

## 당 첨가 민들레(*Taraxacum officinale*) 발효물의 생리활성

김경민 · 김영남<sup>1</sup> · 최병곤<sup>1</sup> · 오덕환\*

강원대학교 식품생명공학과, <sup>1</sup>강원도농업기술원 농산물이용시험

### Biological Activity of Dandelion (*Taraxacum officinale*) extracts Fermented with Raw Sugar

Kyung-Min Kim, Young-Nam Kim<sup>1</sup>, Byoung-Kon Choi<sup>1</sup>, and Deog-Hwan Oh\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

<sup>1</sup>Agriproduct Processing Experiment Station, Gangwon-do Agricultural Research & Experiment Services

**Abstract** Dandelions were fermented for 120 days at 15-20°C in batches containing thirty and fifty percent raw sugar (FD30 and FD50). The total phenolic concentration of FD30 and FD50 were about 78.9±2.17 and 59.35±2.56 mg/g, respectively, both being higher than the 54.2±1.49 mg/g determined for DWE (dandelion water extract). The DPPH radical scavenging activity of FD30 and FD50 showed IC<sub>50</sub> values of 118.7±2.03 and 123.40±2.15 µg/mL, respectively, and FD30 displayed the highest antioxidant activity. 2 mg/mL of FD30 and FD50 showed 8.8±1.72 and 11.8±2.87 µM production of NO, respectively, compared with 4.9±1.20 µM of the dandelion extract. The protease, α-amylase, and lipase activity of FD50 was the highest. The fibrinolytic activity of FD30 and FD50 were 0.56±0.28 and 1.39±0.20 unit/mg protein, respectively, which was substantially higher than the 0.28 unit/mg protein of DWE. In conclusion, the dandelions fermented by sugar showed improved antioxidant, anti-inflammatory and enzymatic activities.

**Keywords:** *Taraxacum officinale*, fermentation, antioxidant, anti-inflammatory, enzymatic activities

## 서 론

최근 생명과학 및 의학의 발달로 인하여 인간의 평균 수명이 증가하는 추세이고, 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 건강의 유지와 치료를 위한 약물 이외에도 일반적으로 섭취할 수 있는 물질에서 생리활성효과에 대한 연구가 광범위하게 진행되고 있으며, 이를 이용한 기능성 식품이나 보조 의약품으로 개발이 세계적으로 활발하게 진행되고 있다(1).

국화과(*Compositae*)는 현화식물 중 세계에서 가장 넓게 분포하고 쌍자엽 식물 중에서 가장 진화된 식물분류군이며, 우리나라에는 약 300여종이 존재하는 것으로 알려져 있다(2). 그중 민들레는 민간요법 및 한방에서 포공영으로 불리며 건위, 신진대사촉진, 강장, 이뇨, 위궤양, 황달, 식욕증진, 최유제, 천식 등에 효과가 있는 것으로 알려져 식·약용으로 활용되고 있으며(3), 서양에서도 담즙분비촉진, 항류마티스 그리고 이뇨작용으로 오랫동안 약제로 사용되고 있다(4). 이러한 민들레의 약리활성효과 및 건강증진효과의 우수성이 새롭게 부각되면서 그 수요가 급증하고 있으며, 시장성이 이미 확보되어 있어 다양한 웰빙 건강식품의 개발과 산업화에 적합한 소재로 활용한 가치가 높을 것이다. 민

들레는 간보호 건강식품 등 다양한 용도의 제품들로 출시되고 있으나, 국내에서는 2000년대에 들어서야 민들레를 상품화하기 시작하였으며 제품의 유형도 파우치형태의 민들레추출물이 주를 이루고 그 외 민들레차, 민들레 녹즙, 민들레 환, 민들레 김치, 민들레 국수 등 제한적으로 이용되고 있는 실정이다(5).

선행연구(6)에서 발효시기별 민들레 발효액의 화학적, 미생물학적 특성 변화를 관찰하고 최종 발효물의 유리당, 유기산, 아미노산 함량 등의 성분분석을 하였다. 본 연구는 민들레를 주원료로 발효시킨 효소식품의 개발에 목적이 있으며, 민들레 발효액의 항산화 효과와 항염 활성에 대한 생리활성 효과 및 혈전용해, 탄수화물 분해, 단백질 분해 및 지질 분해 활성을 포함하는 효소활성에 대한 과학적 분석 자료를 마련하고 소비자의 웰빙 수요를 충족하면서도 가공에 의해 기준에 가진 생리활성능이 소실되지 않도록 다양한 고부가가치 바이오식품, 기능성 천연식품소재 및 첨가물 개발을 위해 본 연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 민들레 원료

본 실험에 사용된 민들레(dandelion: *Taraxacum officinale* Wiggers)는 강원도 양구 동면에서 4-5월 중에 채취한 것을 제공받아 사용하였다. 재료는 생 민들레로 선별 후 물로 세척한 다음 탈수하여 사용하였다.

