



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](#)

표 영 희 교수 지도

석사학위 청구논문

아세트산 발효가 홍국발효 콩의
생리활성 성분 및 항산화 활성과
xanthine oxidase 저해활성에
미치는 영향

2017

성신여자대학교 대학원

식품영양학과

황 지 영

아세트산 발효가 홍국발효 콩의
생리활성 성분 및 항산화 활성과
xanthine oxidase 저해활성에
미치는 영향

표영희 교수 지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2016년 11월

성신여자대학교 대학원

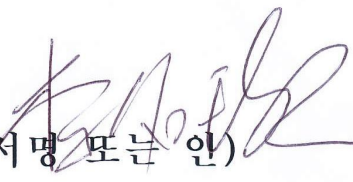
식품영양학과


황지영

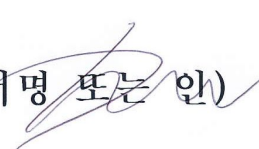
인 준 서

황지영의 석사학위 논문으로 인준함

2016년 11월

심사위원장 이 병득 (서명 또는 인) 

심사위원 이 명철 (서명 또는 인) 

심사위원 표창근 (서명 또는 인) 

성신여자대학교 대학원

논문개요

본 연구는 서리태를 *Monascus pilosus* 60084로 20일 동안 발효시킨 홍국 발효콩에 초산 발효를 시켜 제조한 식초의 생리활성 성분과 항산화 활성 및 xanthine oxidase (XO) 저해활성의 변화를 발효 시간에 따라 조사하였다. 유기산, 총 유리아미노산, 이소플라본, 유비퀴논 함량의 분석은 HPLC를 이용하였고 총 폴리페놀, 플라보노이드 성분은 분광광도계를 이용하여 분석하였다. 주요 유기산은 acetic acid와 lactic acid로 발효 20일 이후에 각각 55.94 ± 1.57 mg/mL 와 3.82 ± 0.11 mg/mL로 나타났다. 최대의 총 유리아미노산 함량(4.55 mg/mL), 유비퀴논 함량(0.276 ug/mL), 총 폴리페놀(0.97 ± 0.01 mg gallic acid equivalent/mL)함량과 플라보이드 함량(0.30 ± 0.02 mg quercetin equivalent/mL)은 초산 발효가 경과함에 따라 증대하였으나, 이소플라본 함량의 변화는 유의적인 차이가 없었다 ($p > 0.05$).

초산 발효 기간에 따른 홍국 발효 콩 식초의 항산화 활성은($0.39 \sim 2.24$ mg trolox equivalent/ml) DPPH 와 ABTS 라디칼을 소거하는 능력과 환원력을 측정하는 FRAP 분석의 결과로 평가하였다. 홍국발효 콩 식초는 발효시간이 증가함에 따라 발효 전에 비해 평균 항산화 활성이 1.74 배 증가하였다. 식초 시료의 평균 항산화 활성은 총 폴리페놀 ($R^2=0.9865$) 과 유리 아미노산 ($R^2=0.9196$) 함량과 높은 상관도를 나타내었다. XO 저해 활성 역시 초산 발효가 진행할수록 증가하였으며, 특히 발효 20일 이후에 95.3%로 나타나 1 mM allopurinol의 저해활성과 비슷한 수준으로 나타났다. XO 저해 활성에 기여한 주요 성분은, 유리 아미노산 ($R^2=0.9555$) 과 총 폴리페놀 ($R^2=0.9376$) 함량으로 나타나 이들 두 물질이 홍국발효 콩 식초의 생리활성에 주요 영향을 미친 활성성분으로 평가되었다.

목 차

논문개요

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	10
1. 실험 재료	10
(1) 원료	10
(2) 사용균주	10
2. 실험 방법	11
1) 홍국균 발효	11
(1) 종 배양	11
(2) 영양 액체배양	11
(3) 고상발효	11
2) 알코올 발효 및 초산 발효	12
(1) 주모 및 종초	12
(2) 알코올 발효	13
(3) 초산 발효	13
3) 일반 및 특수 성분함량 측정	14
(1) 에탄올 함량	14
(2) PH와 총 적정산도 측정	14

(3) 유기산 함량	15
(4) 유리 아미노산 분석	15
(5) Isoflavones 함량	17
(6) Ubiquinone 함량	18
(7) 총 폴리페놀 함량	19
(8) 플라보노이드 함량	19
4) 생리활성 측정	20
(1) 항산화 활성	20
① ABTS 라디칼 소거활성	20
② DPPH 라디칼 소거활성	20
③ FRAP 측정	20
(2) Xanthine oxidase (XO) 저해활성	21
5) 통계처리	21
III. 결과 및 고찰	22
1. PH와 적정 총산도	22
2. 유기산 함량	24
3. 유리 아미노산 함량	27
(1) 총 유리아미노산 함량	27
(2) 필수 아미노산 함량	29
(3) 비 필수 아미노산 함량	31
(4) GABA 함량	33

4. Isoflavones 함량	35
5. Ubiquinone 함량	39
6. 총 페놀 함량	43
7. 플라보노이드 함량	45
8. 생리활성 측정	47
1) 항산화 활성	47
(1) DPPH 라디칼 소거 활성	47
(2) ABTS 라디칼 소거 활성	47
(3) FRAP 측정	47
2) Xanthine Oxidase (XO) 저해 활성	50
9. 생리활성 성분과 항산화 활성 및 xanthine oxidase 저해활성과의 상관관계	53
IV. 결론	55

참고문헌

ABSTRACT

List of Figure

Fig. 1. Statin : pathway of the HMG CoA reductase inhibitor	3
Fig. 2. Two-step process for producing vinegar	5
Fig. 3. Uric acid formation process	8
Fig. 4. Changes of total acidity and PH of vinegar brewed from <i>Monascus</i> -fermented soybean during acetic acid fermentation	23
Fig. 5. The HPLC chromatogram of the organic acid standards (A), the chromatogram of vinegar brewed <i>Monascus</i> -fermented soybean(B)	25
Fig. 6. Changes of total free amino acid of vinegar brewed from <i>Monascus</i> -fermented soybean during acetic acid fermentation (mg/mL)	28
Fig. 7. Changes of essential amino acid of vinegar brewed from <i>Monascus</i> -fermented soybean during acetic acid fermentation (ug/mL)	30

Fig. 8. Changes of GABA of vinegar brewed from <i>Monascus</i> -fermented soybean during acetic acid fermentation	34
Fig. 9. Chemical structure of isoflavones	36
Fig. 10. The HPLC chromatogram of the 12 isoflavone standards (A), the chromatogram of vinegar brewed from <i>Monascus</i> -fermented soybean (B)	37
Fig. 11. Chemical structure of oxidized and reduced coenzyme Q	40
Fig. 12. The HPLC chromatograms the ubiquinones (CoQ9+CoQ10) standards (A), the chromatogram of vinegar brewed from <i>Monascus</i> -fermented soybean (B)	41
Fig. 13. Changes of ubiquinones (CoQ9+CoQ10) in vinegar from <i>Monascus</i> -fermented soybeans during acetic acid fermentation	42
Fig. 14. Changes of total polyphenol compounds of vinegar brewed from <i>Monascus</i> -fermented soybean during acetic acid fermentation	44
Fig. 15. Changes of total flavonoid of vinegar brewed from <i>Monascus</i> -fermented soybean during acetic acid fermentation	46

Fig. 16. Changes of xanthine oxidase inhibitory activity of vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybeans during acetic acid fermentation52

Fig. 17. Comparison of xanthine oxidase inhibitory activity of soy vinegar extracts by their concentration levels52

List of Table

Table 1. Representative antioxidant enzyme and elimination of reactive oxygen species	7
Table 2. Nutrition broth for <i>Acetobacter aceti</i>	11
Table 3. Analysis of gradient elution condition for amino acid with HPLC	16
Table 4. Analysis of gradient elution condition for isoflavones with HPLC.....	17
Table 5. Changes of organic acids of vinegar brewed from <i>Monascus</i> -fermented soybean during acetic acid fermentation (mg/mL)	26
Table 6. Changes of non-essential amino acids ($\mu\text{g/mL}$) of vinegar brewed from <i>Monascus</i> -fermented soybean during acetic acid fermentation	32
Table 7. Changes of isoflavones of vinegar brewed from <i>Monascus</i> -fermented soy bean during acetic acid fermentation	38

Table 8. Changes of antioxidant activity (mM trolox/mL) of vinegar brewed *Monascus*-fermented soybean during acetic acid fermentation48

Table 9. Linear regression of the bioactive components and antioxidant and anti-xanthine oxidase activities of soy vinegar54

I. 서론

홍국(紅麴)은 붉은 누룩이라는 뜻으로 약 2,000년 전 중국 한나라 황제 유방이 처음 황실 음식으로 혈행을 개선시키는 한약재로 사용하다가, 조선 중기 중국 사신에 의해 우리나라에 전래되어 한방에서 어혈 해소제로 사용하였고, 허준의 동의보감의 탕액편 곡부에는 홍국이 피를 잘 돌게 하고 음식이 소화되게 하며 이질을 멎게 하는 신국(神麴, 약누룩)이라고 기록되어 있다(1). 홍국균으로 알려진 *Monascus* 속은 진균류의 곰팡이로서 분류학상으로 Ascomycotina 강, Plectomycetes 아강, Plectrascales 목, Hemiascomycetaceae 과(반자낭균과), Aspergillaceae 과, Monascaceae 족에 속하며, 자웅동체(hemothallic)이고, 격벽을 가지고 있는 *Monascus* sp.로써 현재 약 20종, 균주로서 약 70여종이 분리되어 있다(2,3). 홍국균은 균사가 붉은색을 띠기 때문에 홍국균이라고 하고 이 특유의 붉은색 때문에 아시아와 여러 나라에서 식용색소, 식품의 보존 및 살균제, 건강식품 등으로도 다양하게 이용되어 왔다. 홍국균은 우리나라의 전통누룩으로부터도 분리되며 종류로는 *M. purpureus*, *M. ruber*, *M. pilosus*, *M. kaoliang* 등이 알려져 있다. *Monascus* 속 곰팡이는 α -amylase, β -amylase, protease, lipase 등의 가수분해 효소(4) 뿐만 아니라 적색색소인 monascorubramine과 rubropunctamin, 노란색소인 monascorubrin과 rubropunctatin 그리고 황색색소인 xanthomonasin A, B도 발견되었다. 이는 독성이 없는 색소성분으로 인체에 대한 안전성이 높기 때문에 천연 적색색소로서 의약품 제조 및 식품 첨가제로도 주목받아 왔다(5). 또한 홍국균의 Monacolin K(Mevinolin, lovastatin), γ -aminobutyric acid (GABA), acetylcholine 등과 같은 대사산물은 생리활성물질로서 항암효과, 혈압강화효과, 혈관이완, 항진균, 항콜레스테롤 효과 등의 다양한 기능성이

과학적으로 입증되었다(6~9). 특히 *Monascus ruber*로부터 독성이 극히 낮고 콜레스테롤 생합성 저해물질인 monacolin K(mevinolin 및 lovastatin)와 같은 statin계 성분을 생성하는 것으로 알려져 동맥경화의 예방에 사용되고 있는데(10,11), 이는 콜레스테롤 생합성 과정에서 3-hydroxy-3-methyl glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase를 Fig. 1과 같이 억제하기 때문이다.

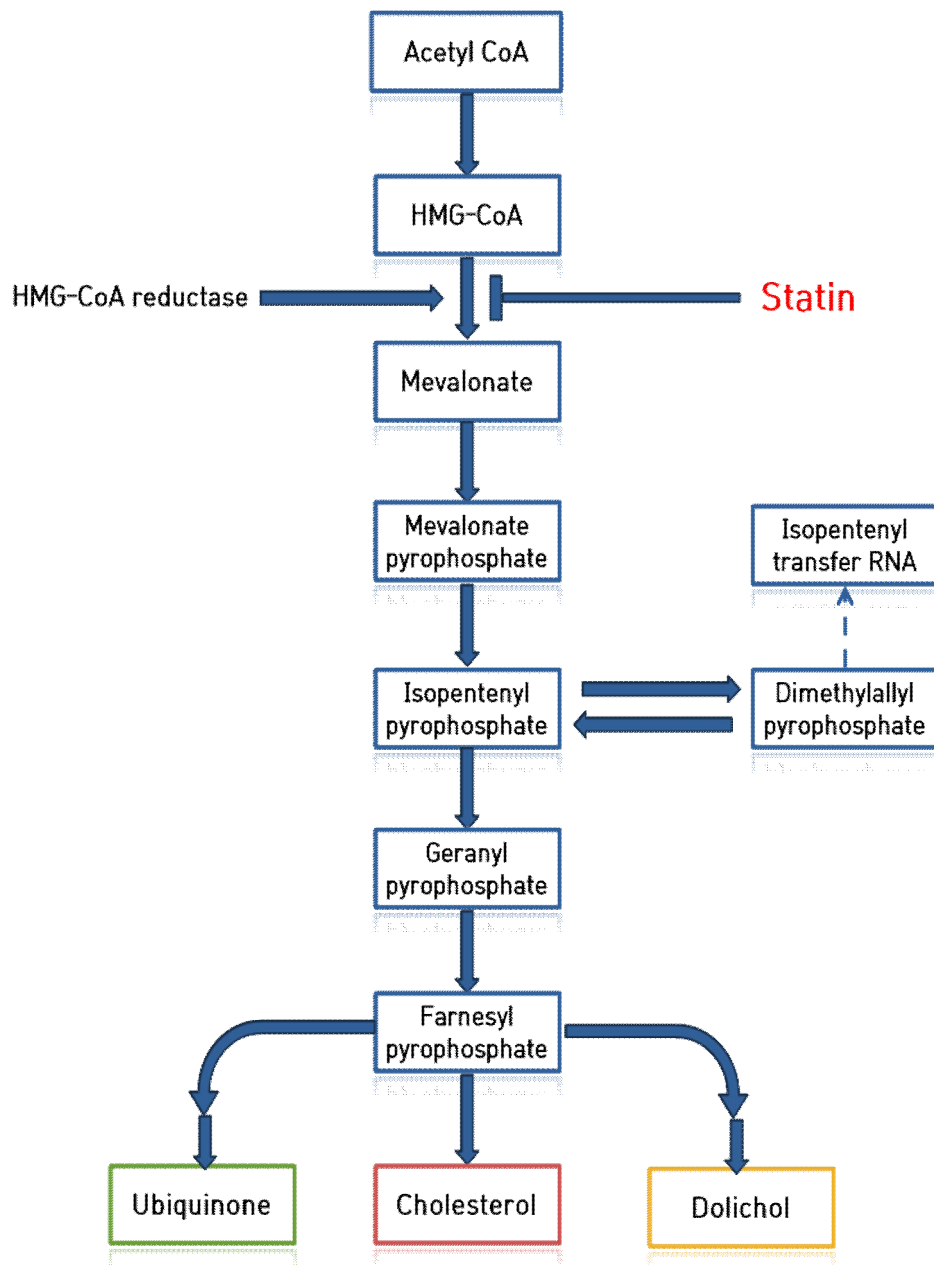


Fig. 1. Statin : pathway of the HMG CoA reductase inhibitor

Monacolin K는 동맥경화증에서도 가장 나쁜 지단백질 LDL(low density lipoprotein)-cholesterol을 우선적으로 낮추는 작용이 있으며(12), 고혈압에 대한 혈압강하 효과가 있다는 동물실험 결과도 보고되었다(1).

