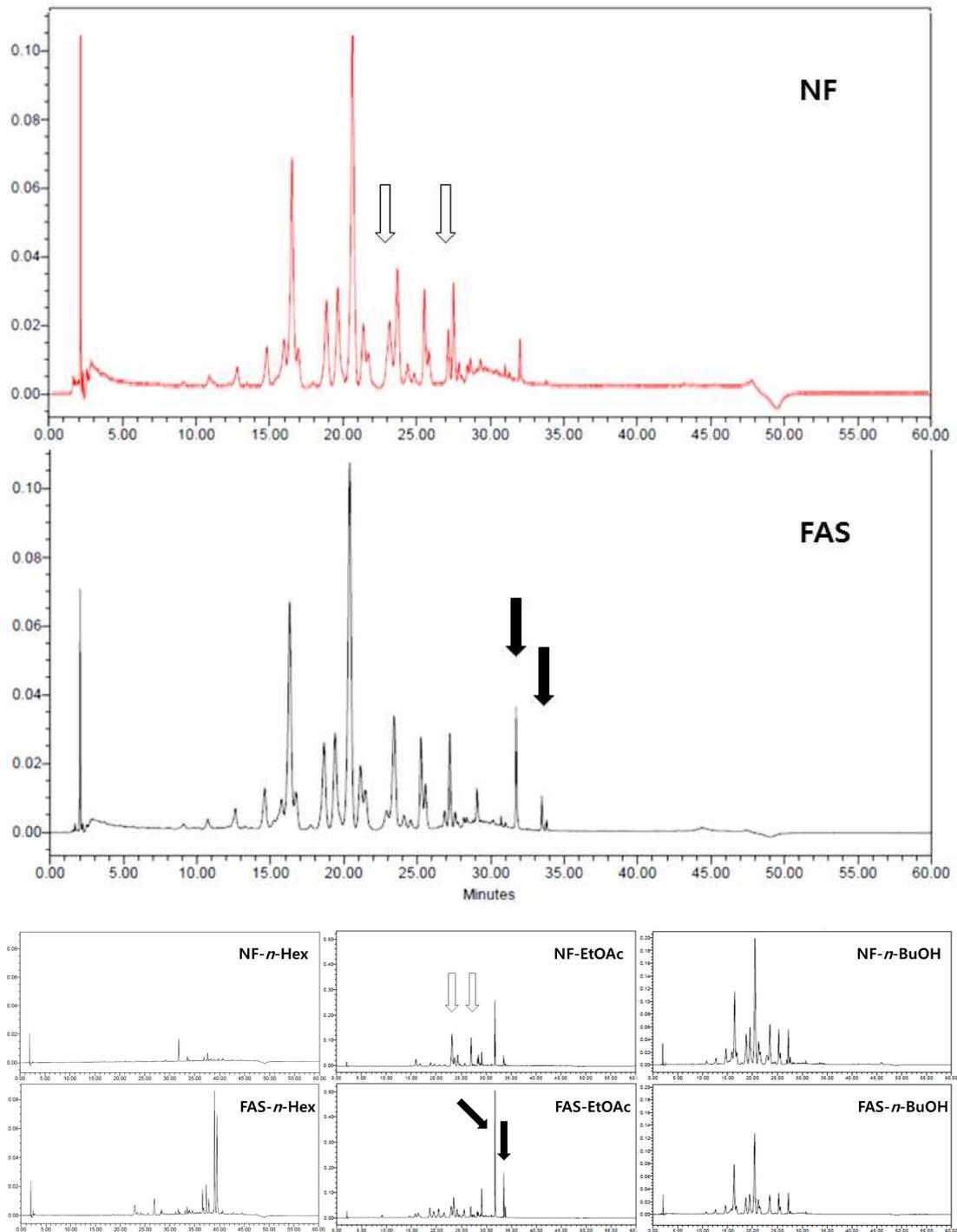


Fig. 19. Comparison of HPLC chromatogram of non- and fermented extracts and solvent layers from *L. mauritiana* Lam. White and black arrows represent decreased and increased peaks, respectively. NF : Non-fermented, FAS : Fermented with *A. sojae*.

이들 플라보노이드 배당체들의 비당부분(aglycon)은 각각 quercetin 및 kaempferol이다. 또한 HPLC를 이용하여 표준품으로 확인하였을 때 발효 후 성분으로 증가하거나 얻어진 화합물은 각각 quercetin (RT : 31.76분) 및 kaempferol (RT : 33.46분)이다. 따라서 누룩균 중의 당분해효소인 β -glucosidase가 작용하여 플라보노이드와 당 사이의 글리코시드결합을 가수분해하였음을 생각해 볼 수 있었다(Fig. 20).

또한 발효 전·후의 각 용매 층의 HPLC를 비교해보면 늘어난 RT 약 31.7분과 약 33.4분의 peak이 ethyl acetate 층에서 확인되므로 이 층에서의 활성 증강을 기대할 수 있었다.

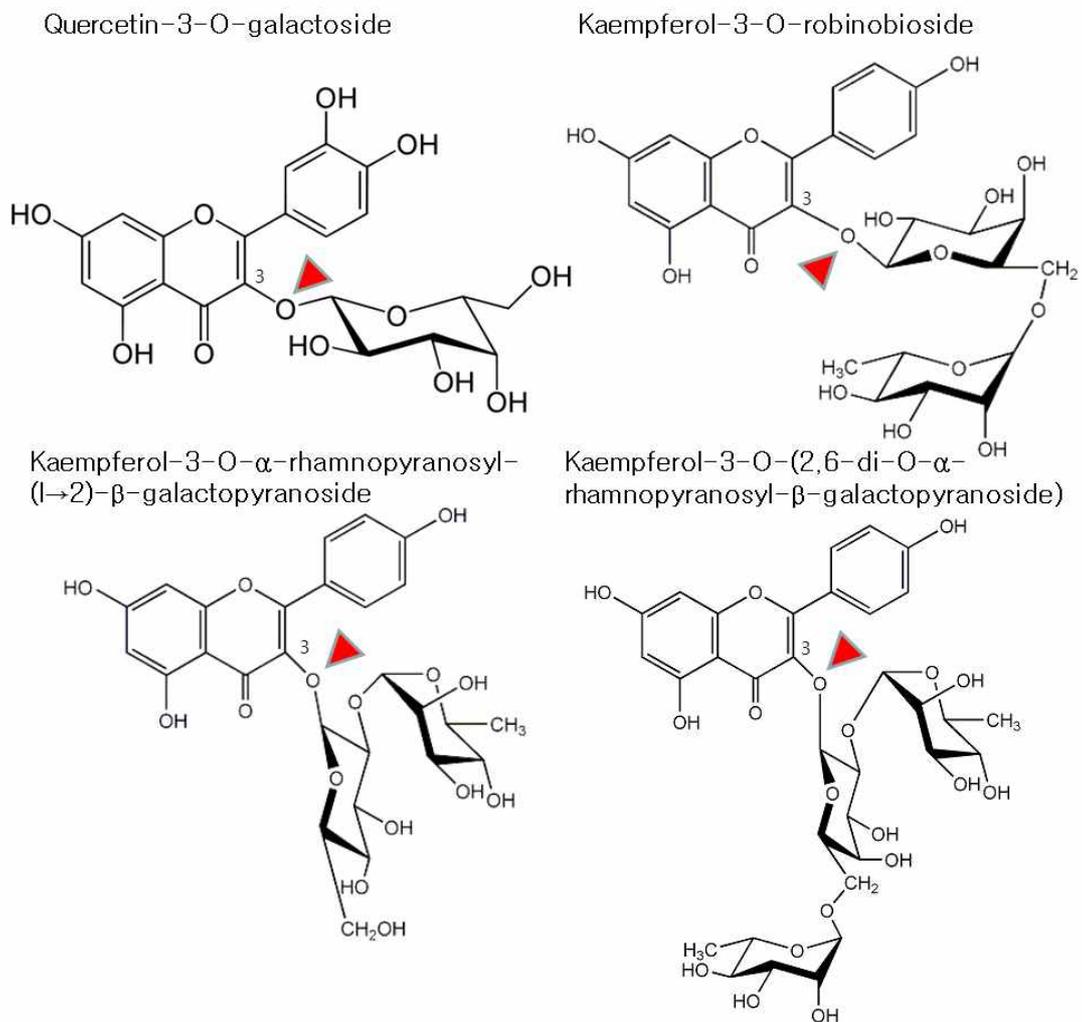


Fig. 20. Prediction of the role of fermentation in compound changes. The red arrow indicates the expected position of the enzyme action.

3. 발효 전·후 생리 활성 비교 평가

3-1. 항산화 활성 실험 결과

3-1-1. 총 폴리페놀 함량 측정

갯까치수영의 추출물과 발효한 추출물 그리고 그것들의 각 분획물의 총 폴리페놀 함량을 조사한 결과를 Fig. 21에 제시하였다. 발효하지 않은 추출물과 극성 순으로의 용매 분획물의 경우 각각 19.15 및 28.98, 29.78, 34.0, 25.88 $\mu\text{g GAE/mg}$ 으로 나타났으며, 발효 후에는 추출물이 24.69 $\mu\text{g GAE/mg}$, 용매 분획물은 각각 26.15, 65.02, 22.65, 25.95 $\mu\text{g GAE/mg}$ 으로 나타났다.