### 민들레 추출물 제조

민들레 추출물은 자외선 열풍건조기로 건조(60°C)하여 roller crusher로 분쇄한 후 사용되었다. 건조 시료중량 대비 20배의 3차

\*Corresponding author: Deog-Hwan Oh, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Korea  
Tel: 82-33-250-6457  
Fax: 82-33-241-0508  
E-mail: deoghwa@kangwon.ac.kr  
Received June 4, 2012; revised July 9, 2012;  
accepted July 18, 2012

증류수를 가하여 추출용기에 넣고 상온(25°C)의 수욕조(ONE10, Memmert, Germany)상에서 12시간씩 3회 반복 추출하였으며 추출물은 회전 감압 농축기(N-21NS, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축한 후 Flask 내의 농축 건조물에 증류수 50 mL를 첨가하여 용해시킨 후, 동결 건조하여 -20°C의 냉동고에서 보관하였다.

### 민들레 발효물 제조

민들레 발효는 흑설탕(raw sugar)을 생 민들레(6 kg)의 총 중량대비 30% 및 50%로 첨가하였고 과채류의 최적 발효온도인 20°C에서(7) 30일간 고상으로 저온발효 하였다. 선행연구를 통해 30%이하의 농도에서 발효 초기 곰팡이 등 유해미생물이 생겨 부패가 진행되었고 50% 이상에서는 발효기간이 느리다는 결과를 토대로 진행하였다. 이후 거름망으로 걸러낸 상층액을 15 일에서 90일간 숙성시켰으며, 분석을 위한 시료는 최종 발효 단계인 120일에 채취하였다. 이때 발효물의 수율은 30% 당 첨가구의 경우 49%, 50% 당 첨가구의 경우 60%였으며 발효물은 동결 건조하여 -20°C의 냉동고에서 보관하면서 분석에 사용하였다.

### 당 첨가 민들레 발효물의 생리활성 평가

#### 총 페놀성 화합물 함량

총 페놀성 물질(total phenolic compounds)함량은 Folin-Denis방법에 따라 분석하였다. 시료를 1.0 µg/mL 농도로 준비 한 후, 75 mL의 증류수를 넣은 100 mL의 메스플라스크에 1 mL씩 넣고 잘 혼합하여 Folin-Denis시액 5 mL와 탄산나트륨(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 포화용액 10 mL를 차례로 넣은 다음 증류수로 100 mL 용량으로 채웠다. 이 반응용액을 균일하게 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 후, UV-visible spectrophotometer(DU 730, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)로 760 nm에서 흡광도를 측정하였으며, tannic acid를 표준물질로 하여 표준검량곡선을 작성하여 시료 중의 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

### DPPH radical 소거능 측정

DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical에 대한 소거활성은 Blois 등(8)의 방법을 변형하여 실험하였다. 시료 2 mL와 0.1 mM DPPH 2 mL씩을 vortex로 균일하게 혼합한 다음, 실온에서 30분간 방치한 후, UV-visible spectrophotometer(DU 730, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차로 구했고 검체를 포함하지 않은 대조군에 대한 50% 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 농도로서 IC<sub>50</sub>(µg/mL)으로 표시하였으며, 각 시료를 3회 반복 실시하여 평균하여 나타내었다. 검체의 항산화효과는 항산화제로 사용되고 있는 ascorbic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)의 측정값을 대조군으로 하여 비교하였다.

### 세포주 배양

본 실험에 이용된 RAW264.7 세포는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin(100 IU-100 µg/mL)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에 접종하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Incubator에서 배양하였다. 각각의 세포들은 2일간 배양한 후 배지를 제거하고 PBS(pH 7.4)로 세척한 뒤 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 부착된 세포를 분리시켜 원심분리하고, 상등액을 제거 후 모아진 세포에 새로운 배지를 넣어 1×10<sup>5</sup> cells/mL로 접종 후 계대 배양 하였다.

### Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 평가

NO 소거활성은 한국세포주은행에서 분양받은 마우스의 대식세포 세포주인 RAW 264.7세포를 지시세포로 이용하여 측정하였다. 세포는 10%의 FBS가 함유된 DMEM 배지에서 계대 배양하였다. NO 소거활성을 측정하기 위하여 세포를 96 well plate에서 각 well당 10<sup>5</sup> cells을 분주한 후, 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 그리고 시료농도는 0.2, 2 µg/mL로 처리하였고 10 µg/mL의 LPS(lipopolysaccharide) 20 µL를 세포배양 well에 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 시료에 대한 대조군은 10 µg/mL의 LPS만을 20 µL처리하여 활성화된 세포를 사용하였다. 배양 후 상등액 100 µL를 회수하고 여기에 동량의 2-naphthylamine이 포함된 Griess solution(Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)을 첨가하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 상등액의 발색도를 microplate reader(ASYS UVM 340, Biochrom Asys, Slazburg, Austria)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포가 생산한 NO는 sodium nitrate를 사용하여 표준곡선을 작성한 후 NO함량을 정량하였다.