홍국균을 곡류(쌀)에 배양하면 붉은 색을 띠는 누룩을 얻을 수 있는데, 이를 홍국쌀이라고 한다. 홍국쌀은 우리나라를 비롯해 동아시아 지역에서 오래전부터 사용되어 온 건강식품으로, red yeast rice, red rice, anka, ang-kak, angquac, ankak, angkak, beni-koji 등 다양한 이름으로 알려져 왔다(13). 찐 백미에 홍국균(*Monascus perperus*)을 접종하고 배양하여 만든 홍국쌀을 중국에서는 수세기 동안 식품으로서 뿐만 아니라 술을 비롯한 발효식품 제조와 향미 증진제 또는 착색제로 사용하고 있다(14). 홍국균을 이용한 홍국 발효물의 생산에는 쌀 뿐 아니라 다른 고상 기질로 콩이나 메밀 등의 다양한 곡물을 사용할 수 있다. 그 중에서 검정콩(흑태, 서리태)은 옛날부터 한방에서 오두(烏頭)라 불리는 약 콩으로 허약체질, 무기력증 해소와 각기병 예방, 약물중독, 식중독 등에도 효과가 있다고 알려져 왔다(15,16). 홍국균으로 콩을 발효시켜 제조한 홍국 발효콩은 발효하지 않은 콩에 비해 mevinolin, CoQ10, proanthocyanidin, 총 폴리페놀함량 등이 증가하였으며, 배당체형의 isoflavone이 비배당체형으로 생물전환되는 것으로 보고되었다(17). 또한 홍국 발효콩 추출물은 고지방과 고콜레스테롤 식이로 유도된 쥐의 혈중지질 상태를 개선하며(18), 혈압 상승을 촉진하는 효소인 angiotensin I-converting enzyme (ACE) 활성을 저해하는 것으로도 알려진다(19).

식초는 세계적으로 오랜 역사를 가진 발효식품으로 일상생활에서 자주 이용하는 조미료이다. 식초는 총산(w/v%)이 4% 이상이어야 하고 제조방법에 따라 합성식초와 양조식초로 구별된다(20). 우리나라에서는 예전부터 가정에서 다양한 원료와, 제조방법으로 식초를 만들었고 주로 곡류식초와

과일식초를 만들었다. 양조식초는 합성식초보다 산도는 낮지만 풍부한 맛과 영양을 갖고 있으나, 생산 기간이 길고 균일한 품질을 가진 제품의 생산이 어려우며 원가가 비싸다는 단점 때문에 점차 사용이 줄어들고 대신 값싸고 산도가 높은 합성식초가 사용되어 왔다. 그러나 최근에 합성식초의 유해성이 제기되어 양조식초가 다시 떠오르고 오늘날엔 조미료의 용도를 넘어서 건강식품으로써의 식초함유음료가 등장하기에 이르렀다(21). 식초의 제조방법은(22) 크게 전통방식인 병행복발효 방법과, 시판양조식초(주정을 희석) 제조방법, 알코올 및 초산 발효 2단계 발효단계로 만들어지는 천연양조식초 제조법 등이 있다. 국내에서 생산되는 시판식초는 주정을 약 6%로 희석해 초산 발효만 진행해 만든다. 병행복발효는 알코올 및 초산 발효를 병행함으로써 수율이 낮고 6개월 이상의 기간이 소요되어 대량생산에는 문제점이 있다. 또한 알코올 및 초산 발효과정이 구별되지 않아 식초의 유기산에서 젖산의 함량이 높아 이취의 원인이 된다(23). 마지막으로 2단계 발효방법은 과일이나 곡류를 원료로 술덧을 제조하여 알코올 발효를 한 후 2단계로 초산 발효를 시켜 만드는 방법이다. 이는 Fig. 2와 같이 당이 혐기적 상태에서 알코올로 전환되고 다시 알코올이 호기적 상태에서 초산으로 변형되는 과정으로 생산하는 원리이다(24).

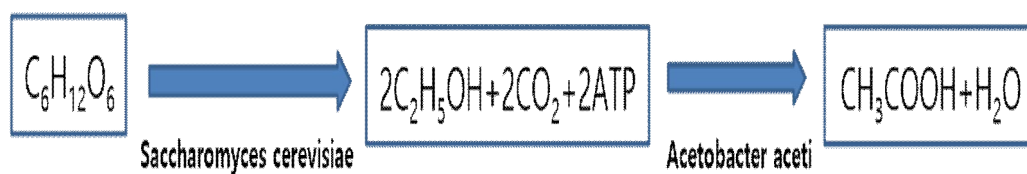


Fig. 2. Two-step process for producing vinegar

일반적으로 식초에는 수십 여종 이상의 유기산을 갖고 있어 산미를 형성하고 체지방 감소, 성인병 예방, 피로 회복 등 다양한 효과가 있으며(25) 당뇨병 예방, 혈압상승 방지, 항종양 효과, 소화액 분비촉진, 노화방지 등 여러 질환의 예방뿐 아니라 미용에도 효과적인 발효식품으로 알려져 왔다(26). 이러한 식초의 기능과 관련해 식초에는 산미의 기본이 되는 초산 이외에도 휘발성 및 비휘발성의 유기산, 아미노산, 에스터 등을 함유하고 있어 독특한 향과 맛으로 식욕을 자극한다(27). 즉, 식초에는 acetic, lactic, tartaric, citric, succinic acid 등 당분해 과정의 TCA cycle에서 볼 수 있는 유기산들이 함유되어 있어 맛과 영양, 품질 유지, 안정성은 물론 칼슘 등 미량 성분들의 체내 흡수를 향상시키고 생리적 상태에 따라 필요한 물질로 쉽게 전환되어 체내 대사를 원활하게 하는 등의 기능을 나타낸다(28). 또한 식초에는 항산화활성에 관여하는 주 물질로 폴리페놀 및 플라보노이드 성분이 있으며(29), ferulic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, quercetin, catechin 등이 전자 공여능에 관여한다고 보고되어 왔다(30).

인체에서 산화반응은 중요하며 산화적 대사는 세포의 생존에 필수적이다. 그러나 free radical과 같은 reactive oxygen species (ROS)의 과잉 생산은 산화적 대사의 역효과를 초래한다. Free radical은 하나 이상의 비공유 전자를 함유하는 분자로 ROS라고도 불리고 내인성과 외인성 물질에서 모두 생성되며 반응성이 커서 세포와 DNA를 손상시키고 관련 효소를 비활성화시킨다(31,32). 미토콘드리아에서는 ROS의 한 종류인 hydrogen peroxide (H₂O₂)가 상당량 발생하는데, 인체 내에 ROS가 과잉 생산되면 glutathione reductase, catalase, superoxide dismutase 등의 항산화 효소 등이 세포 손상을 보호한다(33-35). 그러나 염증성 질환이나 스트레스 환경에 의해 체내 활성산소 제거 능력이 감소하면 ROS는 인체의 세포막, DNA, 단백질, 효소, 비타민 등을 손상시켜 암과 암세포를 유발한다(36). 즉 정상 세포의

구성성분인 지방, 단백질, 유전자를 산화시켜 노화와 각종 질병의 발생을 촉진한다. 이와 관련해 항산화제는 ROS를 제거하는 물질로 생체 내에 존재하는 기질, 즉 산화적 손상을 받을 수 있는 분자들의 산화를 저해하거나 막을 수 있는 물질이다. 인체 내의 대표적인 항산화 효소들의 종류는 Table 1.과 같다(31).

Table 1. Representative antioxidant enzyme and elimination of reactive oxygen species

Superoxide dismutase	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Catalase	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Glutathione peroxidase	$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$ $LOOH + 2GSH \rightarrow GSSG + H_2O + LOH$

그 밖의 대표적인 항산화제는 vitamin, phenolics, carotenoids, α -tocopherol (vitamin E), thioredoxin 등과 함께 많은 flavonoids가 알려진다. 홍국 발효물의 항산화 능력은 홍국색소와 홍국발효물이 갖는 phenols 화합물과 상관성이 있는 것으로 보고되었다.(37,38), 특히 홍국 발효콩의 항산화활성은 페놀화합물 뿐 아니라 발효에 의해 생성된 CoQ10, tocopherols, genistein 등과 같은 isoflavone aglycone 화합물 등이 작용하여 나타나는 것으로 보고되었다(39,40).

통풍 (Gout)은 고령화와 식습관의 변화로 우리나라뿐만 아니라 세계적으로 발병률과 사망률이 급속하게 증가하고 있으며 술과 단백질(퓨린)이 많이 포함된 음식 섭취량이 높을수록 발병률도 증가한다.(41) 이에 따라 통풍의 예방 및 치료와 관련한 천연 기능성 소재를 탐색하는 많은 연구들이 진행되어 왔다. 통풍은 관절염 중 하나로 고요산혈증 (hyperuricemia) 때문에 발생하며, 고요산혈증은 요산의 낮은 배출과 체내 축적으로 인해 야기되므로 통풍 발생의 전조 증세로 알려진다(42). Fig. 3와 같이 xanthine oxidase (XO)는 요산 생성에 있어서 중요한 효소로 hypoxanthine을 xanthine으로, xanthine을 uric acid로 바꾸는 촉매 효소로 작용한다. 또한 산소를 전자수용체로 이용하여 ROS를 생성함으로써 지질의 과산화와 노화에도 관여하여 각종 성인병 유발의 원인이 되는 물질이다(43).

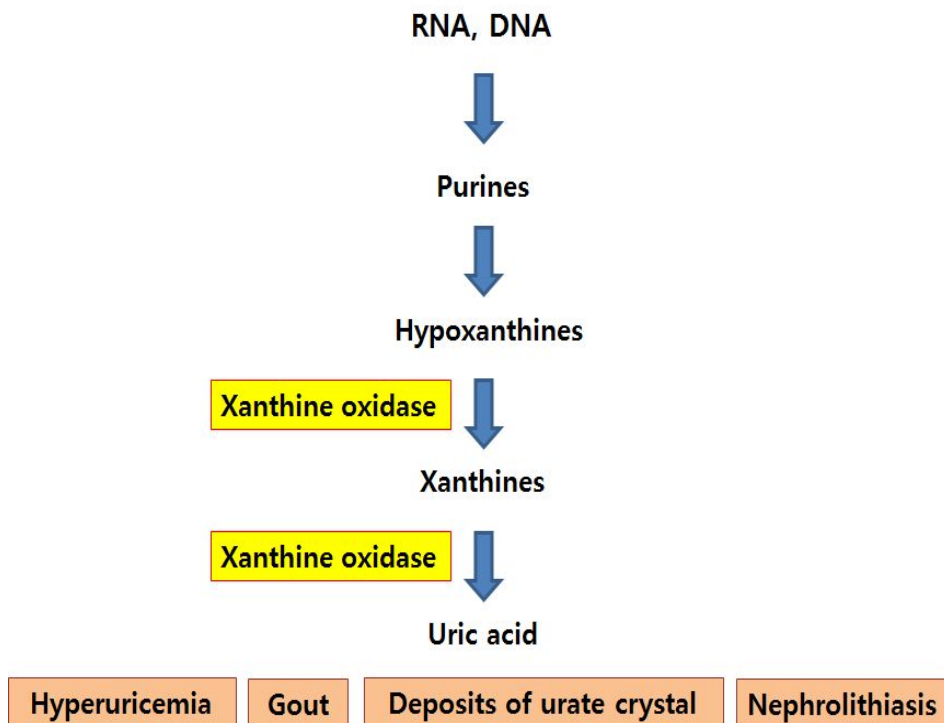


Fig. 3. Uric acid formation process

홍국균을 병입 차에 발효시킨 발효 병입 차와 비발효 병입 차의 XO 저해활성을 비교한 연구에 따르면(44), 발효 차의 polyphenol 및 flavonoid 함량이 비발효 차의 약 25%밖에 되지 않음에도 XO 저해 활성이 높은 것은 발효에 의해 생성되는 2차 대사산물에 의한 것으로 보고하였다. 이처럼 여러 종류의 기질을 사용하여 제조한 홍국 발효물의 다양한 생리활성 성분과 항산화 능력에 대한 연구는 많이 진행되어 왔으나, 홍국 발효물이 초산 발효에 의해 변화되는 이화학적 특성과 생리활성 물질의 변화에 대한 연구는 아직까지 미비하다.

본 연구에서는 뛰어난 약리적 효과가 인정된 홍국균을 이용하여 만든 홍국발효 콩으로 술을 제조한 다음, 초산 발효를 유도함으로써 초산 발효 기간에 따라 홍국 발효물의 이화학적 변화를 다음과 같이 비교 평가하였다. 즉, 초산 발효 중의 총산도, 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량 등을 측정하였고 유기산, 아미노산, 유비퀴논 성분 등의 변화를 HPLC로 분석하여 그 결과를 비교하였다. 또한 초산 발효 중의 항산화 활성은 물론 XO의 저해활성을 측정하여 식초의 생리활성의 결과가 초산 발효 전과 후에 어떻게 차이 나는지 비교 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

(1) 원료

본 실험에 사용된 서리태는 국내에서 생산한 2014년산으로 서울에 있는 대형마트에서 구입하여 시료로 사용하였다.