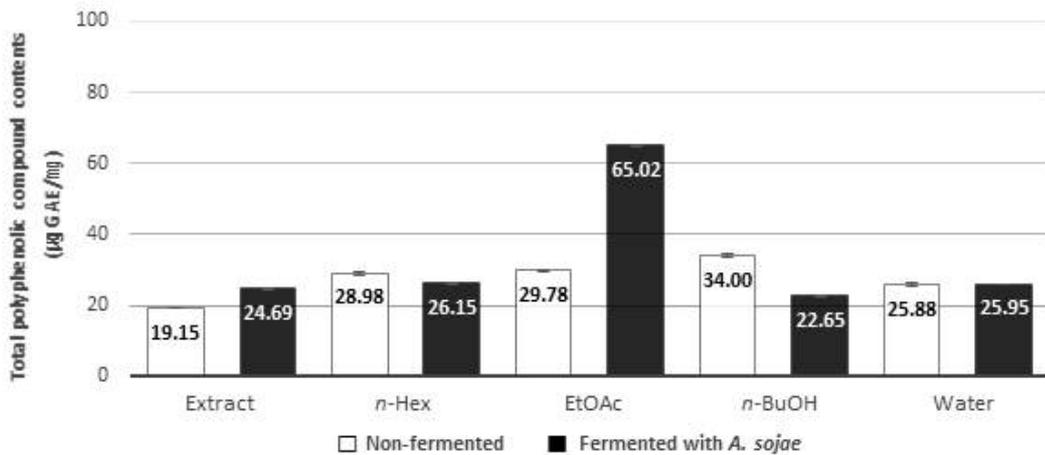


Fig. 21. Total polyphenolic compound contents of non- and fermented *L. mauritiana* Lam. extracts and solvent layers.

이에 따른 갯까치수영 추출물의 발효에 따른 전·후의 총 폴리페놀 함량의 변화를 Table 5. (a)에 제시하였다. 갯까치수영 추출물의 총 폴리페놀 함량은 28.9% 증가하였고, *n*-hexane 층과 *n*-butanol 층은 각 9.8, 33.4% 감소, ethyl acetate 층은 118.3% 증가, water 층은 거의 변화가 없음을 확인

할 수 있었다. 발효 전에는 *n*-butanol 층의 총 폴리페놀 함량이 가장 높았지만, 발효 후에는 ethyl acetate 층의 총 폴리페놀 함량이 크게 증가하여 가장 높았다. 폴리페놀 화합물은 수산기를 갖는 방향족 화합물의 총칭으로 식물계에 널리 존재하는 2차 대사산물로 세포벽, 리그닌, 다당류 등과 에스테르 결합을 하거나 중합체 형태로 있어서 수산기를 통한 수소공여와 페놀 고리구조의 공명안정화에 의하여 항산화 능력이 있음⁸¹이 알려져 있다. 이러한 폴리페놀 화합물은 발효 과정에서 강력한 페놀 분해 및 변형으로 인해 총 폴리페놀 함량이 감소된다는 보고⁸²⁻⁸⁴가 있으나 본 실험에서는 발효 후 추출물의 총 폴리페놀 함량이 높아지는 결과를 얻었다. 이 같은 결과는 폴리페놀이 수용성과 지용성으로 나뉘지고 추출용매에 따라 성분도 달라진다는 보고⁸⁵나 발효과정에서 기간이나 방법, 조건의 차이에 따라 페놀성 화합물이 고분자 화합물로부터 유리되어 추출이 용이해지거나 구조적인 전환으로 새로운 물질로 생성될 수 있을 것으로 유추되거나 검토가 필요하다고 사료된다.

3-1-2. 총 플라보노이드 함량 측정

갯까치수영의 추출물과 발효한 추출물 그리고 각 극성별 용매 분획물의 총 플라보노이드 함량을 측정 비교한 결과는 Fig. 22에 나타난 바와 같다. *A. sojae*를 이용하여 발효시킨 갯까치수영 추출물의 결과는 22.12 μg QUE/mg로 나타나 발효하지 않은 추출물인 16.01 μg QUE/mg보다 유의적으로 높은 함량을 나타내었다. 용매별 분획물을 살펴보면 발효하지 않은 추출물의 용매 분획물의 경우 각각 36.42, 26.41, 42.95, 15.45 μg QUE/mg으로 나타났으며, 발효 후의 용매 분획물은 각각 23.92, 52.05, 28.65, 19.76 μg QUE/mg으로 나타났다.

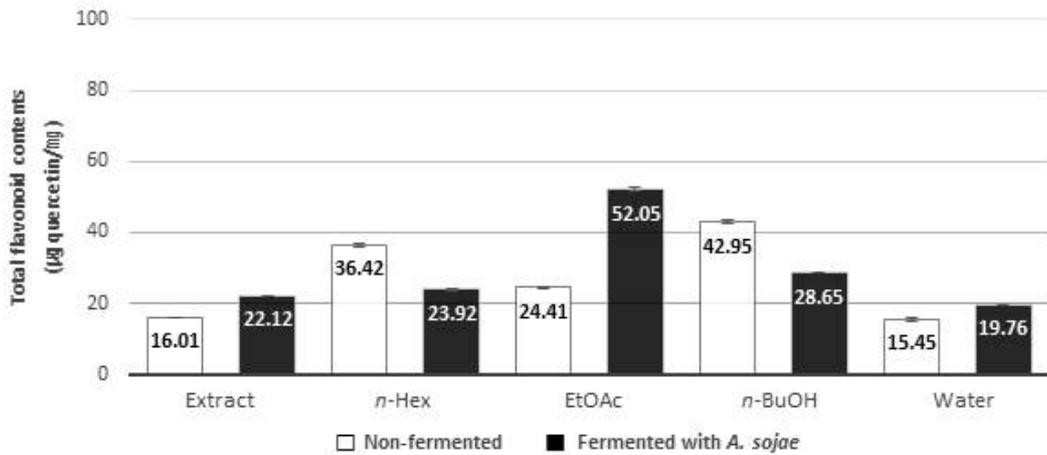


Fig. 22. Total flavonoid contents of non- and fermented *L. mauritiana* Lam. extracts and solvent layers.

갯까치수영 추출물의 발효에 따른 전·후의 총 플라보노이드 함량 변화를 Table 5. (b)에 제시하였다. 갯까치수영 추출물의 총 플라보노이드 함량은 발효 전에 비해 발효 후가 38.2% 증가하였고, *n*-hexane 층과 *n*-butanol 층은 각 34.3, 33.3% 감소, ethyl acetate 층과 water 층은 각 97.1, 27.9% 증가함을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량 측정 결과에서도 총 폴리페놀 함량 측정 결과와 유사하게 발효 전에는 *n*-butanol 층의 총 플라보노이드 함량이 가장 높았지만, 발효 후에는 ethyl acetate 층의 총 플라보노이드 함량이 크게 증가하여 가장 높았다. 식물에 존재하는 폴리페놀 화합물이나 플라보노이드는 천연 항산화제로 작용하며, 폴리페놀 화합물은 hydroxy radical 및 superoxide radical 소거능과, 플라보노이드는 alkylperoxyl 라디칼 소거능과 연관이 있다는 보고가 있다.⁸⁶ 식물 중에 함유된 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 항산화 활성과 유의적인 상관관계가 있어 항산화 활성을 측정하는데 중요한 척도로 사용된다.⁸⁷ 따라서 이들 결과는 항산화 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 추정하였다.

Table 5. Changes in total polyphenol and total flavonoid contents after fermentation of *L. mauritiana* Lam. extracts and solvent layers

composition	total polyphenol contents (a)			total flavonoid contents (b)		
	non-F. conc. (µg GAE/mg)	F. conc. (µg GAE/mg)	rate of change (%)	non-F. conc. (µg QUE/mg)	F. conc. (µg QUE/mg)	rate of change (%)
extract	19.15±0.1	24.69±0.2	28.93	16.01±0.7	22.12±1.2	38.16
<i>n</i> -hexane layer	28.98±0.4	26.15±0.2	-9.77	36.42±1.5	23.92±0.6	-34.32
ethyl acetate layer	29.78±0.1	65.02±0.4	118.33	26.41±1.0	52.05±0.1	97.08
<i>n</i> -butanol layer	34.00±0.6	22.65±0.1	-33.38	42.95±2.1	28.65±1.8	-33.29
water layer	25.88±0.3	25.95±0.3	0.27	15.45±0.5	19.76±1.9	27.90

The values are expressed as means±standard deviation of triplicate tests.

3-1-3. DPPH radical 소거 활성

항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 유리기 소거 작용은 활성라디칼(free radical)에 전자를 공여하여 추출물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다.⁸⁸ DPPH는 안정한 유리기로 cysteine, glutathione과 같은 황함유 아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine (p-phenylenediamine, p-aminophenol) 등에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화 물질의 항산화능 측정에 많이 이용되고 있다. 이에 DPPH법을 이용하여 갯까치수영 추출물과 용매 분획물, 발효물과 그 용매분획물의 항산화능을 측정하였다. 결과는 Table 6 및 Fig. 23~25와 같이 제시하였으며, 0~1000 µg/mL의 농도 범위에서 농도 의존적인 결과를 보였다. 발효를 하지 않은 갯까치수영 추출물의 라디칼 소거 억제 활성의 IC₅₀ 값은 445.12±0.85 µg/mL로 나타남에 반해 발효한 갯까치수영 추출물의 IC₅₀ 값은 121.06±0.51 µg/mL로 나타났으며, 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid, kaempferol, quercetin 보다는 낮았지만 *A. sojae*로 발효 후 DPPH 라

디칼 소거 억제 활성이 높아진 것을 확인할 수 있었다. 특히 ethyl acetate 층에서는 발효 전 $61.59 \pm 0.37 \mu\text{g/mL}$ 에서 발효 후 $43.16 \pm 0.33 \mu\text{g/mL}$ 으로 라디칼 소거 억제 활성이 높아진 것으로 나타났고, *n*-butanol 층에서는 발효 전 $63.76 \pm 0.65 \mu\text{g/mL}$ 에서 발효 후 $143.78 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$ 으로 라디칼 소거 억제 활성이 낮아진 것으로 나타났다. 이는 ethyl acetate 층에서 우수한 항산화 능을 가진 물질의 증가가 있었을 것으로 사료된다. 이전 연구⁸⁹에서는 항산화 성분 함량과 free radical 소거능과의 상관관계에서 폴리페놀 함량에 비례하여 활성이 증가한다고 하였는데, 본 연구에서는 이와 유사한 결과를 나타냈으며, 발효 처리에 의해 항산화 활성이 증가하는 것으로 확인되어 추후 발효처리와 항산화 능의 연관성에 대해 보다 세부적인 연구가 이뤄져야 할 것으로 사료된다.