### 세포독성 평가

RAW 264.7 세포에 대한 시료의 세포독성을 평가하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay를 수행하였다(9). 96 well plate의 각 well에 세포 부유액 0.1 mL (10<sup>5</sup> cells/well)을 접종하여 37°C의 CO<sub>2</sub>배양기에서 24시간 배양하였다. 샘플의 농도를 0.2, 2 µg/mL로 하여 첨가한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 PBS(pH 7.4)에 5 µg/mL의 농도로 녹인 MTT 용액 10 µL에 배지 90 µL를 더하여 각 well에 넣어 주고, 빛을 차단하고 3시간 반응 후 상등액을 제거하고 PBS로 세척한 후 DMSO를 100 µL씩 넣고 10분 동안 실온에서 방치한 후 microplate reader(ASYS UVM 340, Biochrom Asys, Slazburg, Austria)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하여 세포독성을 측정하였다.

### 효소 활성도의 측정

#### α-Amylase 활성 측정

α-Amylase 효소의 활성은 1% 전분 용액 2 mL에 0.02 M 인산 완충액(pH 6.9) 1 mL를 넣어 기질로 사용하였고 시료는 50 µg/mL 농도로 조제한 다음 0.1 mL를 첨가하여 35°C에서 30분간 반응시킨 후 1 M 초산 10 mL로 반응을 정지시키고 요오드 용액 10 mL를 넣어 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조구는 α-amylase(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)을 농도별로 조제하여 사용하였다.

#### Protease 활성 측정

Protease 활성은 시료를 50 µg/mL 농도로 조제한 다음 1.0 mL에 50 mM NaOH-borate 완충용액(pH 10.0)에 용해한 0.6% casein 5 mL를 첨가하여 35°C에서 10분간 반응시킨 후, 0.4 M TCA(trichloroacetic acid)용액을 5 mL 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 37°C에서 20분간 방치시킨 후 여과하여 사용하였다. 반응산물의 양은 Hull의 방법(10)을 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Lipase 활성 측정

기질인 olive oil은 10%(w/v)의 농도로, 유화제인 AOT(dioctyl sodium sulfosuccinate)의 농도는 50 mM이 되게 20 mL isoctane에 각각 용해시킨 후, 이 용액에 효소용액 0.18 mL를 넣고 vortex

mixer로 50초간 격렬히 교반시켜 직경이 1-2 nm이면서 투명한 역미셀계(reversed micelles) 효소 반응액을 조제하여 35°C로 일정하게 유지하면서 효소-기질반응을 시작하였다. 효소반응 시작 후 일정 반응시간 간격으로 효소 반응액 0.4 mL를 취한 후, 5%(w/v) cupric acetate-pyridine 용액(pH 6.1) 1.0 mL 및 benzene 4.6 mL를 첨가하고 교반시킨 후, 여과하여 715 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**혈전용해 활성 측정**

혈전용해 효소활성의 측정은 fibrin plate법(11)을 약간 변형하여 혈전용해 효소인 plasmin을 표준시료로 하여 측정하였다. 즉 0.01 M phosphate buffered saline(pH 7.25)에 fibrinogen을 0.3%가 되도록 용해시킨 후, 그 용액 5 mL에 0.1 mL의 100 NIH units/mL의 thrombin 용액을 첨가하여 잘 혼합한 다음, 동일한 완충용액으로 만든 1.2% agarose 용액을 5 mL 첨가하여 다시 잘 혼합하고 petridish에 부어 상온에서 30분간 방치하여 fibrin clot을 형성시켜 fibrin-agarose plate를 제조하였다. 그리고 나서 구멍을 뚫어 20 µL의 각각의 시료를 떨어뜨린 후 37°C에서 24시간 반응시키고 난 다음 형성된 투명 환의 면적을 측정하였으며 이때 대조구는 plasmin(Sigma-Aldrich)을 농도별로 조제하여 사용하였다. 혈전용해능은 plasmin의 농도별 fibrin 용해면적을 기준으로 작성한 표준곡선에 대하여 sample의 fibrin 용해면적의 상대적 비율로서 계산하였다.

**통계처리**

본 실험에서 얻어진 결과는 SPSS(statistical package for social sciences, version 12.0, SPSS Inc, Chicago, KO, USA)를 이용하여 평균치와 표준오차를 산출하였으며, one-way ANOVA test 및 Duncan's multiple range test로 유의성을  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**당 첨가 민들레 발효물의 생리활성 평가**