(2) 사용균주

홍국균은 한국생명공학 연구원 생물자원센터에서 *Monascus pilosus* 60084를 분양받아 사용하였고, 알코올 발효에 사용한 효모는 동결건조 분말 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)로 전북 송천효모 개발 연구소에서, 누룩은 (*Aspergillus oryzae*) 경기도 화성시 한국효소 주식회사에서 구입하여 사용하였다. 초산균은 한국생명공학 연구원 생물자원센터에서 *Acetobacter aceti* KCCM (40229)를 분양받았다.

2. 실험방법

1) 홍국균 발효

(1) 종 배양 (seed culture)

홍국균을 potato dextrose agar (PDA; Becton, Dickinson and Co.USA) 배지에 27℃에서 7일 동안 배양 후 계대 배양하여 사용하였다.

(2) 영양 액체배양 (nutrient broth)

증류수 100mL에 영양 액체배양물 [쌀가루, 포도당 (Junsei Chemical Co. Japan), 맥아당 (Junsei Chemical Co. Japan), 펩톤 (Beckton-Dickinson, Le Pont de Claix, France), 글리세롤 (Junsei Chemical Co. Japan), NaNO₂ (DaeJung Chemical Co. Korea), MgSO₄ (Kanto Chemical Co. Japan), (NH₄)₂SO₄ (Junsei Chemical Co. Japan), Yeast ext. (Alpha Biosciences. USA)] 조성으로 제조 하여 멸균기로 (121℃, 20분) 멸균한 후 균을 접종하여 30℃에서 5일 동안 진탕배양기 (Chang shin Science Co. Korea)에서 150 rpm으로 배양하였다.

(3) 고상발효 (solid substrate fermentation)

서리태는 12시간 물에 침지하여 건조 시킨 후, 삼각플라스크에 50g씩 담아 멸균기에서 121℃의 조건에서 20분간 멸균하였다. 이를 냉각한 후 영양 배지 (10%, v/w)를 기질에 접종하고 28℃에서 20일 동안 배양한 후 동결 건조하였다.

2) 알코올 발효 및 초산 발효

(1) 주모 및 종초

알코올 발효에 사용한 효모는 동결건조 분말 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)로 전북 송천효모 개발 연구소에서, 누룩은(*Aspergillus oryzae*) 경기도 화성시 한국효소 주식회사에서 구입하여 사용하였다. 초산균은 한국 생명공학 연구원 생물자원센터에서 *Acetobacter aceti* KCCM (40229)를 분양받아 고체 배지에 계대 배양하여 28℃의 인큐베이터에서 4일 배양 후, 액체배지(Table 2.)에 배양하여(30℃, 150rpm) 초산 발효의 종초로 사용하였다.

Table 2. Nutrition broth for *Acetobacter aceti*

Nutrition broth(%)	
yeast ext	5
peptone	0.3
mannitol	2.5

(2) 알코올 발효

홍국균으로 20일 발효시킨 서리태 50g을 볶은 후 청주 150mL, 조청 50g, 누룩15g, 효모 3g을 넣고 4일 동안 알코올 발효하였다. 거름망을 이용하여 걸러주고 원심분리(4000 rpm, 10 min)한 후 상층액만 모아 65℃에서 30분간 멸균한 다음 알코올 함량을 6%로 희석하여 초산 발효의 기질로 사용하였다.

$$\text{가수량} = \frac{\text{현알코올도수}(\%) - \text{원하는알코올도수}(\%)}{\text{원하는알코올도수}(\%)} \times \text{원액의양 (mL)}$$

(3) 초산 발효

기질에 종초 20%를 접종하여 30 ℃의 배양기에서 4주간 발효하였다. 발효하는 동안 7일 간격으로 시료를 채취하여 원심분리 (4000rpm, 10 min)한 후 냉장 및 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

3) 일반 및 특수 성분함량 측정

(1) 에탄올 함량

무수 크로뮴산(CrO_3)이 알코올에 의하여 청록색의 불투명한 크로뮴으로 환원되는 반응을 이용해서 알코올의 농도를 측정하였다. 시험관에 샘플 1mL과 1M 크로뮴산 5mL 넣고 잘 섞어 30분 후 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 증류수와 농도별 에탄올 용액을 이용하여 검량선을 작성하였고 %로 표시하였다.

(2) pH와 총 적정산도

시료의 pH는 pH meter (Ohaus, Sartar 3100, Korea)를 이용하여 측정하였고 총 적정산도는 중화 적정법을 이용하였다. 시료를 10g 채취하여 증류수로 10배 희석한 후 0.1N NaOH용액으로 적정하였다. 사용된 0.1N NaOH 용액의 양을 초산의 양으로 환산하여 나타냈다.

$$\text{총산 함량(\%)} = a * F * 0.006005 * 100/S * 1/10 * 100$$

(a = 0.1N NaOH 적정량, F = 0.1N NaOH의 factor, S = 시료채취량)

(3) 유기산 함량

식초 시료를 10배 희석한 후 0.2 μ m membrane filter에 통과시켜 불순물을 제거한 후 HPLC (Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)로 분석하였다. Column은 Phenomenex LUNA 5 μ C18(2) 4.6 X 250mm, 5 μ m Phenomenex를 사용하였고, 용매는 0.85% phosphoric acid (Samchun Chemicals, Korea)를 1mL/min 속도로 15분 동안 흘려주었으며 injection volume은 10 μ L, Detection Wavelength는 215 nm이다. 표준 유기산 물질은 acetic acid, lactic acid, succinic acid, tartaric acid, malic acid, citric acid (Sigma-Aldrich, U.S.A)을 사용하였다.

(4) 유리 아미노산 분석

식초 시료를 30 μ L 취한 후 완전히 건조 시켜 PLTC (phenylisothiocyanate)을 20 μ L 혼합하여 상온에서 30분간 반응시켜 유도체화 하였다. 이후 시료의 수분을 제거 한 후 200 μ L의 140 mM NaHAc, 0.15% TEA, 0.03% EDTA, 6% CH₃CN (PH6.1)용액에 용해하여 원심분리한 후 상층액을 따서 HPLC (Hewlett Packard 1100 series)로 분석하였다. 컬럼은 Waters Nova- Pak C18 4 μ m (3.9 \times 300mm)를 사용하였고 용매는 140 mM NaHAc, 0.15% TEA, 0.03% EDTA, 6% CH₃CN PH6.1 (a) 와 60% CH₃CN, 0.015% EDTA (b)이다. 시료의 injection volume은 10 μ L, 검출 파장은 254 nm이다. 용매 구매 조건은 Table 3.과 같다.

Table 3. Analysis of gradient elution condition for amino acid with HPLC

Min	Solvent B (%)	Flow (mL/min)
0	0	1
12	8	1
13	12	1
15.2	20	1
22.5	46	1
22.72	100	1.5
23.2	100	1.5
25	100	1.5
25.7	100	1.5
26	0	1.5
29	0	1.5
30	0	1

(5) Isoflavones 함량

식초 시료 2 mL를 C18 SPE Cartridges 통과 시킨 후, 200 μ L 메탄올로 농축 시켜 HPLC(Aglient 1100 series)로 분석하였다. 컬럼은 Phenomenex LUNA 5 μ C18(2) 4.6 \times 250mm, 5 μ m Phenomenex를 사용하였다. 용매는 0.1% formic acid (in DW)(a) 와 0.1% formic acid (in ACN)(b)로 flow rate는 1mL/min, 시료의 injection volume은 10 μ L, 검출 파장은 260 nm 이었다. 용매구배 조건은 Table 4.와 같다. 표준물질은 daidzin, glycitin, genistin, malonyldaidzin, malonylglycitin, malonylgenistin, acetyldaidzin, acetylglycitin, acetylgenistin, daidzein, glycitein, genistein (Sigma-Aldrich, U.S.A)을 사용하였다.

Table 4. Analysis of gradient elution condition for isoflavon with HPLC

Min	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	85	15
40	75	23
60	65	35

(6) Ubiquinones 함량

Coenzyme Q9 (CoQ9)과 CoQ10 함량을 측정하기 위해 식초 시료 25 mL를 동결 건조한 후 사용하였다(45). 건조 시료에 증류수 25ml, 피로갈롤 2.5 g, NaOH 10 g, 메탄올 75 mL를 혼합하여 가열교반기에서 20분간 가열하였다. 이후 n-헥산으로 3번 추출하여 hexane층만 수집한 후 회전증발기 (N-100, EY- ELA, Tokyo, Japan)로 용매를 증발시키고 2-propanol 2 mL로 추출한 다음 membrane 필터로 (0.20 μ m) 여과한 후 rp-HPLC-MS로 분석하였다. Mass detector (Agilent 6130 series)를 사용하여 electron ion의 확인을 positive mode에서 수행하였다. 컬럼은 Zorbox eclipse plus C18 column (2.1 \times 50 mm; 3.5-micron particle size; Agilent)이며 용매는 2-propanol과 ammonium formate (5 mmol/L)를 2 : 8 비율로 사용하였다. Flow rate는 0.3 mL/min이며 컬럼 온도는 30 $^{\circ}$ C, injection volume은 10 μ L이다. 시료 추출물의 CoQ9 (M+ 795.6, 812.7, 813.7 m/z)과 CoQ10 (M+ 863.7, 880.7, 881.7 m/z) 농도는 peak area로 결정하였다.

(7) 총 폴리페놀 함량

시료의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 이용하였다(46). 시료 50 μ L에 2% Na_2CO_3 1 mL를 혼합하여 3분 반응시킨 후 50% Folin-ciocalteu's reagent solution 50 μ L를 넣고 암소에서 30 분간 반응시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질 gallic acid도 동일한 방법으로 측정하여 표준 검량선을 작성한 후 시료의 결과를 mg gallic acid equivalent (mg GAE/mL)로 환산하여 표시하였다.

(8) 플라보노이드 함량

시료 속에 함유된 플라보노이드 함량은 colorimetric method (47)의 방법을 수정하여 측정하였다. 시료 500 μ L에 5% NaNO_2 를 첨가하여 3 분간 반응시킨 후, 10% AlCl_3 20 μ L넣고 다시 5 분간 반응시킨다. 1M NaOH 150 μ L과 혼합하여 시료의 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였다. 표준물질로 Quercetin(Sigma-Aldrich, U.S.A)을 이용하여 검량선을 작성하였고 총 플라보노이드 함량은 mg quercetin equivalent (mg QE/mL)로 나타내었다.

4) 생리활성 측정

(1) 항산화 활성

① ABTS 라디칼 소거활성

식초 시료의 항산화 활성의 측정은 ABTS 양이온의 라디칼 측정법 (48)에 따라 측정하였다. 시료 100 μ L와 ABTS (2,2'-azino- bis-3 - ethylbenzo - thiazoline - 6-sulfonic acid, Sigma-Aldrich) 용액을 900 μ L를 첨가한 후 암소에서 5 분간 반응 후에 735 nm 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 ABTS 라디칼 소거활성은 mg trolox equivalent (mg TE/mL)로 제시하였다.

② DPPH 라디칼 소거활성

식초 시료의 항산화 활성을 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich)에 대한 전자공여능 (electron donation ability)으로 측정하였다(49). 시료 100 μ L와 DPPH 용액 900 μ L를 첨가한 후 암소에서 10 분간 반응한 후에 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 DPPH 라디칼 소거활성은 mg trolox equivalent (mg TE/mL)로 제시하였다.

③ FRAP (Ferric reducing antioxidant power) 측정

FRAP 방법은 시료의 특정 성분이 ferric-tripyridyltriazine(Fe III-TPTZ) sodium acetate trihydrate (Junsei Chemical Co. Japan)을 환원시키는 능력을 측정하는 방법이다(50). 시료 50 μ L에 FRAP 용액 950 μ L 첨가한 후 암소에서 20 분간 반응한 후에 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 항산화 활성은 mg trolox equivalent (mg TE/mL)로 제시하였다.

(2) Xanthine oxidase 저해활성 (XO inhibition activity)

식초 시료 1 mL에 80% 에탄올 1 mL를 혼합한 후 10 분간 추출하였다. 원심 분리로 상층액만 분리한 후 용매를 증발시킨 다음 1 mL의 0.1M potassium phosphate buffer (PH 7.5)로 재용해 및 여과(membrane, 0.2 μ m)하여 시료로 사용하였다. 시료 100 μ L 또는 1 mM allopurinol (positive control)에 0.1M potassium phosphate buffer (PH 7.5) 600 μ L, 1 mM xanthine 200 μ L를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 10 분간 반응시켰다. 이후 0.125 unit xanthin oxidase 200 μ L를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 20 분간 반응 후 1N HCl 900 μ L를 혼합한 다음 원심분리하여 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. XO 저해활성은 다음과 같이 계산하여 % 저해율로 표시하였다.

$$\text{Inhibition effect (\%)} = (1 - (A-B) / C) \times 100$$

A : 1 mM xanthine 용액에 추출 시료와 효소액 반응 OD

B : A에서 효소 대신 DW 200 μ L 첨가한 OD

C : A에서 시료 대신 DW 100 μ L 첨가한 OD

5) 통계처리

실험결과는 3회 반복 측정한 후 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 각 평균치 간의 유의성은 SPSS software 22 (IBM, Armonk, NY, USA) 프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였고 Duncan의 다중검정을 사용하여 평균값 간의 유의성을 검정하였다($p < 0.05$).