Table 6. The Anti-oxidant potential of the extracts and solvent layers as calculated IC₅₀ values from the DPPH assay

composition	IC ₅₀ (μg/mL)*	
	non-fermented DPPH radical scavenging activity	fermented DPPH radical scavenging activity
extract	445.12±0.85	121.06±0.51
<i>n</i> -hexane layer	>1,000	148.58±0.33
ethyl acetate layer	61.59±0.37	43.16±0.33
<i>n</i> -butanol layer	63.76±0.65	143.78±0.41
water layer	86.42±0.60	104.77±1.26
ascorbic acid	8.17±0.26	
kaempferol	6.73±0.42	
quercetin	6.63±0.41	

* IC₅₀ values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

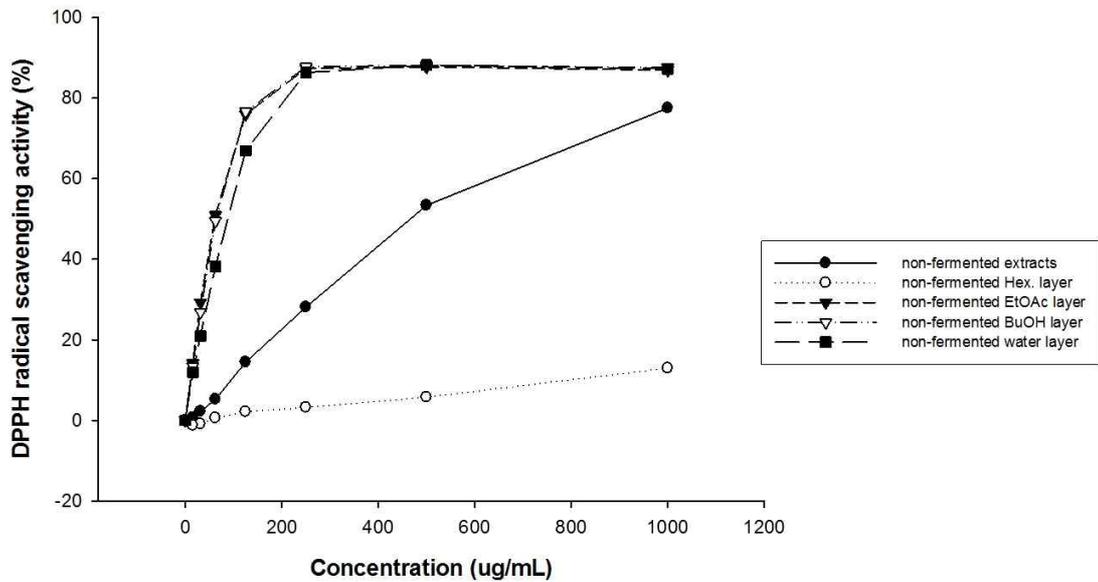


Fig. 23. Anti-oxidant potential on extract and solvent layers of non-fermented *L. mauritiana* Lam.

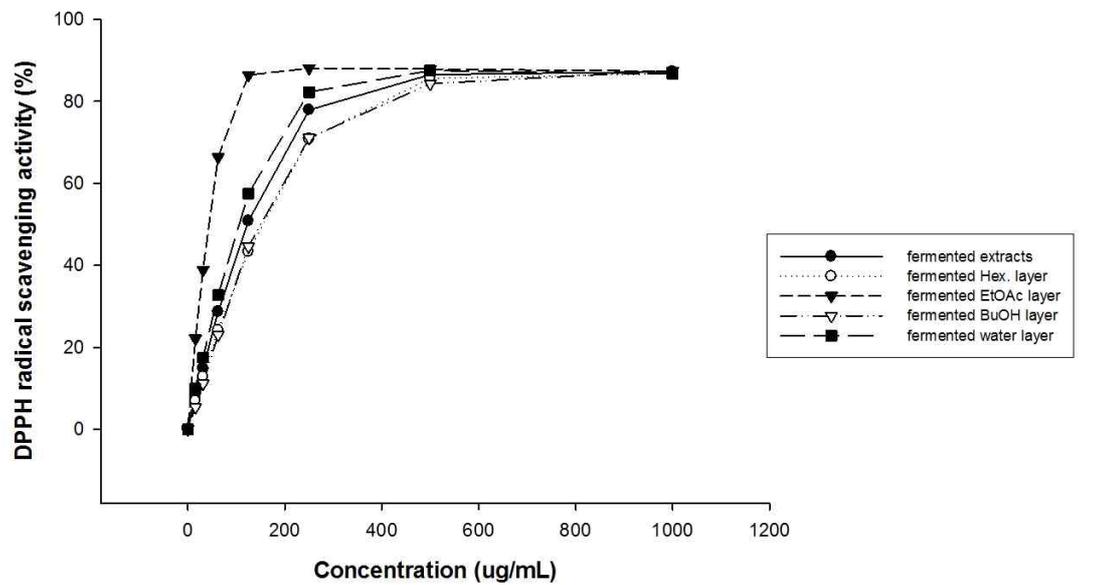


Fig. 24. Anti-oxidant potential on extract and solvent layers of fermented *L. mauritiana* Lam.

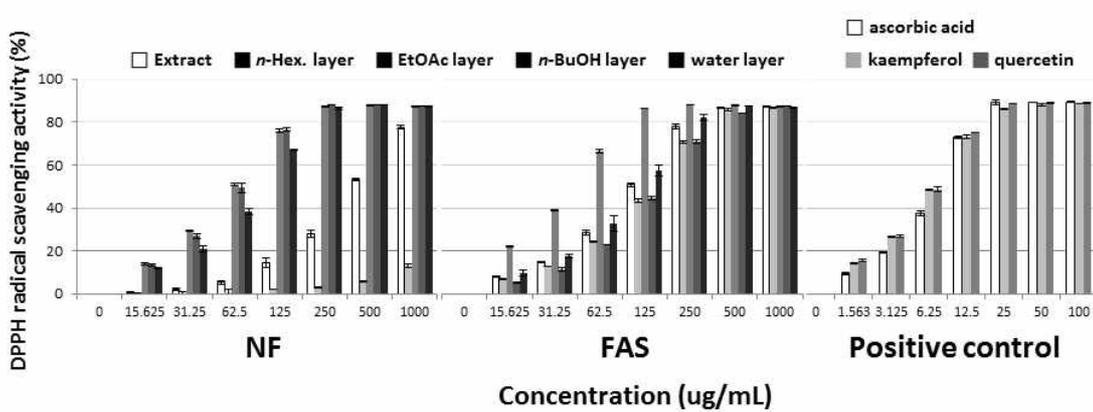


Fig. 25. DPPH radical scavenging activity of *L. mauritiana* Lam. extracts and solvent layers by concentration. NF : Non-fermented, FAS : Fermented with *A. sojae*.

3-1-4. Superoxide radical 소거 활성

Xanthine oxidase에 의해 생성된 superoxide를 nitro blue tetrazolium (NBT)과 반응시켜 항산화 정도를 측정하는 NBT/XO superoxide scavenging assay를 실시하였다. 발효 전·후의 갯까치수영 추출물 및 용매 분획 층에 대한 결과는 Fig. 26와 같이 대체로 농도 의존적으로 superoxide의 소거 활성을 보였다. 각각의 IC₅₀ 값을 구한 결과는 Table 7과 같으며, 11.25±4.51 µg/mL의 결과를 보인 ascorbic acid와, 6.21±2.20 µg/mL인 kaempferol 보다는 항산화 효과가 작은 것으로 나타났다. 또한 발효 전에는 측정되지 않은 용매 층을 제외하고 증가율을 계산해보면 발효 전보다 후에 약 30%의 항산화 활성이 증가하는 것으로 나타났다.