**총 페놀성 화합물 함량**

민들레 일반 추출물(DWE; Dandelion water extract)과 발효물의 총 폴리페놀 함량을 측정하여 Table 1에 비교하여 나타내었다. 민들레 발효물의 총 페놀성 화합물 함량은 30% 당을 첨가하여 발효시킨 민들레 발효물(FD30; Fermented dandelion with 30% raw sugar)과 50% 당을 첨가하여 발효시킨 민들레 발효물(FD50; Fermented dandelion with 50% raw sugar)이 각각 78.90±2.17 mg/g 및 59.35±2.56 mg/g으로 DWE 54.20± 1.49 mg/g보다 45.47, 9.50% 상승한 것으로 나타났다. 이는 민들레의 총 폴리페놀 함량이 유산균의 발효로 증가한 것으로 보이고(12) 이를 통해 유산균을 이용한 발효가 민들레 조직에 화학적인 영향을 주어 생리활성 성분이 늘어난 것으로 사료된다. 이는 Rodnguez(13)와 Rowaida(14)의 유산균 발효에 의한 식품의 성분변화로 총 페놀성 화합물이 증가되었다는 보고와 유사한 결과를 지닌다. FD50 보다 FD30의 총 페놀성 화합물 함량이 높은 것은 FD30이 FD50보다 발효가 활발히 진행되어(6) 더 많은 페놀성화합물이 생성되어 졌다고 판단된다. 한편 Yu(15)는 흰민들레 추출물의 총 페놀성 화합물 결과에서 열수 추출물이 34.36 µg/g, Min과 Lee(16)는 약용식물의 페놀성 화합물 결과 독활이 37.92 µg/g, 황정이 6.85 µg/g이라고 한 점을 감안했을 때 민들레 추출물, 그리고 발효를 통한 민들레 추출물의 미생물 대사를 통한 유용 생리활성물질의 증가 또는 생성을 기대할 수 있다.

**Table 1. Total phenolic contents in non-fermented and fermented dandelion extracts\***

Samples	Total phenolic contents (mg/g)
DWE <sup>1)</sup>	54.20±1.49 <sup>c</sup>
FD30 <sup>2)</sup>	78.90±2.17 <sup>a</sup>
FD50 <sup>3)</sup>	59.35±2.56 <sup>b</sup>

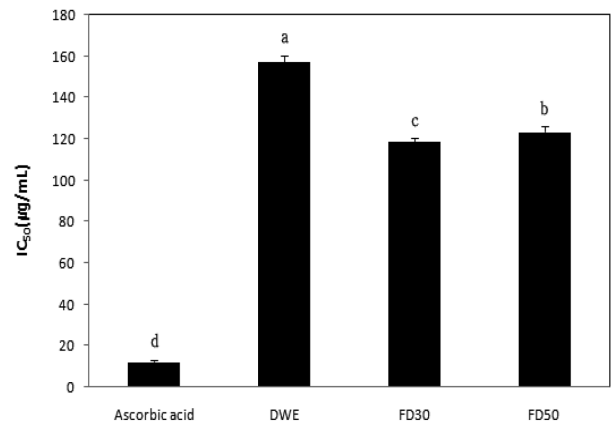
<sup>1)</sup>dandelion water extracts

<sup>2)</sup>fermented dandelion with 30% raw sugar

<sup>3)</sup>fermented dandelion with 50% raw sugar

\*Dandelion mixed with sugar was fermented first for 30 days at 20 and then aged for 60 days at 15.

Values represent the mean±SD (n=3). Values with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).



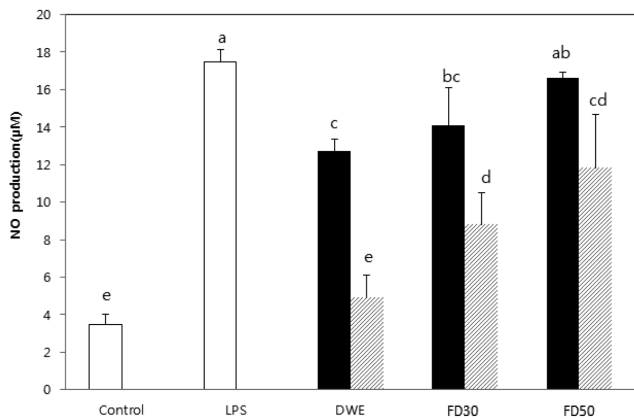
**Fig. 1. Free radical scavenging activity of the dandelion water extracts and fermented dandelion extracts.** DWE: dandelion water extracts, FD30: fermented dandelion with 30% raw sugar, FD50: fermented dandelion with 50% raw sugar, IC<sub>50</sub>: amount required for 50% inhibition. Values represent the mean±SD (n=3). Values with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