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. pH와 총 적정산도

초산 발효 기간에 따른 PH와 총산도의 변화는 Fig. 4와 같이 나타났다. 홍국발효콩 식초의 초기 산도는 0.75%로 시작하여 7일에는 3.97%로 약5배 이상 급격하게 증가하였고 14일에는 4.22%, 21일에는 5.87%까지 증가해 시판되고 있는 식초 (6%)와 비슷한 수준까지 도달했다. 이후 28일에는 4.32%로 감소하였다. PH는 총산도와 반비례하여 0일에는 4.13에서 7일에는 3.28, 14일에도 3.28로 비슷하다가 21일에는 3.09였고 총산도 함량이 감소하는 28일에는 3.31로 다시 증가하였다(Fig. 1.). 반면 Joo 등(51)과 Cunha 등(52)의 보고에 따르면, 현미와 블랙베리를 이용한 식초 제조에서 7일 이내로 총산도가 5%가 되었고 그 이후에는 감소하는 경향은 본 연구와 유사하였으나 발효 속도에서는 약 3배나 빠른 것으로 나타났다. 초산 발효 연구 논문마다 발효 속도나 총산도 함량에 차이를 보이는 이유는 발효 기질, 초산균의 종류, 발효 온도 등 발효 조건에 영향을 받기 때문이다. 일반적으로 초산 발효 시 온도가 낮으면 균의 성장은 억제되고 온도가 높으면 성장은 활발하나 초산 생성능이 떨어지고 오염이 발생하는 것으로 알려져 왔다(53,54).

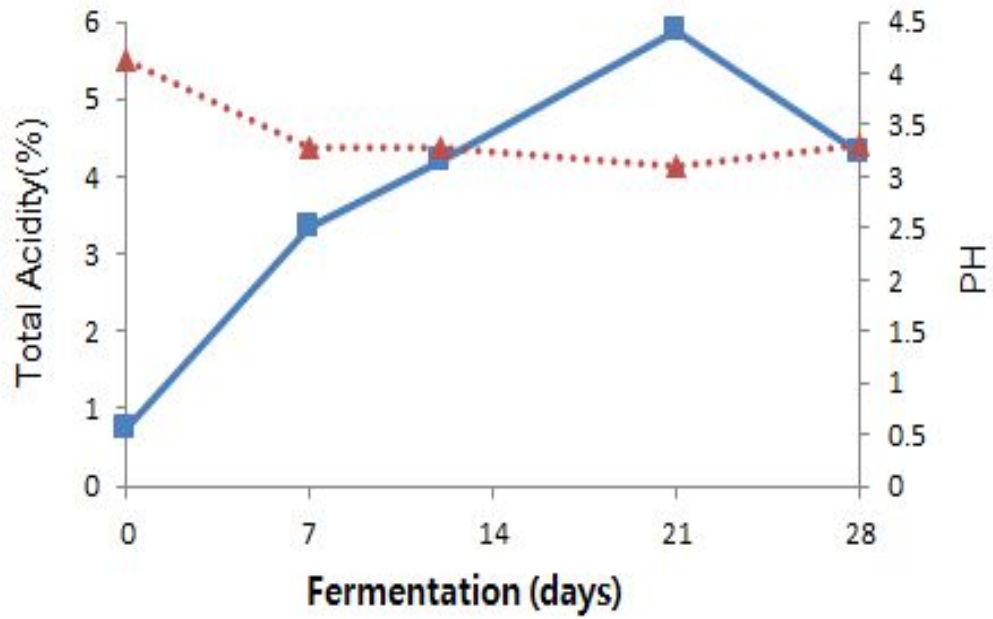


Fig. 4. Changes of total acidity and PH of vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybean during acetic acid fermentation

■ : Total acidity, ▲ : PH

2. 유기산 함량

식초 시료에 함유된 유기산 함량을 측정한 결과는 Fig. 5와 Table 5와 같이 나타났다. 그림에서와 같이 시료에서 검출된 주요 유기산의 종류는 acetic acid와 lactic acid로 그 함량은 Table 5와 같다. acetic acid는 식초에서 신맛을 내며 식초의 품질 지표가 되는 유기산인 반면 lactic acid는 다른 산에 비해 좀 더 부드러운 맛을 내며 음료의 산미제 또는 식품의 부패 방지제로도 사용되기 때문에 식초의 품질향상에 도움이 된다(55). Lactic acid는 시판 식초보다 전통발효 식초에 많이 들어 있으며 장내의 유해 세균의 발육을 억제하여 장의 기능을 좋게 한다(56). Acetic acid는 총산도와 비슷한 경향으로 0일에는 $9.50 \pm 0.11 \text{ mg/mL}$, 7일에는 $29.30 \pm 1.07 \text{ mg/mL}$ 로 약 3배 증가하였고 14일에는 $38.99 \pm 0.56 \text{ mg/mL}$, 21일은 $55.94 \pm 1.57 \text{ mg/mL}$ 까지 도달해 0일에 비해 5.8배 증가하였다. 이후 28일에는 $34.93 \pm 0.03 \text{ mg/mL}$ 로 감소하였다. lactic acid는 0일에 $0.72 \pm 0.07 \text{ mg/mL}$ 이고 초산 함량이 급증한 7일에는 $1.35 \pm 0.01 \text{ mg/mL}$ 로 약 1.8배 증가하였고 21일에는 $3.82 \pm 0.11 \text{ mg/mL}$ 로 0일에 비해 5.3배 증가하였다. 이후 28일에는 $3.81 \pm 0.01 \text{ mg/mL}$ 로 차이가 없었다. 유기산의 조성 차이는 원재료 함량 및 발효방법에 의해 영향을 받는데(57), Jo(58)는 쌀로 만든 식초의 주 유기산은 lactic acid와 succinic acid라고 했는데 이중 lactic acid 함량이 acetic acid보다 4배 이상 높았다고 보고 하였으며, Lee(59)의 보고에 따르면 쌀과 해당화를 이용해 만든 식초에서 lactic acid 함량이 3배 이상 높게 나타났다. 이는 acetic acid 생성 중 미생물의 생육기간에서 균의 사멸기 동안 영양분이 충분하지 않을 경우 acetic acid 대신 lactic acid가 생성되기 때문이라 하는데(60) 본 연구에서는 초산 발효 28일에 acetic acid의 함량이 lactic acid 함량보다 10배 많았다. 이 같은 결과에 따라 식초제조에 사용하는 원재료 성분의 차이와 접종 세균의 종류에 따라 유기산의 종류와 그 함량이 달라지는 것을 알 수 있었다.

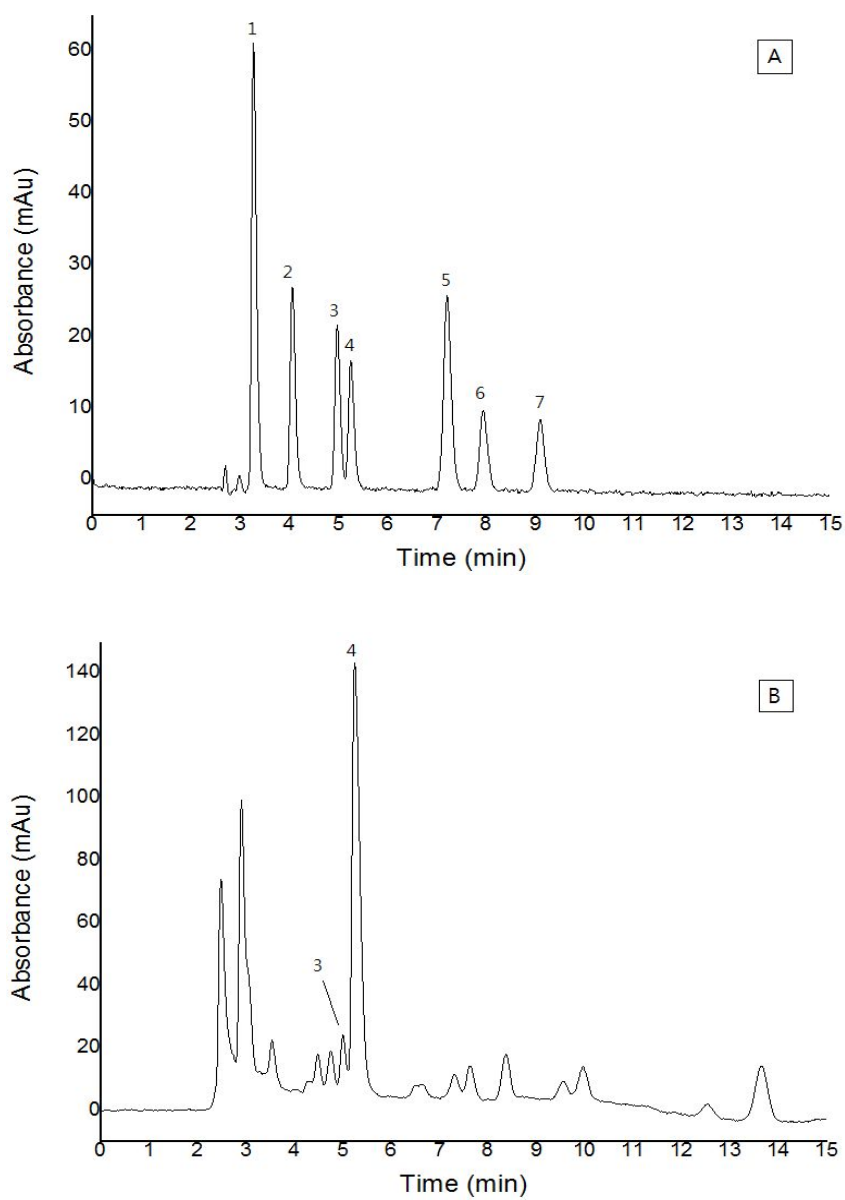


Fig. 5. The HPLC chromatograms of the organic acid standards (A) and vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybean (B).

1 : Tartaric acid, 2 : L-malic acid, 3 : Lactic acid, 4 : Acetic acid,
 5 : Citric acid, 6 : Succinic acid, 7 : D-malic acid

Table 5. Changes of organic acids of vinegar brewed from *Monascus* - fermented soybean during acetic acid fermentation (mg/mL)

Organic acid	Fermentation (days)				
	0	7	14	21	28
acetic acid	9.50±0.11 ^a	29.30±1.07 ^b	38.99±0.56 ^d	55.94±1.57 ^e	34.93±0.03 ^c
lactic acid	0.72±0.07 ^a	1.35±0.01 ^b	2.21±0.02 ^c	3.82±0.11 ^d	3.81±0.01 ^d

Each value is mean±SD(n=3).

Different letters in the same row indicate significant difference at the p<0.05

3. 유리 아미노산 함량

(1) 총 유리아미노산 함량 변화

초산 발효 기간에 따른 홍국 발효콩 식초의 총 유리아미노산 함량의 변화는 Fig. 6와 같다. 초산 발효 0일에 총 유리아미노산 함량 (mg/mL)은 1.22mg이고 7일에는 1.4mg로 약간 증가하다가 21일에는 4.55mg로 0일에 비해 약 3.7배 증가하였다. 이후 28일 이후에는 4.01mg로 감소하는 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 홍국발효콩 식초의 초산 발효 과정은 기질의 총 유리아미노산의 함량을 증가 시키는 것으로 평가 할 수 있다. 식초에 분포하는 아미노산의 함량은 식초의 맛과 품질에 영향을 준다. 아미노산의 생성은 발효에 사용된 원료에서 분해되어 생산되거나 일부 아미노산은 미생물의 발효에 의해 생합성 되기도 한다(61). 따라서 본 실험의 결과 역시 기질의 단백질 함량은 초산 발효와 미생물 작용에 따라 총 유리아미노산 함량으로 분해되어 나타난 결과로 설명할 수 있다.

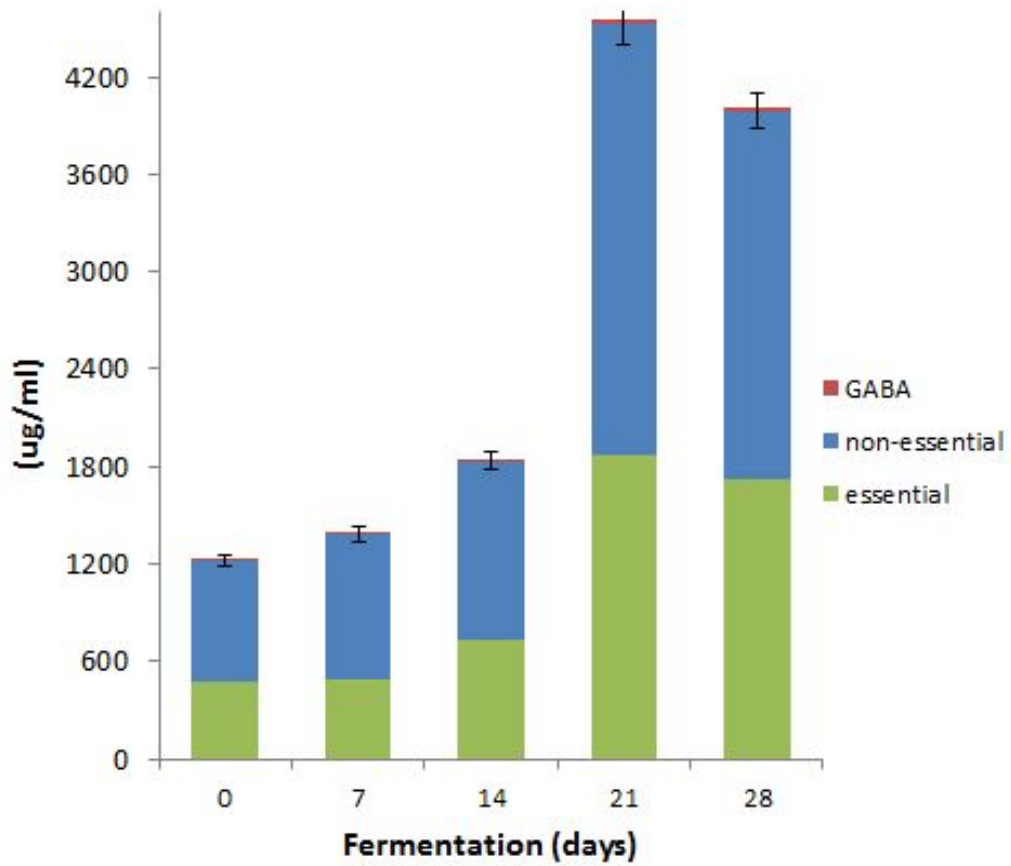


Fig. 6. Changes of total free amino acid of vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybean during acetic acid fermentation (mg/mL).