Table 7. The Anti-oxidant potential of the extracts and solvent layers as calculated IC₅₀ values from the NBT/XO assay

Composition	IC ₅₀ (μg/mL)*	
	non-fermented superoxide radical scavenging activity	fermented superoxide radical scavenging activity
extract	158.80±2.06	104.90±1.23
<i>n</i> -hexane layer	>1,000	94.83±3.47
ethyl acetate layer	83.20±0.73	58.99±0.73
<i>n</i> -butanol layer	168.35±1.64	118.43±1.32
water layer	>1,000	79.50±1.72
ascorbic acid	11.25±4.51	
kaempferol	6.21±2.20	

* IC₅₀ values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

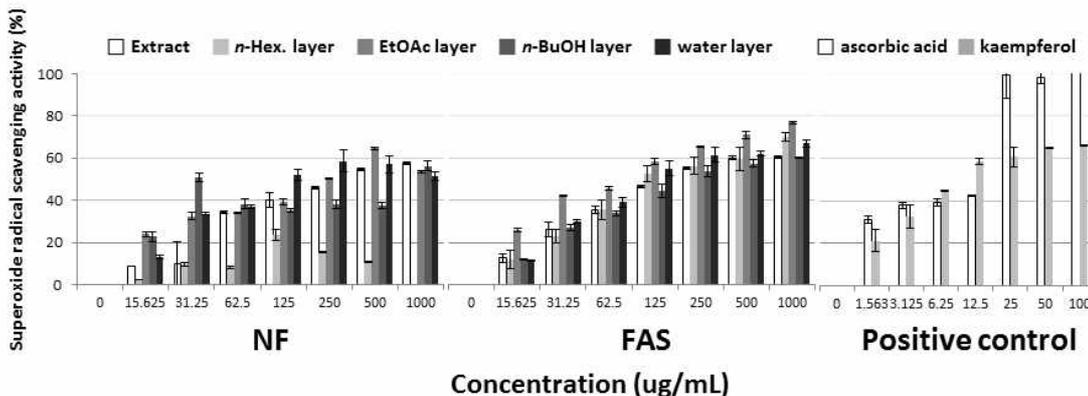


Fig. 26. Superoxide radical scavenging activity by concentration of *L. mauritiana* Lam. extracts and solvent layers. The scavenging potential for superoxide radicals was analyzed via a hypoxanthine/xanthine oxidase generating system coupled with nitroblue tetrazolium. NF : Non-fermented, FAS : Fermented with *A. sojae*.

3-1-5. Xanthine oxidase 저해 활성

갯까치수영 추출물과 용매 분획물의 발효 전·후에 따른 XO 저해 활성은 Table 8 및 Fig. 27과 같이 나타났다. Ethyl acetate 층에서만 발효 전후의 IC₅₀ 결과를 얻을 수 있었고, 발효 전 594.18±2.68 µg/mL에서 발효 후 172.10±0.54 µg/mL으로 변화를 확인하였다. IC₅₀ 값이 4.40±1.22을 보인 kaempferol 보다는 낮은 결과이지만 발효 전에 비하여 발효 후에는 항산화 활성이 증가함을 확인 할 수 있었다.

Table 8. The Anti-oxidant potential of the extracts and solvent layers as calculated IC₅₀ values from the XO assay

Composition	IC ₅₀ (µg/mL)*	
	non-fermented xanthine oxidase inhibitory effect	fermented xanthine oxidase inhibitory effect
extract	>1,000	>1,000
<i>n</i> -hexane layer	>1,000	>1,000
ethyl acetate layer	594.18±2.68	172.10±0.54
<i>n</i> -butanol layer	>1,000	>1,000
water layer	>1,000	>1,000
kaempferol	4.40±1.22	

* IC₅₀ values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

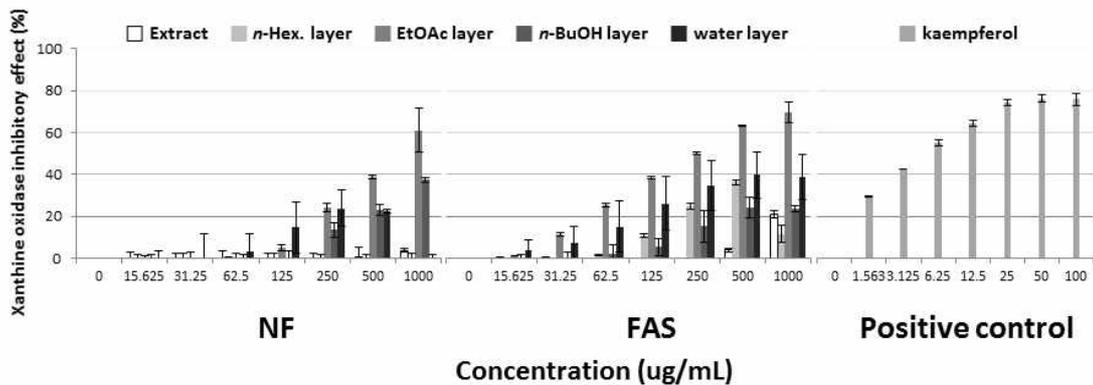


Fig. 27. Xanthine oxidase inhibitory effect rates of extracts and solvent layers from *L. mauritiana* Lam. Absorbance of uric acid produced by XO was measured at 290 nm. NF : Non-fermented, FAS : Fermented with *A. sojae*.

3-2. 항염 활성 실험 결과

3-2-1. RAW 264.7 cell에서의 nitric oxide 생성 억제 효능 및 세포 독성 평가

생산된 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 활성 산소의 하나인 superoxide anion ($\cdot O_2^-$)과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite ($ONOO^-$)를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화되어 암 형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.⁹⁰ 따라서 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 NO의 발생을 억제시켜 주는 것이 중요하다.

본 연구에서는 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cells에서 발효 전·후 갯까치수영 추출물 및 분획물의 NO 생성억제를 평가하기 위하여 시료를 200 $\mu g/mL$ 의 농도로 LPS와 동시에 처리함에 따라 생성되는 NO의 양을 측정하였다. LPS처리군 (+)에서는 control군 (-)과 비교하여 NO의 생성량이 다량 증가하였고 이를 $100 \pm 5.62\%$ 로 설정하고 실험군과 비교하였다. 그 결과, 모든 층에서 NO 생성 저해를 나타내었다(Fig. 28). 발효 전 *n*-butanol 층이 $96.0 \pm 1.64\%$ 저해율로 가장 컸고, 발효 후 water 층이 $7.1 \pm 4.69\%$ 로 가장 작았다. 발효 전·후를 비교해 보았을 때 가장 눈에 띄는 결과는 *n*-hexane 층으로, 발효 전에는 $19.9 \pm 7.21\%$ 의 결

과를 보였으나 발효 후에는 $46.3 \pm 1.69\%$ 로 NO 생성 억제에 있어 가장 큰 132.8% 증가 폭을 보였다. *n*-hexane 층을 제외한 나머지 층은 발효 후 억제 효과가 모두 감소하였다. NO 생성 억제에 있어 *n*-hexane 층의 활성 변화는 HPLC chromatogram (Fig. 19)에서 보이는 바와 같이 생성된 peak (RT 약 39분)에 해당하는 물질에 의한 영향으로 추정되나 이는 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

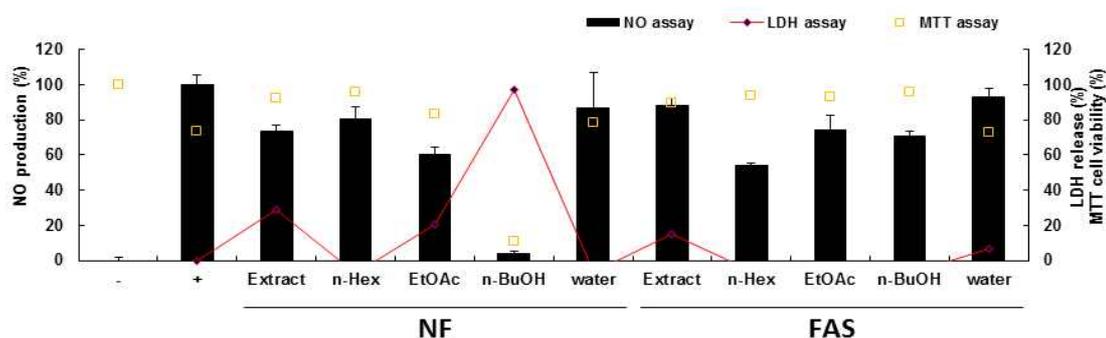


Fig. 28. NO production inhibitory activities and cytotoxicity of extract and solvent layers of *L. mauritiana* Lam. Sample concentrations : 200 $\mu\text{g/mL}$, NF : Non-fermented, FAS : Fermented with *A. sojae*.

갯까치수영 추출물 및 발효물, 분획물의 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 억제시킨 이유가 시료의 세포독성으로 인한 것인지를 평가하기 위하여 LDH 및 MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. LDH 결과 LPS 단독처리군에 비교하여 발효 전 *n*-butanol 층에서 뚜렷한 세포독성을 나타내었고, 발효 전·후의 ethyl acetate 층에서도 세포독성이 나타났다(Fig. 29). Sharifi 등은 PC-12 cell (rat pheochromocytoma)에서의 납의 독성은 납에 의한 NO의 과다생성이 세포독성을 유발함을 밝히고, 그 세포독성은 iNOS inhibitor인 L-NAME에 의해 억제됨을 밝혔다.⁹¹ 이러한 내용에 비추어 MTT 결과를 볼 때 발효 전 *n*-butanol 층의 결과는 명백한 세포 독성으로 인한 것으로 보여지며, ethyl acetate 층의 경우는 독성을 내포하고 있으나 그보다는 LPS에 의한 과량의 NO가 Raw 264.7 cells의 세포생존율을 저하시켰으며, 발효 전·후의 갯까치수영 추출물과 *n*-hexane 층, ethyl acetate 층 그리고 발효 후 *n*-butanol 층이 NO의 생성을 억제함으로써 세포생존율을 증가시킨 것으로 판단된다.