**DPPH radical 소거능 측정**

민들레 추출물과 민들레 발효물로 DPPH radical 소거능을 실험한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. IC<sub>50</sub>으로 나타낸 소거활성이 FD30와 FD50에서 118.7±2.03 µg/mL, 123.40±2.15 µg/mL으로 물 추출물의 157.31±3.15 µg/mL 보다 높고 FD30이 FD50보다 높은 활성을 갖는 것으로 분석되었다(Fig. 1). 대조구로 사용된 L-ascorbic acid의 12.23±1.02 µg/mL 보다 다소 낮은 활성을 보였으나, 실험에 사용된 민들레 발효물은 정제되지 않고 당을 첨가하여 가공한 발효물임을 감안한다면 대조구인 L-ascorbic acid와 비교하여 볼 때 비교적 우수한 소거활성을 갖는 것으로 보인다. 이는 DPPH radical 소거능을 보이는 물질 중 폴리페놀 성분과 같은 hydroxyl group을 포함하는 화합물이 DPPH radical과 최적으로 반응한다는 연구 결과(17)와 DPPH radical이 항산화물질과 반응하여 환원됨을 항산화 지표로 본다는 연구결과(8)로 보았을 때, 민들레 추출물보다 민들레 발효물이 발효과정 중에 함량이 증가된 페놀성 화합물과 같은 항산화성 물질들이 DPPH radical과 반응하여 소거시킨 것으로 판단된다.

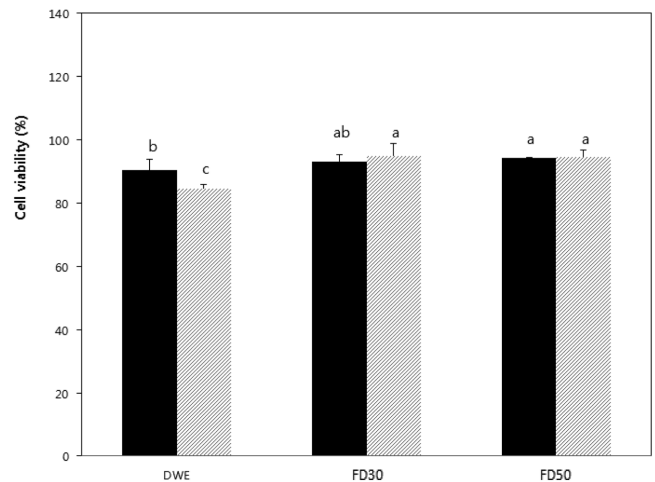
**RAW 264.7 세포 주를 이용한 민들레 발효물의 항염증 효과**

민들레 발효물과 대조구로 사용될 민들레 추출물을 LPS 처리 후에 NO(nitric oxide)의 생성 억제 효과와 macrophage에 대한 세포독성을 평가하였다. 대식세포(macrophage; RAW 264.7)에 실험



**Fig. 2. Effect of dandelion water extracts and fermented dandelion extracts on the production of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Control: Water, LPS: lipopolysaccharide DWE: dandelion water extracts, FD30: fermented dandelion with 30% raw sugar, FD50: fermented dandelion with 50% raw sugar, ■: 0.2 mg/mL, ▨: 2 mg/mL. Values represent the mean±SD ( $n=3$ ). Values with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ ).

에 사용될 민들레 시료를 처리 후 10 µg/mL의 LPS를 처리한 후에 NO 생성량을 비교함으로써 항염증효과를 나타내었다(Fig. 2). 농도가 0.2 µg/mL일 때 FD30은 14.1±2.01 µM, FD50은 16.6±0.32 µM, DWE는 12.7±0.66 µM로 대조군 17.5±0.63 µM과 비교하였을 때 염증에 대한 억제효과는 미흡한 것으로 판단되었으나 더 높은 농도인 2 µg/mL 농도처리군에서는 FD30은 8.8±1.72, FD50은 11.8±2.87 µM, DWE는 4.9±1.20 µM로 NO 소거에 효능이 있는 것으로 분석되었다. 즉, DWE는 71.9%, FD30과 FD50은 각각 50%, 32.38%으로 NO를 소거하며 발효물보다는 추출물이 NO 소거율이 더 높은 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과는 비타민나무 부위별 추출물 1 µg/mL 처리시 NO 생성량 50% 억제를 보인다는 결과(18)를 참고하면, 민들레 물 추출물과 민들레를 발효한 FD30 및 FD50 모두에서 항염활성 가능성이 있다고 판단된다. Cheon 등(19)은 RAW 264.7세포에서 lipopolysaccharide로 유발시킨 염증반응에 대한 *Bulnesia sarmienti* 열수 추출물의 억제 효과에 관한 연구에서 BS 추출물 50 µg/mL의 농도로 처리한 군에서는 LPS로 증가된 NO의 생성량이 대조군에 비하여 차이가 없었으나, 100 µg/mL 이상의 농도처리군에서는 농도 의존적으로 nitrite의 생성량이 감소되었고, 200 µg/mL 농도 처리군에서 통계학적으로 유의한 감소가 관찰되었다고 보고하였다. 한편 이러한 결과가 처리한 sample의 세포독성에 의해 세포 사멸에 따른 NO 생성량의 감소로 나타나는 것인지를 확인하기 위해 MTT assay를 통하여 화합물에 대한 세포독성을 평가하였다. 민들레 물 추출물은 2 µg/mL 농도에서 15.5%, 0.2 µg/mL에서는 9.7% 세포독성을 보여 농도가 증가함에 따라 생존율이 감소하는 경향을 보였으나 그 차이가 적어 RAW 264.7 세포에 독성이 없다고 판단되었다. 발효물인 FD30, FD50은 농도에 상관없이 90% 이상의 생존율을 보여 RAW 264.7 세포에 대한 안정성을 유지함을 나타냈다(Fig. 3). Ha 등(12)은 최고농도인 1.0 µg/mL에서 매자나무 추출물이 20.52%의 세포독성을 나타낸 반면, 유산균으로 발효시킨 추출물은 15.96%의 세포독성을 나타내 발효물의 독성이 4.6% 낮아졌다고 보고했다. 이러한 결과를 통해 발효에 관여한 미생물이 세포독성을 유발하는 성분을 분해 및 파괴함으로써 세포독성을 저감시키는데 기여한다고 판단된다.