Each value represents the mean±SD (n = 3).

(2) 필수 아미노산 함량

홍국 발효콩으로 제조한 식초의 필수 아미노산 함량($\mu\text{g}/\text{mL}$)의 변화는 Fig. 7.와 같다. 주요 성분으로는 leucine, isoleucine, phenylalanine, valine, threonine 등이 함유되어 있고 methionine, tryptophane, lysine도 함유된 것으로 나타났다. Threonine은 0일에 $42.72 \pm 7.02 \mu\text{g}$ 이었으나 21일에는 $163.1 \pm 9.04 \mu\text{g}$ 로 3.8배 증가하였고, valine은 0일에 $85.03 \pm 8.05 \mu\text{g}$, 21일에는 $297.76 \pm 12.03 \mu\text{g}$ 으로 3.5배 증가하였다. Isoleucine은 $72.86 \pm 6.05 \mu\text{g}$ 에서 $263.43 \pm 14.01 \mu\text{g}$ 로 3.1배, leucine은 $127.91 \pm 11.01 \mu\text{g}$ 에서 $465 \pm 15.06 \mu\text{g}$ 으로 3.6배, phenylalanine은 $86.77 \pm 7.02 \mu\text{g}$ 에서 $337.11 \pm 13.03 \mu\text{g}$ 으로 3.8배, tryptophane은 $10.03 \pm 1.02 \mu\text{g}$ 에서 $46.23 \pm 4.01 \mu\text{g}$ 으로 4.6배 증가하였다. 특히 lysine의 함량은 0일에 $33.56 \pm 1.04 \mu\text{g}$ 이었으나 21일에는 $234.03 \pm 12.03 \mu\text{g}$ 으로 6.9배 증가하였고 28일 이후에는 감소하는 것으로 나타났다. Histidine은 0일에 $27.58 \pm 0.01 \mu\text{g}$ 이었으나 21일에는 $104.92 \pm 0.49 \mu\text{g}$ 로 3.80배 증가하였고 arginine은 0일에 $67.62 \pm 0.01 \mu\text{g}$ 에서 21일에 $256.57 \pm 0.33 \mu\text{g}$ 로 3.79배 증가하였다. Methionine 함량도 0일에는 $19.25 \pm 2.02 \mu\text{g}$ 이었으나 21일에는 $61.52 \pm 5.01 \mu\text{g}$ 로 3배나 증가하였다. Lysine은 아동기 성장과 뼈의 발달을 돕는 필수 아미노산이며(62), 유황함유 아미노산인 methionine과 결합하여 L-carnitine을 합성해 지방분해와 에너지 생성에 관여하여 지방간을 예방하는 것으로 알려졌다(63). 또한 methionine과 lysine은 조리과정 중 파괴되거나 구조적 변화가 생겨 단백질 영양가 감소 및 단백질 소화율에 영향을 미치는데(64,65), 본 연구에서는 초산 발효가 진행될수록 감소하는 것이 아니라 증가하였다. 이는 초산 발효가 조리 시 손상되기 쉬운 필수아미노산 함량의 강화에 좋은 영향을 주는 것으로 나타났다.

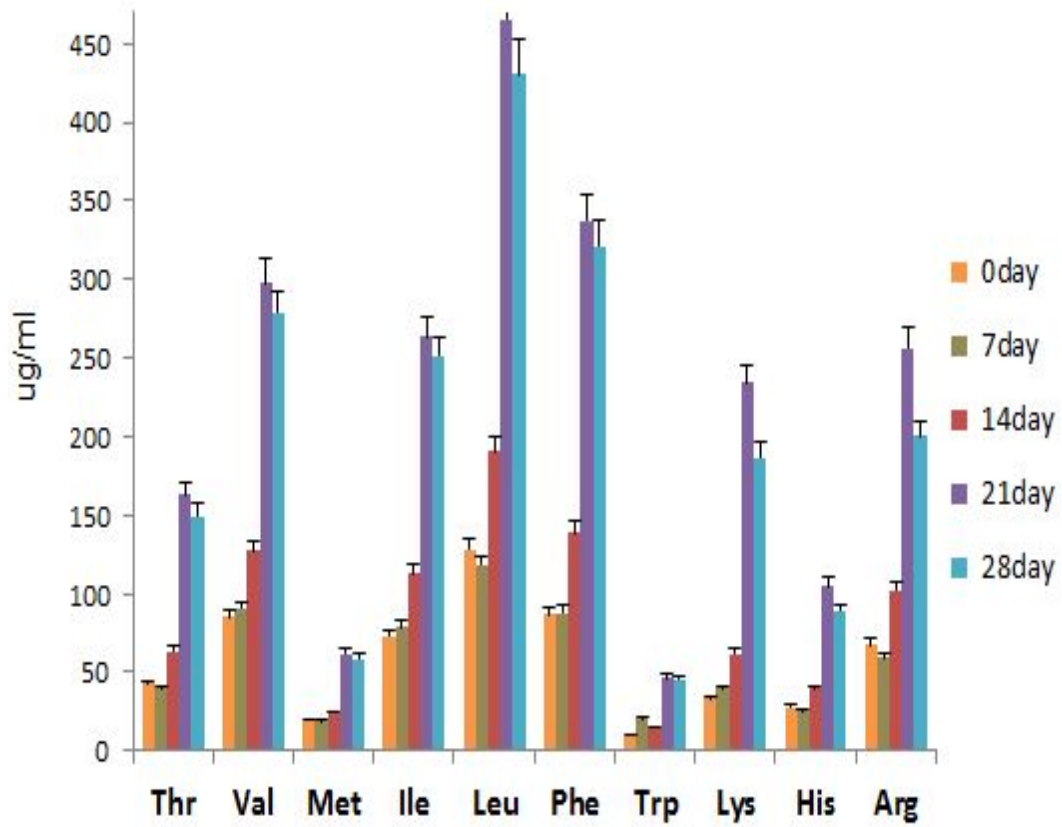


Fig. 7. Changes of essential amino acid of vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybean during acetic acid fermentation (ug/mL). Each value represents the mean±SD (n = 3).

(3) 비 필수 아미노산 함량

홍국 발효 콩으로 제조한 식초의 총 유리아미노산 함량 중 비필수 아미노산 함량($\mu\text{g}/\text{mL}$)의 변화는 Table 6.과 같다. 주요 아미노산의 종류는 glutamic acid, alanine, aspartic acid, serine 등으로 분석되었다. cystine은 0일에는 $12.69 \pm 1.04 \mu\text{g}$ 에서 21일에 1.51배 증가하였고 asparagine은 $15.02 \pm 2.01 \mu\text{g}$ 에서 $54.51 \pm 3.05 \mu\text{g}$ 로 3.63배 증가하였으며 serine은 $63.85 \pm 2.01 \mu\text{g}$ 에서 $232.21 \pm 11.10 \mu\text{g}$ 로 3.64배 증가하였다. Glutamine은 $44.66 \pm 2.01 \mu\text{g}$ 에서 $59.06 \pm 2.16 \mu\text{g}$ 로 1.32배 증가하였다. 그 밖에 alanine은 $125.3 \pm 9.06 \mu\text{g}$ 에서 $439.74 \pm 13.35 \mu\text{g}$ 로 3.51배 증가하였고 proline은 $60.68 \pm 3.02 \mu\text{g}$ 에서 $199.69 \pm 11.36 \mu\text{g}$ 으로 3.27배 증가하였으며 cystein은 $3.76 \pm 0.08 \mu\text{g}$ 에서 $15.71 \pm 1.18 \mu\text{g}$ 로 4.17배 증가하였다. 특히 aspartic acid는 초기에 $56.16 \pm 3.02 \mu\text{g}$ 에서 $233.85 \pm 16.66 \mu\text{g}$ 로 약 4배 증가하였고 감칠맛을 내는 glutamic acid는 $192.60 \pm 15.06 \mu\text{g}$ 에서 $751.80 \pm 12.81 \mu\text{g}$ 로 약 3.9배 증가하였다. 이후 28일에는 전체적으로 비슷하거나 감소하였다. 가장 많이 증가한 비필수 아미노산은 glycine으로 0일에는 $17.23 \mu\text{g}$ 이었으나 21일에는 $95.49 \mu\text{g}$ 로 5.5배 증가하였다. Glycine은 creatine을 공급함으로써 근육의 퇴화를 지연시키고 핵산, 담즙, 다른 비필수 아미노산의 합성에 필수적인 아미노산으로 알려진다(66). 발효 식품의 선행연구의 경우, 김치 발효 숙성에서 aspartic acid, glutamic acid, serine 등의 함량은 초기에는 감소하다 그 후 점진적으로 증가한다고 보고하여(67) 본 실험과 유사한 경향을 보였다. 그러나 누룩 및 조효소제를 이용하여 발효한 현미식초에서는 비 필수 아미노산 중 glutamic acid와 alanine의 함량은 초산 발효 중에 4~30% 감소한다고 하여 본 실험 결과와는 다소 상이한 결과를 보여 주었다(68). 이 같은 결과는 기질의 성분 및 발효조건의 차이 때문으로 설명할 수 있다.

Table 6. Changes of non-essential amino acids ($\mu\text{g/mL}$) of vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybean during acetic acid fermentation

Amino acids	Fermentation (days)				
	0	7	14	21	28
cystine	12.69 \pm 0.04 ^b	11.79 \pm 0.01 ^a	15.82 \pm 0.11 ^c	19.27 \pm 0.70 ^e	17.5 \pm 0.10 ^d
aspartic acid	56.16 \pm 0.02 ^a	93.5 \pm 0.05 ^c	88.38 \pm 0.08 ^b	233.85 \pm 0.66 ^e	211.56 \pm 0.68 ^d
glutamic acid	192.6 \pm 0.60 ^a	221.22 \pm 0.61 ^b	301.39 \pm 0.4 ^c	751.8 \pm 0.81 ^e	703.21 \pm 0.23 ^d
asparagine	15.02 \pm 0.01 ^a	20.31 \pm 0.02 ^b	23.93 \pm 0.75 ^c	54.51 \pm 0.50 ^e	50.34 \pm 0.14 ^d
serine	63.85 \pm 0.01 ^a	65.89 \pm 0.01 ^b	94.55 \pm 0.77 ^c	232.21 \pm 0.10 ^e	200.78 \pm 0.12 ^d
glutamine	44.66 \pm 0.01 ^b	70.72 \pm 0.03 ^e	38.67 \pm 0.32 ^a	59.06 \pm 0.12 ^d	48.56 \pm 0.10 ^c
glycine	17.20 \pm 0.10 ^a	27.11 \pm 0.11 ^a	24.1 \pm 0.7 ^a	95.49 \pm 0.16 ^b	84.23 \pm 0.14 ^b
alanine	125.36 \pm 0.06 ^a	142.35 \pm 1 ^b	190.04 \pm 0.01 ^c	439.74 \pm 0.35 ^e	289.55 \pm 0.45 ^d
proline	60.68 \pm 0.02 ^a	98.27 \pm 0.03 ^b	98.90 \pm 0.1 ^c	198.53 \pm 0.36 ^e	185.98 \pm 0.39 ^d
tyrosine	51.84 \pm 0.06 ^b	50.87 \pm 0.02 ^a	75.59 \pm 0.59 ^c	199.69 \pm 0.31 ^e	180.65 \pm 0.13 ^d
cystein	3.76 \pm 0.01 ^a	5.9 \pm 0.25 ^b	7.56 \pm 0.06 ^c	15.71 \pm 0.18 ^e	7.89 \pm 0.24 ^d

Each value is mean \pm SD(n=3).

Different letters in the same row indicate significant difference at the $p < 0.05$.

(4) GABA 함량

발효식품에 주로 함유되어 있다고 알려진 γ -aminobutyric acid (GABA)는 중추신경계의 주된 억제성 신경전달물질로 작용하며 1980년대 중반부터 이용되어 2001년부터 널리 알려졌다(69). GABA는 비단백질구성 아미노산으로 신경전달 물질인 acetylcholine을 증가시킨다(70). 또한 GABA는 청소년기 두뇌활동을 도와 학습능력을 증진시켜주며 기억력 감퇴 현상에도 효과가 있다고 알려져 있으며 성인병 예방에도 도움이 되는 것으로 알려지며 최근 대장암 세포의 전이와 증식 억제에도 효과가 있는 것으로 보고되었다(71~73). GABA는 L-glutamic acid decarboxylase (GAD)에 의해 glutamic acid가 비가역적으로 탈탄산화되어 생성 전환된다(51).

홍국 발효콩으로 제조한 식초의 총 유리아미노산 함량 중 GABA의 변화는 Fig. 8.과 같다. 초산 발효 0일에는 5.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고 총산도 함량이 급증한 7일에는 11.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 약 2배 증가하였다. 14일에는 감소하다가 21일에는 21.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 0일에 비해 4배 이상 증가하였으며 이후에는 19.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 감소하였다. 이 같은 결과는 초산 발효가 GABA 생성에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 이해할 수 있다. 된장의 경우, GABA의 전구체인 glutamic acid가 숙성기간에 따라 유의적으로 감소하고 GABA함량은 증가하였다고 보고되었으나(74) 본 실험에서는 초산 발효가 진행됨에 따라 두 물질이 모두 증가한 것으로 나타났다. 생물의 GAD 활성은 김치의 발효과정과 같이 약산성 조건에서 GABA 생산량이 높아지는 반면 pH가 증가하면 transaminase에 의해 GABA는 succinic semi-aldehyde로 전환되어 GABA 함량이 감소하는 것으로 보고되었다(75). 이 같은 결과는 초산 발효와 같은 산성 기질의 pH 조건의 변화는 GABA의 생성량에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 평가할 수 있다.