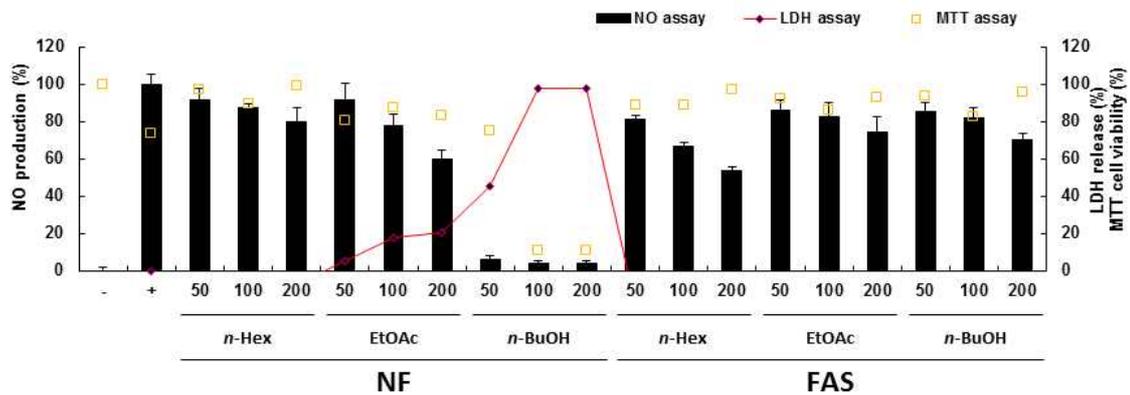


Fig. 29. NO production inhibitory activities and cytotoxicity of *n*-hexane, ethyl acetate layer and *n*-butanol layer of *L. mauritiana* Lam. by concentration. Sample concentrations : µg/mL, NF : Non-fermented, FAS : Fermented with *A. sojae*.

위의 결과를 바탕으로 본 연구에서 분리한 compounds가 있는 용매 층인 ethyl acetate 층과 *n*-butanol 층 그리고 발효 후 NO 생성 억제의 가장 큰 증가 폭을 보인 *n*-hexane 층을 50, 100 µg/mL의 농도를 추가하여 실험을 진행하였다. 그 결과 농도 의존적으로 유의적인 결과를 얻을 수 있었으며 ethyl acetate 층과 *n*-butanol 층은 발효 전에는 보였던 세포 독성이 발효 후에는 나타나지 않았다. 또한 세포독성 없는 발효 후 50, 100 µg/mL 농도에서 NO 생성량을 각각 14.06 ± 5.62 , $17.58 \pm 7.85\%$ 과 14.47 ± 4.53 , $17.93 \pm 5.33\%$ 감소시켜 약간의 항염 활성을 나타내는 것을 확인하였다. *n*-hexane 층에서도 마찬가지로 유의적인 농도 의존적인 결과를 얻었고 발효 후 50, 100 µg/mL 농도에서 18.97 ± 2.02 , $33.54 \pm 2.50\%$ 의 좋은 활성을 보였으며 발효 전 대비 각 118.7과 169.0%의 증가율을 나타내었다(Fig. 29).

3-2-2. Pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β)과 PGE₂ 생성 억제 효능 평가

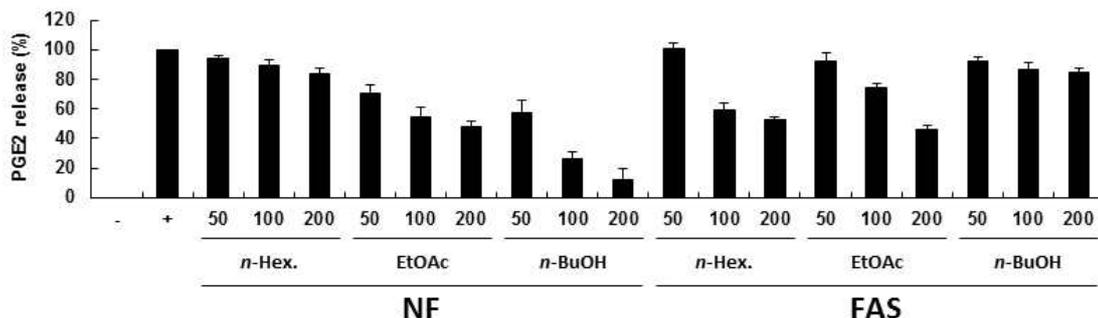


Fig. 30. Effect of *n*-hexane, ethyl acetate and *n*-butanol layers from *L. mauritiana* Lam. on LPS-induced PGE₂ production in RAW 264.7 cells by concentration. Sample concentrations : μg/mL, NF : Non-fermented, FAS : Fermented with *A. sojae*.

LPS 자극에 의해 TNF- α , IL-1 β , IL-6 같은 염증성 cytokine이 분비되면, phospholipase A2 (PLA2)가 활성화 되고 세포막의 phospholipid에서 arachidonic acid가 분비되어 cyclooxygenase (COX)에 의해 PGs가 형성된다.⁹² 발효 전·후의 *n*-hexane 층, ethyl acetate 층과 *n*-butanol 층의 PGE₂ 생성량을 측정한 결과, 대조군을 100.0±1.0%로 나타냈을 때 50 및 100, 200 μg/mL 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 30). 특히 *n*-hexane 층의 경우 50 및 100, 200 μg/mL의 농도에서 발효 전에는 94.2±1.63, 89.6±3.86, 83.6±4.34%, 발효 후에는 100.9±3.21, 59.3±4.87, 52.6±2.06%로 나타나 PGE₂의 생성 또한 발효 후 생성 감소가 증가하는 경향을 나타내었다.

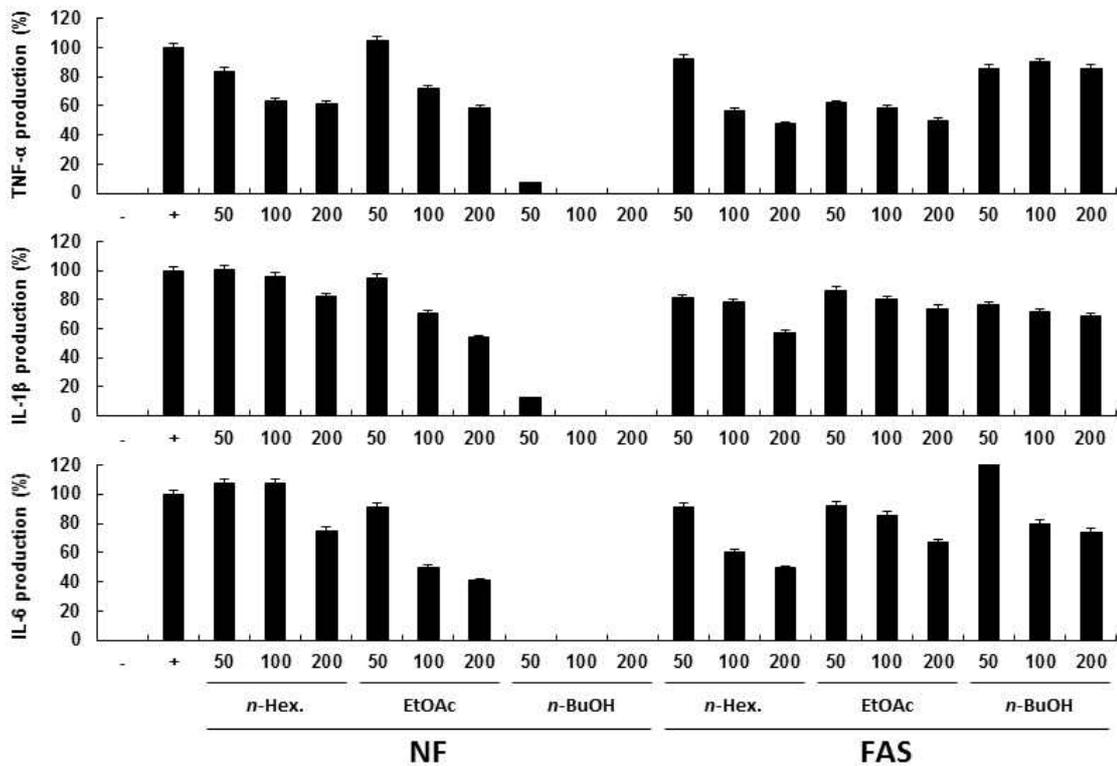


Fig. 31. Effect of *n*-hexane, ethyl acetate and *n*-butanol layers from *L. mauritiana* Lam. on LPS-induced TNF- α , IL-1 β and IL-6 production in RAW 264.7 cells by concentration. Sample concentrations : $\mu\text{g/mL}$, NF : Non-fermented, FAS : Fermented with *A. sojae*.

염증관련 cytokine 중 IL-1은 화상 등의 경우에 PG, leukotrienes, platelet-activating factor, NO 등의 매개물질합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다. 특히 IL-1 β 는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, 간 세포 등에서 분비되며, TNF- α , IL-2, IL-6와 함께 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 또한 IL-1 β 는 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙, NK cell의 activity를 활성화하고 hypothalamus에 작용하여 발열을 유도한다. 단핵구나 대식세포에서 분비되는 IL-6는 림프구를 활성화시켜 항체생산을 증가시키는 것으로, IL-6의 level은 염증성 병변에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다.⁹³ 이에 본 연구에서는 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 분비를 측정하였다. 그 결과 LPS는 Raw 264.7 cells에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 분

비를 유의하게 촉진시켰으며, 발효 전·후의 *n*-hexane 층, ethyl acetate 층과 *n*-butanol 층은 농도 의존적으로 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성량을 유의하게 감소시켰다(Fig. 31). 특히 *n*-Hex 층에서는 50 및 100, 200 μ g/mL의 농도에서 모두 유의하게 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성량을 감소시켰고, 발효 후에는 cytokines 생성량 감소가 더욱 크게 나타났다.