**Fig. 3. Cytotoxicity of dandelion water extracts and fermented dandelion extracts in RAW264.7 cells.** DWE: dandelion water extracts, FD30: fermented dandelion with 30% raw sugars, FD50: fermented dandelion with 50% raw sugar, ■: 0.2 mg/mL, ▨: 2 mg/mL. Values represent the mean±SD ( $n=3$ ). Values with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ ).

**Table 2. Enzymatic activities of non-fermented and fermented dandelion extracts** (unit/mg protein)

Activity	DWE <sup>1)</sup>	FD30 <sup>2)</sup>	FD50 <sup>3)</sup>
Fibrinolytic enzyme	0.28±0.16	0.56±0.28	1.39±0.20
α-Amylase	ND <sup>4)</sup>	ND	0.20±0.15
Protease	0.41±0.06	1.00±0.32	1.20±0.43
Lipase	ND	ND	1.06±0.64

<sup>1)</sup>dandelion water extracts

<sup>2)</sup>fermented dandelions with 30% raw sugar

<sup>3)</sup>fermented dandelion with 50% raw sugar

<sup>4)</sup>Not detected

Values represent the mean±SD ( $n=3$ ).

### 민들레 발효물의 효소 활성도 평가

#### α-Amylase 활성 측정

α-Amylase는 amylose나 amylopectin의 α-1,4 결합을 무작위로 가수분해하여 dextrin을 형성하고 α-amylase의 지속적인 작용에 의해 maltose, maltotriose, maltotetraose 등의 oligosaccharide를 형성한 뒤 glucose와 maltose로 분해하는 효소이다. α-Amylase는 전분이나 글리코겐 등의 α-1,4-glucoside 결합을 무작위로 가수분해하며 호화 전분에 작용하여 신속하게 점도를 감소시키므로 액화효소라고도 하는데, 발효 시 α-amylase에 의한 당화작용으로 인하여 전분질에서 저분자 당류로 가수분해하여 유리당을 생성한다. Rhee 등(20)은 발효 된장에서 초기 30일간은 α-amylase 활성이 증가하다가 그 이후에는 감소한다고 보고하였다. 이는 미생물이 활발히 성장하는 시기에 많은 양의 효소를 생산하다 이후에 미생물 수가 감소하면서 생산되는 효소의 양이 줄어들었다고 판단된다. 한편 DWE와 FD30에서는 활성이 나타나지 않고 FD50에서만 0.2±0.15 unit/mg protein 활성을 나타낸 것을 보아 숙성 120일에는 α-amylase의 활성이 이미 감소한 이후라고 판단된다(Table 2).

#### Protease 활성 측정

민들레 물 추출물과 당 첨가 민들레 발효물의 단백질 분해활성은 DWE가 0.41±0.06 unit/mg protein을 보인 반면 FD30은 1.0

$\pm 0.32$  unit/mg protein, FD50은  $1.20 \pm 0.43$  unit/mg protein을 나타냈다(Table 2). 단백질 분해활성을 선행 연구(6)인 아미노산 조성 실험의 결과와 비교하였을 때 일반 추출물보다 발효물이 단백질 분해활성이 더 뛰어나다는 결과를 보였다. 이는 Rhee 등(20)의 protease 활성이 단백질을 가수 분해시켜 아미노산을 생성함으로써 유리 아미노산 함량에 많은 영향을 준다는 결과와 유사한 경향을 보였다. 한편 사용된 시료가 숙성 120일인 최종 발효과정에서 채취한 샘플임을 감안했을 때 발효에 관여하는 미생물의 최대 생육시기와 단백질 분해활성의 최대 활성은 그 이전이며 숙성 120일인 시점에는 미생물수가 많이 감소되었고 단백질 분해활성 역시 크게 감소되었다고 판단된다.