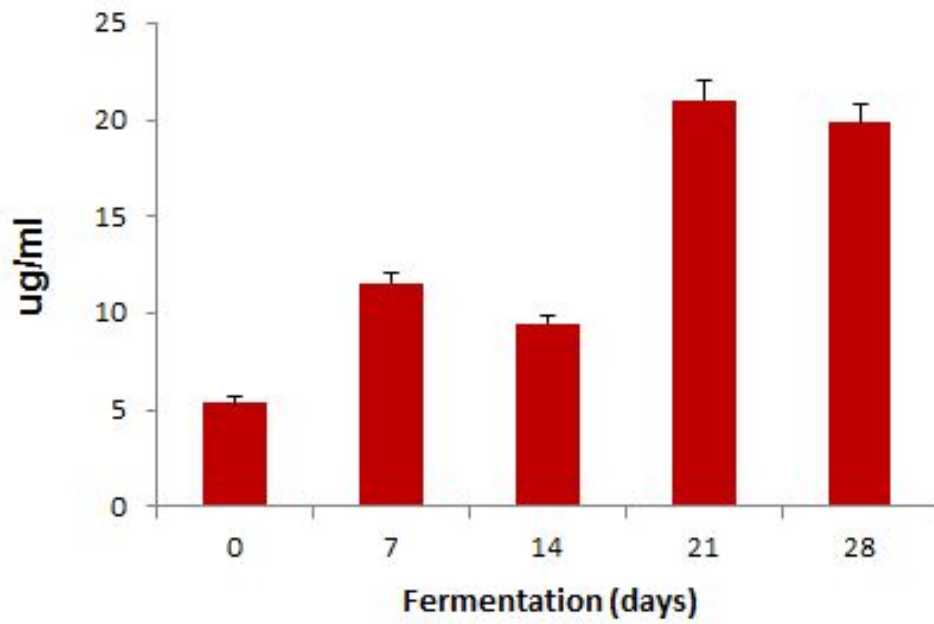
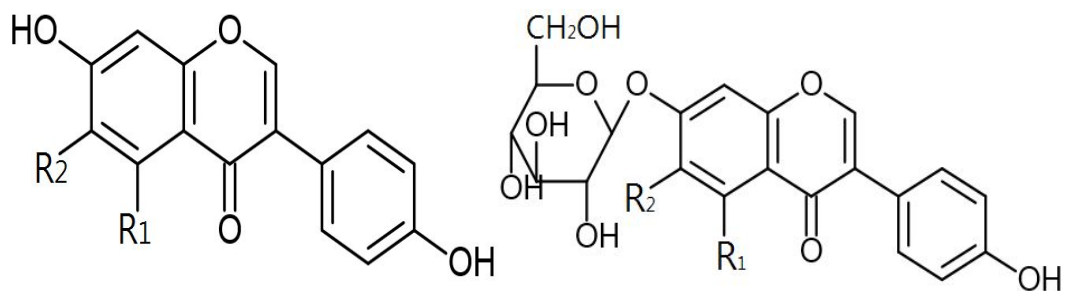


Fig. 8. Changes of GABA of vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybean during acetic acid fermentation.

Each value represents the mean \pm SD (n = 3).

4. Isoflavones 함량

콩의 생리활성 성분 중 하나인 isoflavones(Fig. 9.)은 발효가 진행되면서 배당체 (glycoside)형태인 genistin, daidzin, glycitin이 효소 및 미생물 대사에 의해 생체이용률이 높은 비배당체 (aglycone) 형태의 genistein, daidzein, glycitein으로 전환된다(76,77). 홍국 발효콩을 초산 발효시킨 식초 시료의 isoflavones 역시 비배당체형의 genistein, daidzein, glycitein이 주로 검출되었으며 그 결과는 Fig. 10. 와 Table 7.과 같다. Daidzein은 3.38~3.85 ug/mL 범위 내에서, glycitein은 0.37~0.40 ug/mL, genistein은 2.97~3.21 ug/mL의 범위로 측정되어 발효기간에 따른 농도의 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다 ($p>0.05$). 이 같은 결과는 원료성분인 서리태의 배당체형의 이소플라본이 홍국발효에 의해 이미 비배당체로 생물 전환되었기 때문에 (78,79) 초산 발효에 의한 영향은 관찰되지 않는 것으로 판단할 수 있다. 또한 식초의 극성 기질에서 소수성의 특성을 갖는 glycitein, genistein, 그리고 daidzein은 용해도가 낮기 때문에 초산 발효가 진행되어도 비배당체형 이소플라본의 농도에는 큰 영향이 없는 것으로 보고된 Kim 등(77)의 결과와 일치하는 것으로 보여진다. 또한 Table 7.과 같이 홍국 발효콩 식초에 함유된 이소플라본의 농도는 0일에는 6.79 ± 0.12 ug/mL, 21일에는 7.23 ± 0.04 mg/mL으로 daidzein과 genistein이 차지하는 비율은 전체의 87%에서 94%로 나타나 이들 화합물이 홍국 발효콩 식초의 주요 이소플라본인 것을 알 수 있다.



Daidzein R1=R2=H

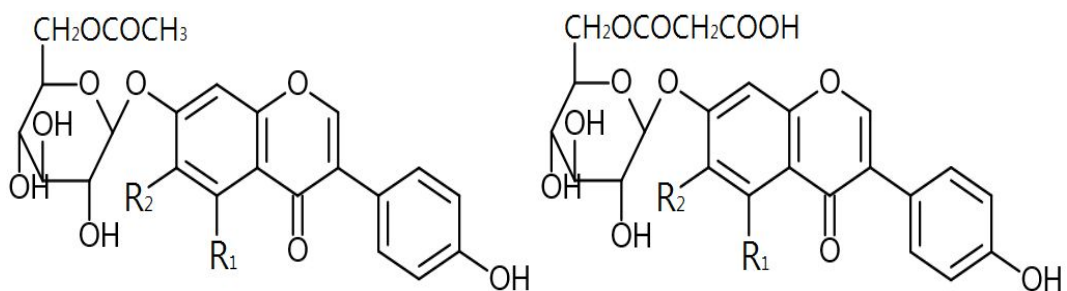
Daidzin R1=R2=H

Glycitein R1=H, R2=OCH₃

Glycitin R1=H, R2=OCH₃

Genistein R1=OH, R2=H

Genistin R1=OH, R2=H



Acetyldaidzein R1=R2=H

Malonyldaidzin R1=R2=H

Acetylglycitein R1=H, R2=OCH₃

Malonylglycitin R1=H, R2=OCH₃

Acetylgenistein R1=OH, R2=H

Malonylgenistin R1=OH, R2=H

Fig. 9. Chemical structure of isoflavones

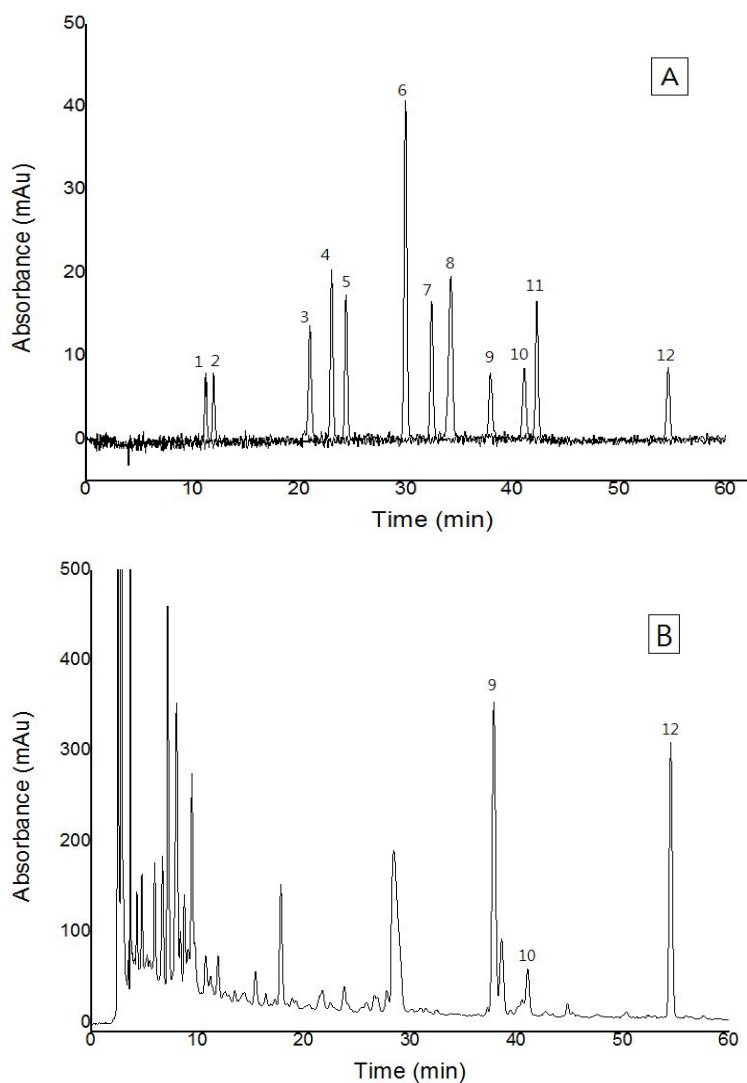


Fig. 10. The HPLC chromatograms of the 12 isoflavone standards (A) and vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybean (B).

1: daidzin, 2 : glycitin, 3 : genistin, 4 : malonyldaidzin, 5 : malonylglycitin, 6 : acetyldaidzin, 7 : acetylglycitin, 8 : malonylgenistin, 9 : daidzein, 10 : glycitein, 11 : acetylgenistin, 12 : genistein

Table 7. Changes of isoflavones of vinegar brewed from *Monascus* - fermented soybean during acetic acid fermentation

Isoflavone ($\mu\text{g/mL}$)	Fermentation (days)				
	0	7	14	21	28
Daidzein	3.38 \pm 0.06 ^a	3.61 \pm 0.06 ^{ab}	3.89 \pm 0.09 ^b	3.83 \pm 0.02 ^{ab}	3.85 \pm 0.08 ^{ab}
Glycitein	0.37 \pm 0.01 ^a	0.40 \pm 0.03 ^a	0.40 \pm 0.03 ^a	0.43 \pm 0.01 ^a	0.40 \pm 0.02 ^a
Genistein	3.04 \pm 0.05 ^a	3.52 \pm 0.16 ^b	3.53 \pm 0.15 ^{ab}	2.97 \pm 0.01 ^a	3.21 \pm 0.08 ^{ab}

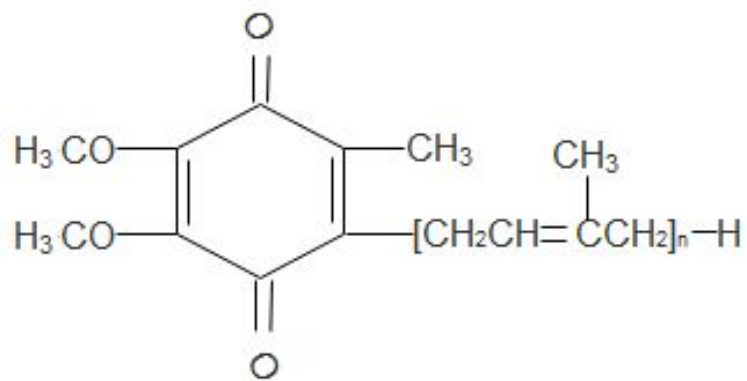
Each value represents the mean \pm SD (n = 3).

Different letters in the same column indicate significant difference at the $p < 0.05$.

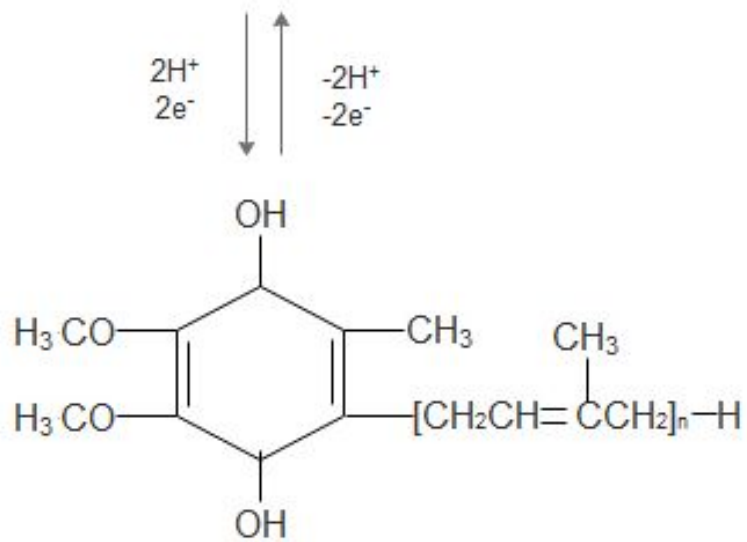
5. Ubiquinone 함량

Ubiquinone은 coenzyme Qs로 불리며 지용성의 퀴논화합물로 비타민과 유사한 물질로 “비타민 Q”라고도 불려진다(80). 유비퀴논은 미토콘드리아 내에서 ATP 생성에 필요한 전자와 프로톤 운반체로 작용하는 조효소 기능과 세포막을 안정화시켜 DNA, 단백질, 지질, 등의 산화적 손상을 막아주는 내인성 항산화제로 작용한다(81, 82). CoQ에는 Q6-Q10이 있으며 동물, 식물 등에 존재하고 사람에게는 CoQ10이, CoQ9은 쥐와 같은 서류동물에 존재한다. CoQ10의 숫자는 isoprene 단위 수를 의미하며 유비퀴논은 coenzyme Q의 산화형태이며 환원형은 유비퀴놀이(80, 83)(Fig. 11.).