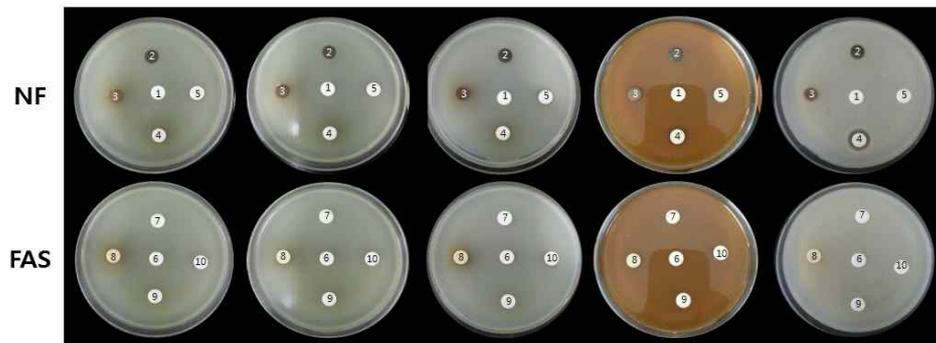
3-3. 항균 활성 실험 결과

3-3-1. Paper disc diffusion법에 의한 항균 활성 측정

*Staphylococcus epidermidis*는 여드름의 병인에 관여하며 주요 요인은 피지 과다, 모낭의 비정상적인 각화증, *P. acnes* 증식에 의한 염증 유발 등이 있다.⁹⁴ 모낭 내에 자라는 혐기성 균 *Propionibacterium acnes*는 여러 가지 소화효소를 포함하여 많은 단백질을 모낭 내에 분비하는데⁹⁵, 이 효소들은 모낭 내에서 피지를 분해하고, 다른 영양분을 흡수하며, 모낭벽의 세포를 불안하게 만들며 빠르게 성장한다. 이로 인해 세포가 손상되고 염증이 유발⁹⁶되며 모낭염, 여드름 같은 피부질환을 유발한다.^{97,98} *Candida albican*은 사람의 구강 내 병을 유발하거나 생식기에 감염되는 효모(후막포자)와 곰팡이(가성균사)로 자랄 수 있는 이배체 곰팡이다. 인구의 80%에 존재하며 유해하지 않으나 과증식하면 칸디다증을 유발하기도 한다.⁹⁹

발효 전·후의 갯까치수영 추출물 및 분획물을 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)와 *P. acnes* (CCARM 9010), *C. albican* (KCTC 7965)에 대한 항균 활성을 조사한 결과는 Table 9와 같았다. 각 시료를 5 mg/mL로 희석하여 처리한 결과 3 strain의 *S. epidermidis*에서는 발효 전·후 모든 시료가 저해환이 나타나지 않았으며 *P. acnes*는 발효 전의 *n*-butanol 층에서만 10 mm, *C. albicans*도 발효 전의 *n*-butanol 층에서만 13 mm으로 나타났다.

Table 9. Representative results of effect of extract and solvent layers from *L. mauritiana* Lam. and several antibiotics using paper disc diffusion method



		<i>S. Epidermidis</i> CCARM 3709	<i>S. Epidermidis</i> CCARM 3710	<i>S. Epidermidis</i> CCARM 3711	<i>P. Acnes</i> CCARM 9010	<i>C. Albican</i> KCTC 7965
extract*	①	—	—	—	—	—
	⑥	—	—	—	—	—
<i>n</i> -hex. layer*	②	—	—	—	—	—
	⑦	—	—	—	—	—
EtOAc layer*	③	—	—	—	—	—
	⑧	—	—	—	—	—
<i>n</i> -BuOH layer*	④	—	—	—	10 mm	13 mm
	⑨	—	—	—	—	—
water layer*	⑤	—	—	—	—	—
	⑩	—	—	—	—	—
positive control**	K	15 mm	16 mm	19 mm	13 mm	—
	T	18 mm	24 mm	8 mm	27 mm	—
	F	—	—	—	—	20 mm

— means no anti-bacterial activity at 5 mg/mL.

* Samples concentration : 5 mg/mL

** K (kanamycin) : 30 µg/mL, T (tetracycline) : 30 µg/mL, F (fluconazole) : 100 µg/mL

3-3-2. MIC 및 MBC 측정

발효 전·후의 갯까치수영 추출물 및 분획물에 대하여 각각 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 MIC와 MBC를 측정하였고 결과는 Table 10과 같았다. 발효 전의 일부 시료에서 항균 활성을 나타냈고, 최소저해농도는 발효 전 *n*-butanol 층에서 *P. acnes*에 대해 1000 $\mu\text{g/mL}$ 을, 또한 발효 전 *n*-butanol 층에서 *C. albican*에 대해 250 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 발효 후의 같은 층에서는 항균 활성이 나타나지 않았다.

Table 10. Minimum inhibitory concentration (MIC) & minimum bactericidal concentration (MBC) of extract and solvent layers from *L. mauritiana* Lam. against five disease microorganisms

		<i>S. Epidermidis</i> CCARM 3709		<i>S. Epidermidis</i> CCARM 3710		<i>S. Epidermidis</i> CCARM 3711		<i>P. Acnes</i> CCARM 9010		<i>C. Albican</i> KCTC 7965	
		MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)
extract	NF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>n</i> -hex. layer	NF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EtOAc layer	NF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>n</i> -BuOH layer	NF	-	-	-	-	-	-	1,000	2,000	250	500
	FAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
water layer	NF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
positive control	K	<15.6	31.25	62.5	125	<15.6	<15.6
	T	<15.6	31.25	.	.
	F	62.5	125

- means no anti-bacterial activity at 2 mg/mL.

IV. 요약 및 결론

천연물 소재 개발이 날로 커져가는 세계시장에서 경쟁력을 갖추기 위해서는 우리 고유의 자원과 기술을 발전시킬 필요가 있다. 본 연구에서는 제주에 자생하고 있는 염생식물 중 하나인 갯까치수영(*Lysimachia mauritiana* Lam.)의 추출물을 대상으로 최적 발효 방법을 탐색하여 적용하고 그 발효물로부터 얻은 분획물의 다양한 생리활성을 검색, 비교를 통해 활성에 영향을 주는 화합물을 분리, 동정하였다.

갯까치수영 추출물의 발효를 위해 *Aspergillus sojae*를 선정하였고, 30°C, pH 6, 3% 접종량 그리고 300 rpm의 교반 속도를 최적 조건으로 결정하였다. 발효 전과 후의 HPLC를 비교한 결과 RT 31.7분과 33.4분의 peak 크기가 증가하거나 새로 생겨남을 확인하였고 이를 분리하여 ¹H 및 ¹³C NMR로 구조를 확인한 결과 kaempferol과 quercetin으로 동정하였다. 이는 *A. sojae* 중의 당분해효소인 glucosidase가 작용하여 갯까치수영 배당체의 플라보노이드와 당사이의 글리코시드 결합을 가수분해하였음을 알 수 있었다. 또한 발효 전의 *n*-butanol 층에서 가장 많은 함량을 보인 mauritianin을 분리, 동정하였다.

발효 전·후의 추출물 및 용매 분획 층의 생리활성 비교를 위해 항산화, 항염, 항균 활성을 조사하였다. 총 폴리페놀 함량 측정결과 발효 전에는 *n*-butanol 층에서 34.0 µg GAE/mg으로 가장 높았으나, 발효 후에는 22.65 µg GAE/mg으로 낮아졌고 ethyl acetate 층에서 29.78 µg GAE/mg에서 65.02 µg GAE/mg로 크게 높아짐을 확인하였다. 총 플라보노이드 함량 측정에서도 발효 전에는 *n*-butanol 층에서 42.95 µg QUE/mg으로 가장 높았으나, 발효 후에는 28.65 µg QUE/mg으로 낮아졌고, 여기에서도 ethyl acetate 층이 24.41 µg QUE/mg에서 52.05 µg QUE/mg로 크게 높아지는 결과를 얻었다. DPPH radical 소거 활성에서는 IC₅₀ 값을 구하였고, 추출물이 445.12±0.85 µg/mL에서 121.06±0.51 µg/mL로 증가하였고, 발효 전에는 *n*-butanol 층이 63.76±0.65 µg/mL에서 발효 후에 143.78±0.41 µg/mL로 감소, ethyl acetate 층은 61.59±0.37 µg/mL에서 43.16±0.33 µg/mL로 증가함을 확인하였다. Superoxide radical 소거 활성에서 구한 IC₅₀ 값을 구하였고, 발효 전 추출물이 158.80±2.06 µg/mL에서 발효

후 $104.90 \pm 1.23 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 으로 증가하였다. *n*-butanol 층은 발효 전·후 $168.35 \pm 1.64 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 에서 $118.43 \pm 1.32 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 으로 증가하였고, ethyl acetate 층은 $83.20 \pm 0.73 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 에서 $58.99 \pm 0.73 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 으로 증가하였다. Xanthine oxidase 저해 활성에서는 ethyl acetate 층만의 결과를 얻을 수 있었고 발효 전의 IC_{50} 은 $594.18 \pm 2.68 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 에서 발효 후 $172.10 \pm 0.54 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 으로 증가하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 발효에 의한 ethyl acetate 층의 항산화 활성의 증가는 kaempferol과 quercetin 함량 증가에 의한 것으로 추정된다.