**Lipase 활성 측정**

Lipase 활성도는 DWE, FD30에서 0.01 unit/mg protein 이하로서 효소 활성도가 낮았으며, FD50 만이  $1.06 \pm 0.64$  unit/mg protein 활성을 나타내었다(Table 2). 이러한 결과는 민들레 속에 함유된 지방질의 농도가 높지 않아 발효미생물이 lipase를 생산하기 위한 충분한 양의 유도기질(inducer) 함량 수준에 도달하지 못하였기 때문에(21) 효소활성도가 전체적으로 낮으면서 동시에 발효기간이 경과함에 따라 감소한 것으로 사료된다. Joo 등(22)은 *Aspergillus* 속의 곰팡이를 이용한 된장 발효 시의 lipase 활성도에 대해 보고하였으며, 이러한 결과는 본 연구에서의 lipase 활성도 변화와 동일한 경향을 나타냈다.

**혈전용해 활성 측정**

민들레 추출물과 민들레 당 발효물을 plasmin의 농도 대비 활성을 Table 2에 나타내었다. 이때 투명 환이 타원형인 경우에는 긴지름과 짧은 지름을 평균하여 면적을 계산하였다. 민들레 당 발효물(FD30, FD50)과 민들레 추출물(DWE)에 대한 혈전용해 활성은 fibrin agarose plate를 이용하여 각각의 추출물에 의하여 투명 환을 형성함으로써 확인하였으며, 기존의 혈전용해제인 plasmin을 양성 대조구로 그 활성을 비교하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 본 실험에 사용한 시료의 농도는  $2 \mu\text{g/mL}$ 이고 FD50이  $1.39 \pm 0.20$  unit/mg protein에 해당하는 활성으로 다른 시료들 중에 가장 높게 나타났다. 그 다음으로 FD30이  $0.56 \pm 0.28$  unit/mg protein으로 DWE의  $0.28 \pm 0.16$  unit/mg protein보다 활성이 높아 발효물이 단순 추출물보다 높은 혈전용해활성을 나타냈다.

Kim 등(23)은 된장의 발효에 관여하는 *Bacillus* group 분포와 혈전용해효소활성은 양의 상관관계를 나타낸다고 하였으나, No 등(24)의 발효 전 후 적포도주의 혈전용해효소 활성을 나타낸 결과는 발효 전 포도즙과 발효후의 발효물의 활성능이 큰 차이가 없었다. 또한 대표적인 젖산발효인 김치에서는 분리된 균주가 혈전용해능이 우수하다는 결과(25)를 나타내 모든 발효물이 혈전용해능을 향상시키지는 않고 발효에 관여하는 미생물의 특성에 따라 활성의 차이가 있는 것으로 판단된다. 즉, 추출물보다 젖산발효가 일어난 발효물에서 활성능이 좋았던것은 발효에 관여하는 미생물들이 혈전용해효소를 생산하여 활성능이 더 좋았고 발효 120일에는 혈전용해효소를 생성하는 미생물이 크게 감소되어 활성이 감소한 것으로 판단된다. 한편 Lim 등(26)은 혈전용해효소는 단백질분해효소의 일종으로 주로 serine protease나 metallo-protease로 알려져 있어 혈전용해 활성을 검증하기 전에 단백질 분해활성 검증이 선행되어야 한다고 보고하였다. 본 실험에서도 혈전용해 결과와 마찬가지로 DWE보다 FD50과 FD30이 더 높은 단백질 활성을 띄는 것으로 보아 혈전용해 활성과 단백질 분해 활성은 연관성이 있음을 알 수 있다.

**요 약**

본 연구는 민들레에 각각 30, 50% 당을 첨가하고 15-20에서 120일간 발효를 하여 30% 당을 첨가하여 발효시킨 민들레 발효물(FD30), 50% 당을 첨가하여 발효시킨 민들레 발효물(FD50)로 진행되었다. 총 페놀성 화합물 함량은 FD30, FD50이 각각  $78.9 \pm 2.17$ ,  $59.35 \pm 2.56$  mg/g으로 DWE(dandelion water extract)의  $54.2 \pm 1.49$  mg/g 보다 높은 결과를 나타냈다.  $IC_{50}$ 으로 나타낸 DPPH 라디칼 소거활성은 FD30이  $118.7 \pm 2.03 \mu\text{g/mL}$ , FD50이  $123.40 \pm 2.15 \mu\text{g/mL}$ 의 결과를 나타냈고 FD30이 높은 항산화 효과를 보인다는 것을 확인했다. 항염활성을 보기 위해 실시한 NO 소거능은 FD30, FD50 모두  $2 \text{ mg/mL}$  농도로 처리했을 때  $8.8 \pm 1.72$ ,  $11.8 \pm 2.87 \mu\text{M}$ , 같은 농도의 민들레추출물은  $4.9 \pm 1.20 \mu\text{M}$ 를 나타냈다. 효소활성능은 FD50이 탄수화물 분해, 단백질 분해, 지질 분해에서 높은 활성을 보였다. 혈전용해 활성은 FD30, FD50이 각각  $0.56 \pm 0.28$ ,  $1.39 \pm 0.20$  unit/mg protein 활성을 보였으며 DWE는  $0.28$  unit/mg protein의 활성을 나타냈다. 이 연구를 통해 당을 첨가하여 발효시킨 민들레 발효물의 항산화 및 항염 활성을 확인하였고, 여러 가지 유용한 효소활성을 입증하였다.