홍국 발효 콩으로 제조한 식초의 총 유비퀴논의 양(CoQ9+CoQ10)은 Fig. 12.과 13.와 같이 나타났다. 초산 발효 0일에는 0.079 ± 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 이었고 7일에는 0.013 ± 0.002 $\mu\text{g/mL}$ 으로 약 6배 이상 감소하다가 21일 이후에는 0.276 ± 0.04 $\mu\text{g/mL}$ 로 발효 초기 수준의 3배 이상으로 나타났다. Fig. 13.에서와 같이 유비퀴논의 양이 최종적으로 증가한 것은 CoQ9의 함량이 CoQ10의 함량의 감소에 비해 더 많이 증가했기 때문이다. CoQ10의 비율을 보면 0일에는 45%로 CoQ9과 비슷하였으나 21일에는 8%로 감소하였다. 일반적으로, 초산균은 에탄올을 초산으로 산화시킨 후, 다시 초산을 이산화탄소와 물로 재산화시키는 두 단계의 산화작용에 관여한다(84). 따라서 본 실험에서 CoQ10의 농도가 감소한 것은 초산 발효 과정에서 초산균의 활성화에 의해 산화 분해된 결과로 추정할 수 있다. 반면 CoQ9은 발효 0일에는 55%였고 21일에는 91%까지 증가하여 유비퀴논 총량의 대부분을 차지하는 것으로 나타났다. 초산균은 ubiquinone system으로 CoQ9 system을 함유하고 있다(85). 따라서 기질의 초산 발효가 진행됨에 따라 CoQ9의 함량이 증가한 것은 초산균의 활성화에 따른 균체수의 증가와 관련될 것으로 추정된다.



Oxidized form of Coenzyme Q (Ubiquinone)



Reduced form of Coenzyme Q (Ubiquinol)

Fig. 11. Chemical structure of oxidized and reduced coenzyme Qs.

The number of isoprene units, n , varies between 6 and 10 in different species.

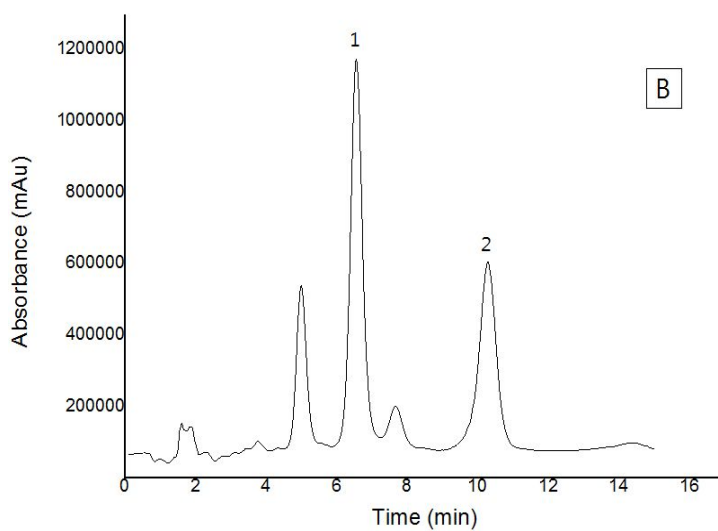
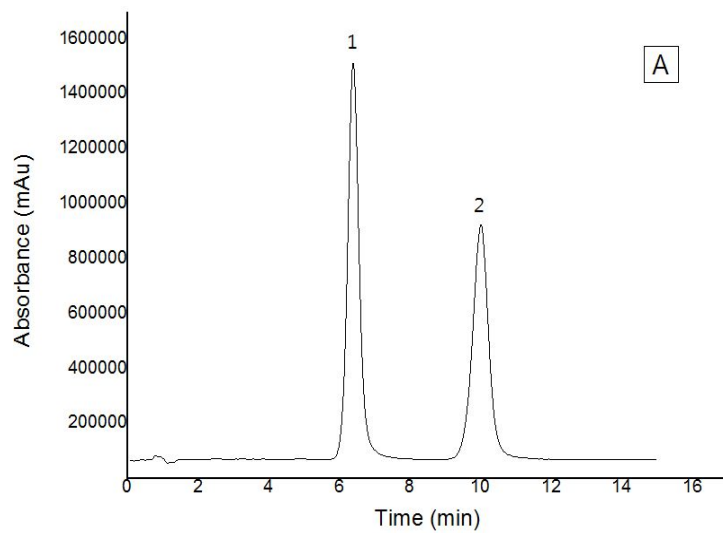


Fig. 12. The HPLC chromatograms of the ubiquinones (CoQ9+CoQ10) standards (A) and vinegar brewed from *Monascus*-Fermented soybean (B). 1 : CoQ9 , 2 : CoQ10

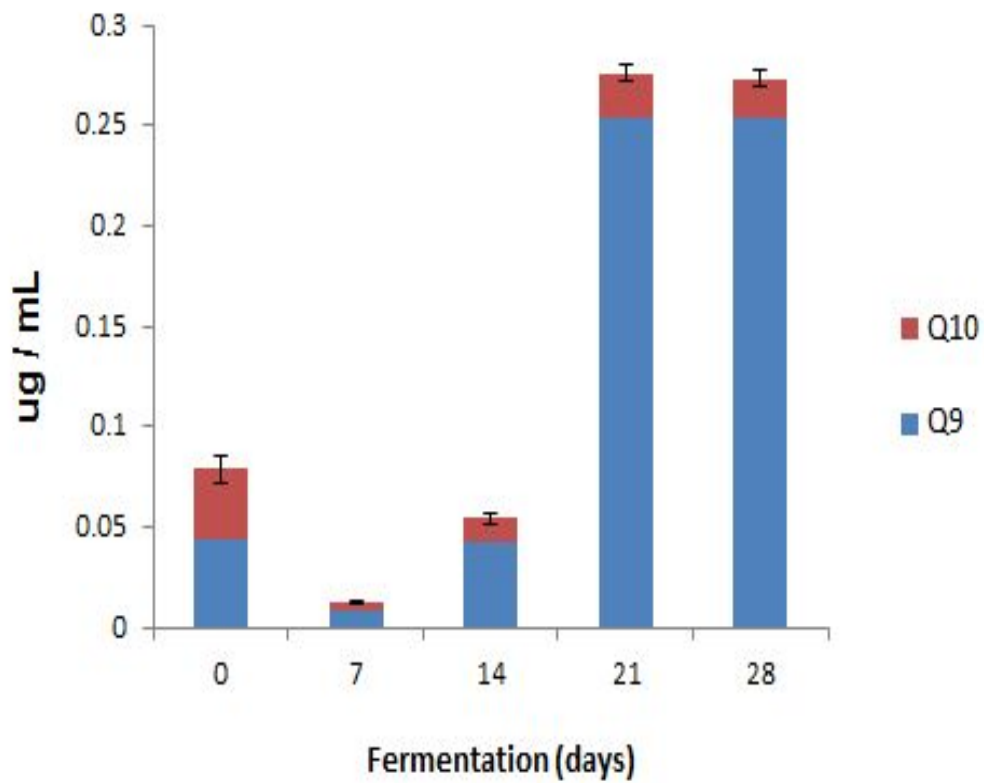


Fig. 13. Changes of ubiquinones (CoQ9+CoQ10) in vinegar from *Monascus*-fermented soybeans during acetic acid fermentation.

Each value represents the mean±SD (n = 3).

6. 총 폴리페놀 함량

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 의한 항산화 능력이 있어(86) 항암, 항균, 노화방지 및 심장질환을 예방하는 생리활성 물질로 알려져 있다(87, 88).

초산 발효 기간에 따른 홍국 발효콩 식초의 총 페놀 함량(mg gallic acid/mL)의 변화는 Fig. 14.와 같다. 초산 발효 0일에 총 페놀함량은 0.49 ± 0.03 mg 이었고 7일에는 0.62 ± 0.07 mg으로 약 1.2배 증가하였으며, 21일에는 0.97 ± 0.01 mg로 0일에 비해 약1.9배 증가했다가 28일에는 0.89 ± 0.01 mg로 감소하였다. 식초의 경우 초산 발효 과정에서 강력한 페놀 분해 및 변형으로 인해 총 폴리페놀 함량이 감소한다고 보고되었으나(89~91), 본 연구에서는 초산 발효가 진행될수록 총 폴리페놀 함량이 오히려 증가하였다. 이 같은 결과는 홍국발효 콩 식초에는 pH의 변화에 영향을 받지 않는 페놀의 종류가 더 많기 때문인 것으로 추정된다(92).

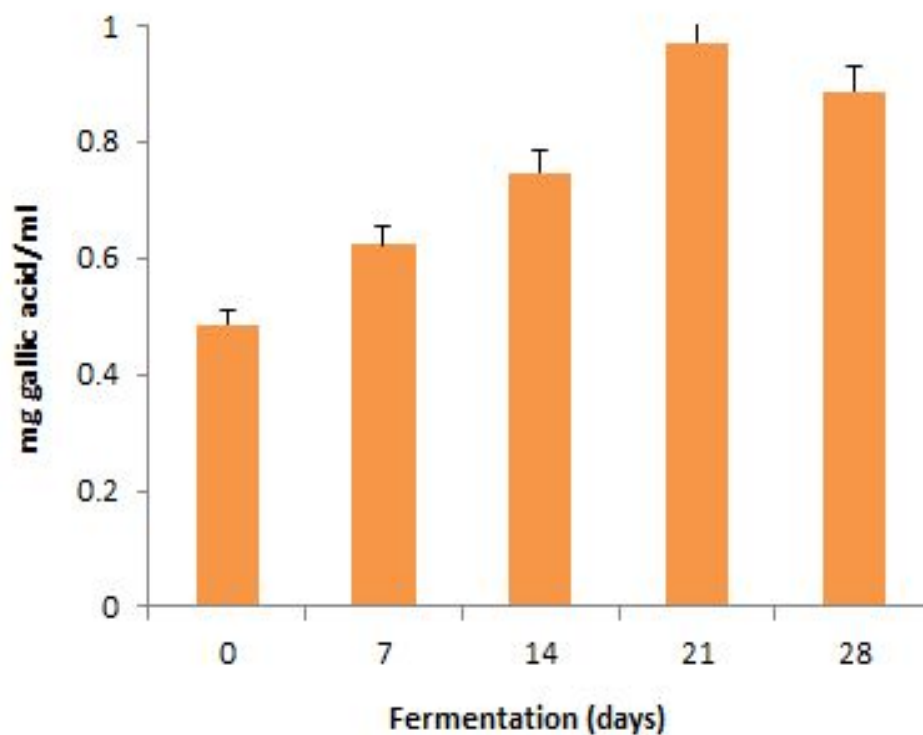


Fig. 14. Changes of total polyphenol compounds of vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybean during acetic acid fermentation.

Each value represents the mean \pm SD (n = 3).

7. 플라보노이드 함량

플라보노이드는 주로 anthocyanidins, flavonols, flavones, catechins, flavanones 등으로 구성되고 식물에 존재하는 플라보노이드는 항산화작용, 항염, 항균, 항바이러스, 면역증강, 지질 저하작용, 항알레르기 등 다양한 기능성 생리활성 효과를 갖는다고 보고되었다(93-95).

초산 발효 동안 홍국 발효콩 식초의 총 플라보노이드 함량(mg quercetin/mL)의 변화는 Fig. 15와 같이 나타났다. 초산 발효 0일에 총 플라보노이드 함량은 0.17 ± 0.01 mg이었고 7일에는 0.09 ± 0.04 mg으로 약 1.8배 감소하였다가 21일에는 0.30 ± 0.02 mg로 다시 약 1.9배 증가하였다. 식초의 총 폴리페놀 화합물 함량과 플라보노이드 함량 연구에서는 대체적으로 두 물질이 양의 관계로 증가 혹은 감소한다고 보고되어 왔다. Jo 등(93)에 따르면 고산도 배식초 제조 과정에서 초기 알코올 농도 조건에 따라 총 플라보노이드 함량은 1차 초산 발효에는 증감을 반복하다 2차 초산 발효시기에 유의적으로 증가하였다고 하였다. 또한 초산 발효에 의한 플라보이드의 변화에 대한 보고(96)에서, 양파식초를 제조할 때 양파의 처리조건을 달리하여 초산 발효를 하면 총 산도가 3%에 도달할 때 플라보노이드 함량이 감소하였고 이후 다시 증가하였다고 한다. 이 같은 결과는 본 실험의 결과와도 유사한 경향으로, 초산 발효 중의 기질의 종류, 기질의 전처리, 초기 발효조건 등이 플라보노이드 함량 변화에 영향을 미치는 것으로 평가할 수 있다.

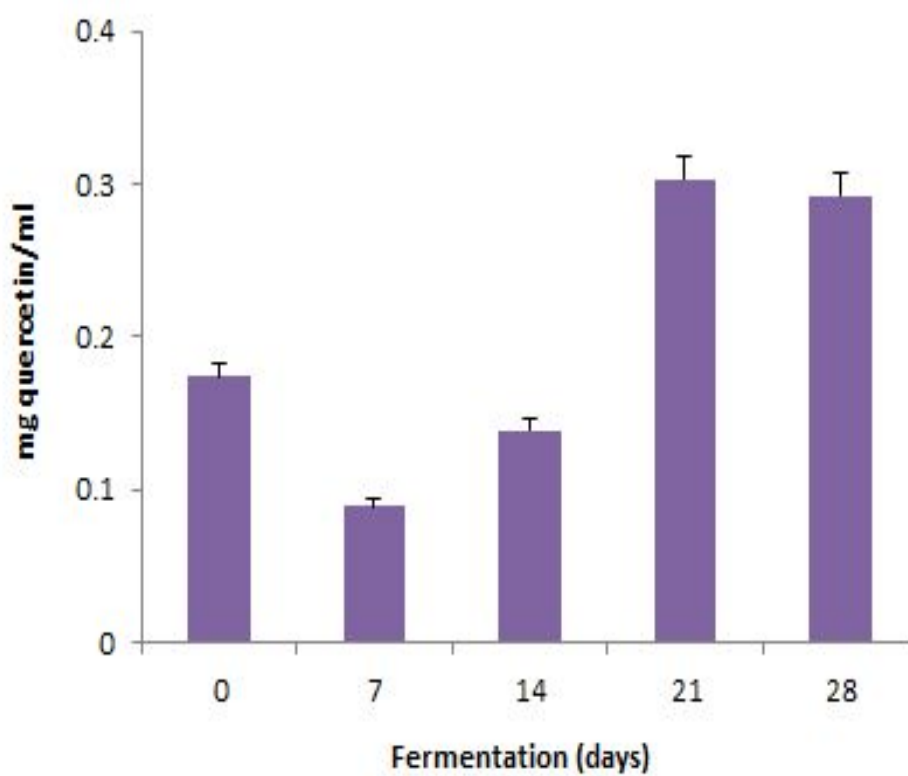


Fig. 15. Changes of total flavonoid of vinegar brewed from *Monascus*-fermented product during acetic acid fermentation.