발효 전·후의 추출물 및 분획물의 항염 활성 평가를 위해 LPS와 동시에 $200 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 NO 생성량을 비교하였고 LDH와 MTT법으로 세포 독성을 평가하였다. 그 결과 발효 전 *n*-butanol 층과 ethyl acetate 층은 세포 독성을 보였으나 발효 후 세포 독성을 보이지 않았고, *n*-hexane 층에서 가장 큰 132.8%의 NO 생성 억제율의 증가 폭을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β)과 PGE₂ 생성 억제 효능 평가를 실시하였고 특히 *n*-hexane 층에서 농도 의존적으로 저해함을 확인하였다. 마지막으로, 발효 전·후의 추출물 및 용매 분획물을 paper disc diffusion법으로 항균 활성을 측정하였고 MIC와 MBC를 측정하였다. 그 결과 *P. acnes* CCARM 9010, *C. albican* KCTC 7965에 대하여 발효 전 *n*-butanol 층에서 활성을 보였으며 최소저해농도는 발효 전 *n*-butanol 층에서 *P. acnes*와 *C. albican*에 대해서 각 $1,000 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $250 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 발효 후의 같은 층에서는 활성이 관찰되지 않았다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 갯까치수영으로 천연 항산화제, 항염, 항균제의 개발 가능성이 있으며 *A. sojae*로의 발효를 통해 항산화 및 항염 활성을 증강시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

V. 참고문헌

1. Lee, E. J.; Choi, H. S. A study on the change of food service industry and pattern of dietary externalization in Korea, *KJHT*, **2005**, 29, 355-367.
2. Koo, J. W. Occupational Diseases among Office Workers, *Hanyang medical reviews*, **2010**, 30(4), 274-283.
3. 이부용. 세계의 기능성식품 개발 및 시장 현황, *식품기술*, **2002**, 15(1), 69-80.
4. 성상현; 박진호. 천연물 의약품의 현황과 전망, *보건벤처 최신 동향 및 이슈 리포트*, **2007**.
5. 손은수, 천연물유래 화장품소재의 개발 동향, *한국과학기술정보연구원 기술동향분석보고서*, **2003**, 1-46.
6. 이남호, *천연물화학*, 이은숙, 신일서적(주), 서울, **2014**, 1, 1-7.
7. Hostettmann, K.; Marston, A.; Wolfender, J. L. Strategy in the search for new biologically active plant constituents, *Proceedings-phytochemical society of Europe*, **1995**, 17.
8. Torsvik, V.; Goksoyr, J.; Daae, F. L.; Sorheim, R.; Michalsen, J; Salte, K. Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities, *Beyond the biomass*, **1994**, 39-48.
9. Zaehner, H.; Fiedler, H. P. The need for new antibiotics possible ways forward, *Symposia-society for gneral microbiology*, **1995**, 67-67.
10. Haefner, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates, *Drug Discov*, **2003**, 8, 536-544.
11. 한국보건산업진흥원, “국내외 천연물의약품 연구개발 동향”, 제2차 천연물신약연구개발촉진계획, **2006**.
12. 성상현; 박진호, 천연물의약품의 현황과 전망, *보건벤처 최신 동향 및 이슈리포트*, **2007**, 14-23.
13. Knight, V.; Sanglier, J. J.; DiTullio, D.; Braccili, S.; Bonner, P.; Waters, J.; Hughes, D.; Zhang, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery, *Appl Microbiol Biotechnol*, **2003**, 62(5-6), 446-458.
14. 임병선. 해안염생식물의 분포와 그 중요성, *환경부 개설 자연생태교육강좌*, **2002**.
15. Lee, H. J.; Kim, Y. A.; Ahn, J. W.; Lee, B. J.; Moon, S. G.; Seo, Y. W. Screening of peroxynitrite and DPPH radical scavenging activities from salt marsh plant *Korean J Biotechnol Bioeng*, **2004**, 19(1), 57-61.
16. Seo, Y. W.; Lee, H. J.; Cha, H. J.; Kim, Y. A.; Park, K. E. Screening on radical scavenging activity of salt marsh plant collected from daebudo, *Bull Mar Sci & Tech*, **2002**, 11(2), 123-128.
17. Lee, H. J.; Ahn, J. W.; Lee, B. J.; Moon, S. G., Seo, Y. W., Antioxidant activity of *Rosa rugosa*, *Korean J Biotechnol Bioeng*, **2004**, 19(1), 67-71.
18. Kim, J. B.; Choe, S. N.; Choe, K. H.; Lim, S. H.; Chai, S. J. Funtional components of holophyte; Antioxidant substances in *salicornia herbacea*

- L., *Jour Fish Mar Sci Edu*, 2007, 19(2), 197-205.
19. Park, S. H.; Kim, K. S. Isolation and identification of antioxidant flavonoids from *Salicornia herbacea* L. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2004, 47(1), 20-123.
 20. Lee, J. T.; Jeong, Y. S.; An, B. J. Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials, *Kor J Herbology*, 2002, 17(2), 51-60.
 21. 심현보; 조원범; 최병희, 한반도 해안염습지와 사구 염생식물 분포, *식물분류학회지*, 2009, 39(4), 264-276.
 22. Kim, J. S. A study on germination and growth characteristic of halophyte, *Mokpo national university*, 2013, *MS Thesis*.
 23. 강명신, 제주도 해안의 염습지 식생 연구, *제주대학교 교육대학원*, 2001, 석사학위논문.
 24. 사면이 바다, 염생식물은 제주의 경쟁력, *제주도민일보*, 2016년 11월 23일, 기획특집면.
 25. 정재혁; 김택겸; 최원영; 김선. 바다와 사랑에 빠진 식물, *RDA 인테리빙*, 2014, 제120호.
 26. Yang, E. J.; Hyun, J. M.; Lee, N. H.; Hyun, C. G. In vitro screening of Korean halophytes for cosmeceutical ingredients, *Int J Chem Tech Res*, 2016, 9, 541-547.
 27. Rajan K. N.; Rajendan A. D. Effect of fermentation parameters on extra cellular tannase production by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407, *E J Chemistry*, 2009, 6, 979.
 28. Park, Y. S.; Jang, H. G. Evaluation of physiological activity and lactic acid fermentation of rubus coreanus miq, *J Kor Soc Agric Chem Biotechnol*, 2003, 46, 367.
 29. Hubert J.; Berger M.; Nepveu F.; Paul F.; Dayde J. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ, *Food Chem*, 2008, 109, 709-721.
 30. Katina K.; Liukkonen K. H.; Kaukovirta-Norja A.; Adlercreutz H.; Heinonen S. M.; Lampi A. M. Fermentation induced changes in the nutritional value of native or germinated rye, *J Cereal Sci*, 2007, 46, 348-355.
 31. Izumi, T.; Piskula, M. K.; Osawa, S.; Obata, A.; Tobe, K.; Saito, M.; Kataoka, S.; Kubota, Y.; Kikuchi, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans, *J. Nutrition*, 2000, 130(7), 1695-1699.
 32. Chi, H.; Ji, G. E. Transformation of ginsenosides Rb1 and Re from *Panax ginseng* by food microorganisms, *Biotechnology Letters*, 2005, 27, 765-771.
 33. Quan, L. H.; Min, J. W.; Sathiyamoorthy S.; Yang, D. U.; Kim, Y. J.; Yang, D. C. Biotransformation of ginsenosides Re and Rg1 into ginsenosides Rg2 and Rh1 by recombinant glucosidase, *Biotechnol Lett*, 2012, 34, 913-917.

34. Lee, D. S.; Kim, Y. S.; Ko, C. N.; Cho, K. H.; Bae, H. S.; Lee, K. S.; Kim, J. J.; Park, E. K.; Kim, D. H. Fecal metabolic activities of herbal components to bioactive compounds, *Arch Pharm Res*, **2002**, 25(2), 165-169.
35. Rye, C. S.; Withers, S. G. Glycosidase mechanisms, *Curr Opin Chem Biol*, **2000**, 4, 573-580.
36. 지나; 송가락; 길정하; 박건영. HaCaT 피부각질세포에서 들깨잎 추출물의 산화적 스트레스에 대한 항산화 효과, *한국식품영양과학회지*, **2013**, 42, 161-167.
37. Ozer Arican; Ergul Belge Kurutas; Sezai Sasmaz. Oxidative Stress in Patients With Acne Vulgaris, *Mediators of Inflammation*, **2005**, 6, 380-384.
38. Kozina L. S.; Borzova I. V.; Arutiunov V. A.; Ryzhak G. A. Role of oxidative stress in skin aging, *Advances in Gerontology*, **2013**, 3, 18-22.
39. Lin, Y. L.; Lin, J. K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB, *Mol Pharmacol*, **1997**, 52(3), 465-472.
40. Tsai, S. H.; Lin-Shiau, S. Y.; Lin, J. K. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol, *Br J Pharmacol*, **1999**, 126(3), 673-680.
41. Liang, Y. C.; Huang, Y. T.; Tsai, S. H.; Lin-Shiau, S. Y.; Chen, C. F.; Lin, J. K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages, *Carcinogenesis*, **1999**, 20(10), 1945-1952.
42. Ken Yasukawa; Michio Takido. A flavonol glycoside from *Lysimachia mauritiana*, *Phytochemistry*, **1987**, 26(4), 1224-1226.
43. 식품의약품안전처, *식품의 기준 및 규격 전부개정고시*, 식약처고시제 2016-154호, 별표1. **2016**.
44. 안영희; 이택주. *차생식물 대백과*, 류도형, 생명의나무, 서울, **2002**, 181
45. Willey, J. M.; Sherwood, L. M.; Woolverton, C. J. *Prescott's Microbiology 7/e*, Mc Graw Hill, New York, **2008**, Ch.5.
46. Czitrom; Veronica. One Factor at a Time versus Designed Experiments, *The American Statistician*, **1999**, 53(2), 126-131.
47. Luchsinger, W. W.; Cornesky, R. A. Reducing power by the dinitrosalicylic acid method, *Anal. Biochem.*, **1962**, 4, 346-347.
48. National academy of agricultural science, RDA. Tables of food functional composition first edition, *Munyoungdang*, Suwon, **2009**, 1-349.
49. Ra, K. S.; Suh, H. J.; Chung, S. H.; Son, J. Y. Antioxidant activity of solvent extract from onion skin, *J Food Sci Technol*, **1997**, 29, 595-600.
50. Folin, O.; Denis, W. A colorimetric method for determination of phenols(phenol derivatives) in urine, *J Biol Chem*, **1915**, 22, 305-308.
51. Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. Content of potentially

- anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands, *J Agric Food Chem*, **1992**, 40, 2379–2383.
52. Kandaswami, C.; Middleton, E. Jr. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids, in Free radicals in diagnostic medicine, *Springer*, **1994**, 15, 351–376.
 53. Rice–Evans, C. A.; Miller, H. J.; Bolwell, O. G.; Bramley, P. M.; Pridham, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoid, *Free radical Res.* **1995**, 22, 375–383.
 54. Marinova D.; Ribarova F.; Atanassova M. Total phenolic and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables, *JUCTM*, **2005**, 40, 255–260.
 55. Mendoza Pérez; Fregoso Aguilar. Chemistry of natural anti-oxidants and studies performed with different plants collected in Mexico, *InTech*, **2013**, 3, 59.
 56. Blois, M. S., Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **1958**, 181, 1199–1200.
 57. McCord J. M.; Fridovich I. Superoxide dismutase : an enzymic function for erythrocyte hemocuprein, *J Biol Chem*, **1969**, 244(60) 49–55.
 58. An, B. J.; Park, J. M.; Bae, H. J.; Pyun, J. R.; Song, M. A. Antioxidant and antibacterial effects of korean *Isodon japonicus* H. *J Kor Soc Appl Bi*, **2006**, 49, 129–134.
 59. Lee, Y. S.; Kim, K. K.; Kim, N. W. The physiological activities of bark extract of *Albizia julibrissin*, *Kor J Food Preserv.* **2011**, 18, 79–86.
 60. Seo, S. J.; Kim, N. W. Physiological activities of leaf and root extracts from *Liriope platyphylla*. *Kor J Food Preserv.* **2010**, 17, 123–130.
 61. Jee, S. O. Antioxidant activities and whitening effect of the mulberry (*Morus alba* L.) root bark extracts. *Kor J Plant Res.* **2009**, 22, 145–151.
 62. Lee, S. W. The Efficacy and Safety of Febuxostat in Korean Patients with Gout, *J Rheum Dis.* **2013**, 20, 277–279.
 63. Wang, M.; Li, J.; Rangarajan, M.; Shao, Y.; J. E. L.; Huang, T. C.; Ho, C. T. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*), *Food Chemistry*, **2001**, 75, 197–202.
 64. Lee Y. S.; Kim H. S.; Kim S. K.; Kim S. D. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*, *J Microbiol Biotechnol*, **2000**, 10, 8–15.
 65. Higuchi M.; Higashi N.; Taki H.; Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages, *J Immunol*, **1990**, 144, 1425–1431.
 66. Grösch S.; Maier T. J.; Schiffmann S.; Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors, *J Natl Cancer Inst*, **2006**, 98(11), 736–747.
 67. Hayes, A. J.; Markovic, B. Toxicity of Australian essential oil

- Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity, *Food Chem Toxicol*, **2002**, 40(4), 535-543.
68. Kim, D. K.; Kwak, H. H. A Furan Derivative from *Cornus officinalis*, *Arch Pharm Res*, **1998**, 21(6), 787-789.
 69. 김주선; 강삼식; 이명환; 김옥경. 땃두릅으로부터 Flavonoid 성분의 분리, *생약학회지*, **1995**, 26(3), 239-243.
 70. 황완균; 정혜진; 고성권; 이무택; 김일혁. Flavonoids from the stem of *Rhamnus taquetii*, *Pharmcal Research*, **1996**, 40, 394-399.
 71. 김기현; 김명녀. 홍화의 후라보노이드 성분, *약학회지*, **1992**, 36(6), 556-562.
 72. 이근하; 조영룡; 주철규; 주연정; 권순상; 박청. 양마에서 분리한 Kaempferol 및 그 배당체의 항염증 효과에 관한 연구, *한국약용작물학회지*, **2011**, 19(6), 426-434.
 73. 박종철; 양한석; 최재수. 한국산 꾸지 뽕나무의 성분, *약학회지*, **1992**, 36(1), 40-45.
 74. Kim, J. Y.; Park, S. N. Anti-oxidative activities of *Castanea crenata* leaf extract/fractions and application on cosmetics, *The Society of cosmetic scientist of Korea*, **2008**, 34, 259-268.
 75. Griffiths, K.; Morton, M. S.; Denis, L. Certain aspects of molecular endocrinology that relate to the influence of dietary factors on the pathogenesis of prostate cancer, *Eur Urol*, **1999**, 35, 443-455.
 76. 윤인; 위지향; 문제학; 안태희; 박근형. 복분자 열매에서 항산화활성을 지닌 quercetin의 분리 및 동정, *한국식품과학회지*, **2003**, 35(2), 499-502.
 77. 김미애; 정태영. 진달래꽃으로부터 분리된 플라보노이드 화합물의 항산화성에 관한 연구, *농화학회지*, **1996**, 39(4), 320-326.
 78. Lee, J. M.; Lee, K. H.; Yoon, Y. H.; Cho, E. J.; Lee, S. H. Identification of Triterpenoids and Flavonoids from the Seeds of Tartary Buckwheat, *Natural Product Sciences*, **2013**, 19(2), 137-144.
 79. 남정환; 조인숙; 김수정; 남춘우; 서종택; 유동림; 김원배; 유승열; 이응호; 김민영; 유명민; 박희준; 정현주. 곧은 나무이끼의 식물 화학적 성분연구, *농화학회지*, **2008**, 51(2), 136-141.
 80. 배종진; 곽종환. 노각나무 가지의 phenol 성분, *생약학회지*, **2015**, 46(4), 303-308.
 81. Hyon, J. S.; Kang, S. M.; Senevirathne M.; Koh, W. J.; Yang, T. S.; Oh, M. C.; Oh, C. K.; Jeon, Y. J.; Kim, S. H. Antioxidative activities of extracts from dried *Citrus sunki* and *C. unshiu* Peels, *J Kor Soc Food Sci Nutr*, **2010**, 39, 1-7.
 82. Andlauer W.; Stumpf C.; Frst P. Influence of the acetification process on phenolic compounds, *J Agr Food Chem*, **2000**, 48, 3533-3536.
 83. Su, M. S.; Silva J. L. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) by-products as affected by fermentation, *Food Chem*, **2006**, 97, 447-451.
 84. Lee, S. Y.; Yoo, K. M.; Moon, B. K.; Hwang, I. K. A study on the development of vinegar veberage using yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*) and analysis of components changes during the

- fermentation, *Kor J Food Cook Sci*, **2010**, 26, 95–103.
85. Cha, J. Y.; Ahn, H. Y.; Eom, K. E.; Park, B. K.; Jun, B. S.; Cho, Y. S. Antioxidative activity of *Aralia elata* shoot and leaf extracts, *J Life Sci*, **2009**, 19, 652–658.
 86. Jeon, Y. H.; Kim, M. H.; Kim, M. R. Antioxidative and antimutagenic activity of ethanol extracts from *Cuscutae semen*, *Kor J Food Cookery Sci*, **2008**, 24, 46–51.
 87. Kim, E. Y.; Baik, I. H.; Kim, J. H.; Kim, S. R.; Rhyu, M. R. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants, *Kor J Food Sci Technol*, **2004**, 36, 333–338.
 88. Lee, K. D.; Chang, H. K.; Kim, H. K. Antioxidative and nitrite scavenging activities of edible mushroom, *Kor J Food Sci Technol*, **1997**, 29, 432–436.
 89. Lee, S. O.; Lee, H. J.; Yu, M. H.; Im, H. G.; Lee, I. S. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island, *Kor J Food Sci Technol* **2005**, 37, 233–240.
 90. 김룡규; 신경민; 천상국; 지사영; 서성훈; 박희준; 최종원; 이경태. 넙취 정유의 murine macrophage Raw 264.7 세포에서의 in vitro 항암효과, *약학회지*, **2002**, 46(5), 343–349.
 91. Sharifi A. M.; Mousavi S. H.; Bakhshayesh M.; Tehrani F. K.; Mahmoudian M.; Oryan S. Study of correlation between lead-induced cytotoxicity and nitric oxide production in PC12 cells, *Toxicol Lett*, **2005**, 160, 43–48.
 92. 정향숙; 권민철; 한재건; 하지혜; 김령; 김진철; 곽형근; 황보영; 이현용. 불가사리 유래 콜라겐 펩타이드의 피부 면역 증진 효과, *한국식품과학회지*, **2008**, 40, 522–527.
 93. Delgado A. V.; McManus A. T.; Chambers J. P. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P, *Neuropeptides*, **2003**, 37(6), 355–361.
 94. Burton J. L.; Shuster S. The relationship between seborrhea and acne vulgaris, *Br J Dermatol*, **1971**, 84, 600–604.
 95. Holland C.; Mak T. N.; Zimny-Arndt U.; Schmid M.; Meyer T. F.; Jungblut P. R.; Brüggemann H. Proteomic identification of secreted proteins of *Propionibacterium acnes*, *BMC microbiol*, **2010**, 10(1), 230.
 96. Kim J. Review of the innate immune response in acne vulgaris: activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses, *Dermatol*, **2004**, 211(3), 193–198.
 97. Zouboulis C. C. Acne and sebaceous gland function, *Clin dermatol*, **2004**, 22(5), 360–366.
 98. Kang S. M.; Oh H. J.; Lee H. C.; Oh J. S. Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting the proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*, *J Bacteriol Virol*, **2009**, 39(1), 11–19.
 99. Ryan K. J.; Ray C. G., *Sherris Medical Microbiology* 4th ed., Mc Graw Hill, New York, **2004**, 635–636.