**감사의 글**

본 연구는 '08-'10년도 농업인현장실용화기술개발사업(농업기술센터연구개발지원)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

**문 헌**

1. Heo SI. Study of bioactivity of diarylheptanoid isolated from *Alnus hirsuta*. PhD thesis, Kangwon National University. Chuncheon, Korea (2010)
2. Ahn DK. Illustrated Book of Korean Medical Herbs. Gyohaksa, Seoul, Korea. pp. 114-683 (2003)
3. Yang KS, Jeon CM. Effect of *Taraxacum coreanum* Nakai on low density lipoprotein oxidation. J. Korean Pharmacogn. 27: 267-273 (1996)
4. Schütz K, Carle R, Schiebr A. *Taraxacum*-A review on its phytochemical and pharmacological profile. J. Ethnopharmacol. 107: 313-323 (2006)
5. Choi HD, Koh YJ, Kim YS, Choi IW, Cha DS. Changes in physicochemical and sensory characteristics of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves by roasting treatment. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 515-520 (2007)
6. Kim KM, Kim YN, Choi BK, Oh DH. Physicochemical and microbiological changes of the fermented dandelion (*Taraxacum officinale*) extracts with raw sugar. Korean J. Food Preserv. 19: 131-137 (2012)
7. Kim SY, Choi EH. Optimization for the lactic acid fermentation of mixed fruit and vegetable juices. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 303-310 (2002)
8. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1201 (1958)
9. Athukorala Y, Kim KN, Jeon YJ. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Eckloniacava*. Food Chem. Toxicol. 44: 65-1074 (2006)
10. Hull ME. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. J. Dairy Sci. 30: 881-884 (1974)
11. Astrup TS, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. Biophys. 40: 346-351 (1952)
12. Ha JH, Jeong MH, Seo YC, Choi WY, Kim JS, Kim HH, Ahn JH, Lee HY. Enhancement of antioxidant activities of bark of berberis koreana palibin by lactic acid fermentation. Korean J.

- Med. Crop Sci. 18: 421-428 (2010)
13. Rodnguez H, Curiel JA, LAndete JM, de las Rivas B, de Felipe FL, Gomez-Cordoves C, Mancheno JM, Munoz R. Food phenolics and lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 132: 79-90 (2009)
  14. Khalil RKS. Influence of gallic acid and catechin polyphenols on probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 strain. World Microbiol Biot. 26: 2069-2079 (2010)
  15. Yu EM. A study of biological activities of Korean dandelion (*Taraxacum coreanum* Nakai) extracts and preparation of Korean dandelion beverage. Semyung University Graduate School (2009)
  16. Min SH, Lee BR. Antioxidant activity of medicinal plant extracts cultivated in Jecheon. Korean J. Food Culture 22: 336-341 (2007)
  17. Chen JH, Ho CT. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. J. Korean Agric. Chem. Soc. 45: 2374-2378 (1997)
  18. Park YH, Lim SH, Ham HJ, Kim HY, Jeong HN, Kim KH, Kim S. Isolation of anti-inflammatory active substance  $\beta$ -sitosterol from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) stem. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39: 980-985 (2010)
  19. Cheon YP, Mohammaad LM, Park CH, Hong JH, Lee GD, Song JC, kim KS. *Bulnesia sarmienti* aqueous extract inhibits inflammation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. J. Life Sci. 19: 479-485 (2009)
  20. Rhee CH, Lee JB, Jang SM. Changes of microorganisms enzyme activity and physiological functionality in the traditional *deonjang* with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotech. 43: 277-284 (2000)
  21. Ham SN, Kim SW, Lee JH, Chang PS. Changes in enzymatic activities during *eojukjang* fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 251-256 (2008)
  22. Joo HK, Kim ND, Yoon KS. Changes of enzymatic activities during the fermentation of soybean-soypaste by *Aspergillus* sp. J. Korean Agric. Chem. Soc. 32: 295-302 (1989)
  23. Kim DH, Song HP, Kim KY, Kim JO, Byun MW. A correlation between fibrinolytic activity and microflora in Korean fermented soybean products. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 41-46 (2004)
  24. No JD, Lee EN, Seo DS, Chun JP, Choi SY, Lee JS. Changes of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity, fibrinolytic activity and b-secretase inhibitory activity of red wines during fermentation and post-fermentation. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 36: 291-298 (2008)
  25. Noh KA, Kim DH, Choi NS, Kim SH. Isolation of fibrinolytic enzyme producing strains from kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 219-223 (1999)
  26. Lim CY, Lee SY, Pyo BS, Kim SM. Fibrinolytic enzyme activity of extract from *Camellia japonica* L. Korean J. Med. Crop Sci. 14: 195-201 (2006)