Each value represents the mean \pm SD (n = 3).

8. 생리활성 측정

1) 항산화 활성

(1) DPPH radical 소거 활성

DPPH는 Free radical을 안정적으로 갖는 수용성 물질로 항산화제와 빠르게 반응해 전자를 내주어 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine으로 전환되어 색을 낸다. 홍국 발효 콩으로 제조한 식초의 DPPH radical 소거능은 mM trolox/mL로 표시하였고 Table 8.과 같다. 초산 발효 0일에 DPPH 소거능은 0.39 mM이고 7일에는 0.43 mM로 증가하다가 21일 이후에는 0.48 mM로 0일에 비해 약 1.2배 증가하였다.

(2) ABTS radical 소거 활성

ABTS radical 소거능은 mM trolox/mL로 표시하였고 홍국 발효 콩으로 제조한 식초의 ABTS 소거능은 Table 8.과 같다. 초산 발효 0일에 0.18 mM에서 7일에는 0.88 mM으로 유의적인 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 이후 21일에는 0.95 mM으로 0일에 비해 약 1.1배 증가하였다. 그러나 21일 이후에는 유의적인 변화가 없거나 감소하는 것으로 나타났다.

(3) FRAP (Ferric reducing antioxidant power) 측정

FRAP 측정은 시료의 특정 성분이 ferric-tripyridyltriazine (Fe^{III}-TPTZ)를 ferrous - tripyridyl triazine (Fe^{II}-TPTZ)로 환원시키는 능력을 측정하여 항산화 활성을 평가하는 방법이다. 홍국 발효 콩으로 제조한 식초의 FRAP 분석 결과는 mM trolox/mL로 제시하였다 (Table 8). 시료의 초산 발효 0일에는 0.44 mM으로 측정되었으나 7일에는 1.08 mM으로 약 1.3배 증가하다가 21일에는 2.24 mM로 나타나 0일에 비해 약 2.8배 증가하였다.

그 이후에는 오히려 1.55 mM로 다시 감소하는 것으로 나타나 초산 발효의 20일 경에서 가장 환원력의 활성이 높은 것으로 측정되었다.

Table 8. Changes of antioxidant activity (mM trolox/mL) of vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybean during acetic acid fermentation

Fermentation (days)	DPPH	ABTS	FRAP
0	0.39±0.03 ^a	0.86±0.01 ^a	0.78±0.01 ^a
7	0.43±0.02 ^b	0.88±0.02 ^b	1.08±0.00 ^b
14	0.47±0.01 ^c	0.93±0.01 ^d	1.38±0.00 ^c
21	0.48±0.01 ^c	0.95±0.00 ^e	2.24±0.01 ^e
28	0.48±0.01 ^c	0.91±0.01 ^c	1.55±0.02 ^d

Each value represents the mean±SD (n = 3).

Different letters in the same column indicate significant difference at the p<0.05.

전체적으로 기질의 평균 항산화 능력은 0일의 0.68 ± 0.01 mM trolox에 비해 21일에 1.22 ± 0.01 mM trolox로 1.7배 증가하였는데 이는 천연물에서 얻어지는 강한 항산화 효과가 있는 폴리페놀, 플라보노이드 화합물이(97) 초산 발효기간 동안 증가하였기 때문이다. Kim 등은(98) 식초의 항산화활성에 관여하는 주요 물질을 폴리페놀 및 플라보노이드 성분이라고 보고했다. 뿐만 아니라 Pyo 등(99)에 따르면 식초 기질에 다양하게 존재하는 초산 등의 유기산 화합물도 항산화 활성에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보고하여 식초기질의 항산화활성은 이들 여러 화합물들이 복합적으로 작용한 결과로 평가할 수 있다. 본 실험 결과 역시 총 폴리페놀, 플라보노이드 성분과 함께 유기산, 아미노산, 유비퀴논 등의 생리활성 성분이 초산 발효기간 동안 상대적으로 증가하였기 때문에 시료의 항산화 활성의 결과는 이들 화합물간의 상호작용의 결과로 추정할 수 있다. 또한 Table 8.과 같이 식초시료의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능에 비해 ABTS 라디칼 소거능이 2배 이상 높은 것으로 나타났는데, 이 같은 결과는 홍국발효 콩 함유 현미 식초의 ABTS 라디칼 소거활성이 DPPH 라디칼 소거활성보다 높았다는 Pyo 등의 (99) 보고와도 일치한다. 이것은 자유 라디칼인 DPPH와 양이온 라디칼인 ABTS와 반응하는 시료 내의 항산화 물질의 종류가 다르기 때문으로 설명할 수 있다. 본 실험에서 FRAP 방법 또한 ABTS 라디칼 소거활성에 비해 최대 2 배의 강한 항산화효과를 보여 주었다. 이는 홍국발효 콩 식초의 환원력이 라디칼 소거활성 측면보다 더 우수하게 작용한 결과로 해석되어진다.

2) Xanthine Oxidase (XO) 저해 활성

Xanthine oxidase는 purine 대사에 관여하는 효소로 hypoxanthine을 xanthine로 전환시키고 분자상의 산소를 전자수용체로 이용해 uric acid로 산화하는 반응을 촉매 하는 효소이다. Uric acid가 혈장 내 증가하면 요산염이 관절에 축적되어 통증을 동반하는 통풍을 일으킨다(100). 천연물 시료에 함유된 XO 저해물질의 대부분은 약초, 한약재 등에 함유된 총 페놀함량과 플라보노이드 물질이 그 원인 물질로 보고되어 왔다(101-103). 특히 차류에 함유된 플라보노이드 화합물 중에서 gallolyl기를 함유한 flavonoid 화합물과 polyphenol 화합물이 xanthine oxidase를 경쟁적으로 저해한다는 연구가 보고된 바 있다(104). 최근에 Lin 등(41)은 자가 제조 식초의 XO 저해활성을 확인함과 동시에 관련 물질로써 Maillard 반응 중간물질인 5-hydroxy methyl-2-furfural(5-HMF)와 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline - 3-carboxylic acid(MTCA)를 동정하여 폴리페놀 화합물이 아닌 물질에서도 XO 저해활성 존재를 규명하였다. 현재 고요산혈증과 통풍을 치료하기 위해 유일하게 사용하는 allopurinol은 간과 신장독성의 문제로(105) 논란이 제기되지만 아직까지 적절한 대체제는 없는 실정이다.

초산 발효 기간에 따른 홍국 발효콩 식초의 XO 저해 활성은 Fig. 16.과 같이 나타났다. 홍국 발효콩 식초를 80% 에탄올로 추출한 시료의 XO 저해율은 발효 0일에 50% 이하로 미약하였으나 초산 발효가 진행될수록 증가하여 21일에는 95.3%까지 도달해 1 mM allopurinol의 XO 억제 활성과 비슷한 수준으로 측정되었다. 이와 같은 시료의 XO 저해 작용은 Fig. 17.과 같이 시료의 농도와 의존적으로 그 활성효과를 보여 주어 시료의 농도가 증가할수록 저해율이 증대하는 것으로 나타났다. 일찍이 통풍질환의 민간요법의 치료제로 천연 발효 식초를 사용하였다는 중국의 사례에 비추어 보면 본 실험의 결과는 어느 정도 그 맥락이 상통하는 것으로 생각된다. 그러나 식초

시료 내의 XO 저해물질의 해당 화합물에 대한 규명은 향후 추가적인 연구를 통해 밝혀져야 할 것이다.

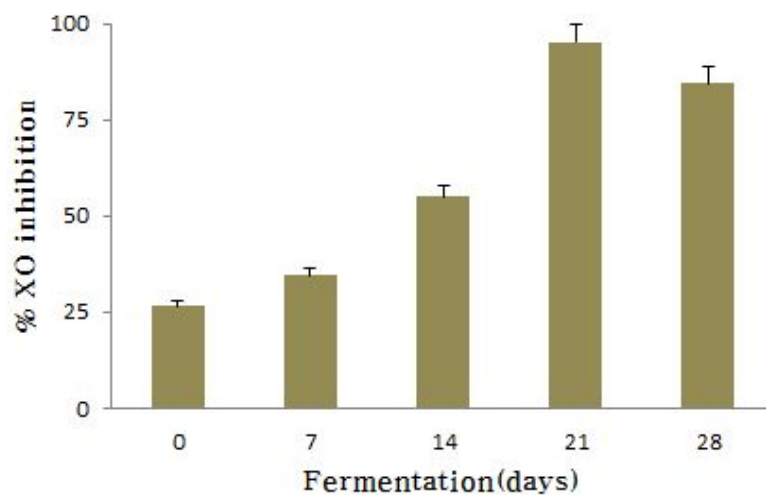


Fig. 16. Changes of xanthine oxidase inhibitory activity of vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybeans during acetic acid fermentation. Each value represents the mean±SD (n = 3).

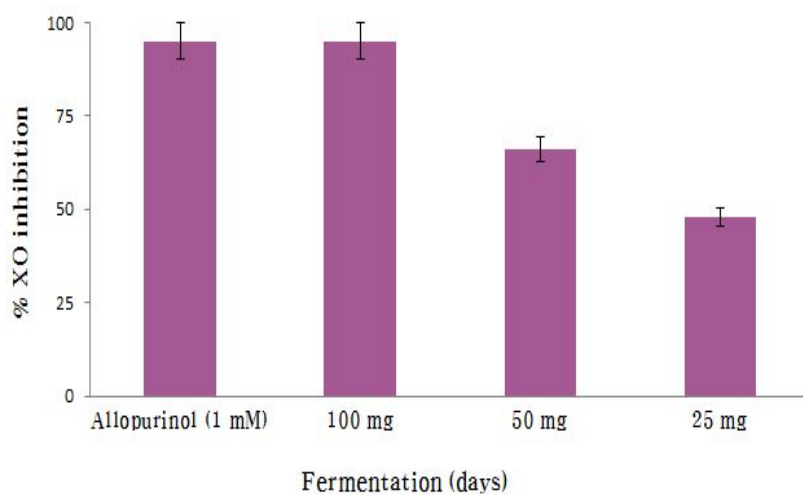


Fig. 17. Comparison of xanthine oxidase inhibitory activity of soy vinegar extracts by their concentration levels.

Each value represents the mean±SD (n = 3).

9. 생리활성 성분과 항산화 활성 및 xanthine oxidase 저해활성과의 상관관계

홍국발효 콩 식초에 함유된 각 생리활성 성분과 항산화활성 및 XO 저해활성 간의 상관계수는 Table 9.와 같이 나타났다. 항산화 활성의 경우, 총 폴리페놀 함량이 $R^2=0.9865$ 로 매우 높은 상관성을 나타내었으며, 유기산 함량과 유리아미노산 함량 역시 각각 $R^2=0.9410$ 과 $R^2=0.9196$ 으로 산출되어 이들 물질 역시 식초 시료의 항산화 활성과 밀접한 상관관계를 보여 주었다. GABA, 플라보노이드, 유비퀴논 함량 등은 폴리페놀이나 유리 아미노산보다 낮은 상관계수를 나타내었으나 모두 $R^2=0.61$ 이상의 비교적 높은 정의 상관성을 나타내어 식초시료의 항산화 활성에 이들 성분도 관여하였을 것으로 예측할 수 있다. 또한 XO 저해활성과 가장 높은 상관성을 보인 성분은 유리아미노산으로 상관계수 $R^2=0.9555$ 로 나타났으며, 총 폴리페놀 함량 역시 $R^2=0.9376$ 로 높은 상관성을 보여 주었다. 유기산 함량 > 유비퀴논 함량 > GABA > 플라보노이드 함량 순으로 이들 성분 역시 XO 저해활성에 $R^2=0.75$ 이상의 비교적 높은 정의 상관성을 보여 주며 이들 물질도 식초 시료의 XO 저해활성에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다. 그러나 이소플라본의 비배당체 성분 (daidzein, glycitein, genistein)의 총 농도는 시료의 항산화 활성과의 상관계수가 $R^2=0.0674$ 로 나타났으며, XO 저해활성과는 $R^2=0.0174$ 로 나타나서 이들 물질이 식초 시료의 생리활성에 미치는 영향은 매우 낮은 것으로 평가되었다. Samad 등(106)은 최근에 나쁜 생활습관으로 인해 야기될 수 있는 대사성 질환을 예방하기 위한 가장 좋은 방법은 하루에 15 mL의(acetic acid 750 mg) 식초를 매일 마시는 것이라 하여 식초의 예방적 효능을 시사한 바 있다. 그러나 통풍 등과 같은 관절염 등의 염증성 질환과 식초와의 생리적 기전은 아직 분명하지 않다. 따라서 홍국발효 콩 식초에 함유되어 있는 이들 생리활성 물질 들이 항산화 활성 및 XO 저해활성에

미치는 *in vivo* 기전은 향후 추가적인 연구를 통해 밝혀져야 할 것이다.

Table 9. Linear regression of the bioactive components and antioxidant and anti-xanthine oxidase activities of soy vinegar

Bioactive components	$Y = ax + b$					
	Antioxidant activity			Anti-xanthine oxidase		
	<i>a</i>	<i>b</i>	R^2	<i>a</i>	<i>b</i>	R^2
Total polyphenols	0.8693	-0.0776	0.9865	0.0062	0.3961	0.9376
Flavonoids	0.2983	-0.0953	0.6103	0.0024	0.0524	0.7512
Organic acids	85.493	-41.999	0.9410	0.5934	5.4332	0.8459
Free amino acids	6347.1	-3497	0.9196	47.362	-142.95	0.9555
GABA	26.482	-12.143	0.8772	0.1863	2.4208	0.8106
Isoflavone aglycones	0.4868	6.9014	0.0674	0.0018	7.2509	0.0174
Ubiquinones	0.4183	-0.2734	0.7054	0.0033	-0.0615	0.8193

IV. 결론

홍국 발효콩을 기질로 하여 식초를 제조하는 초산 발효 동안 기질의 생리활성 성분과 항산화 활성 및 XO 저해활성에 미치는 영향을 측정한 결과는 다음과 같이 나타났다.

1. 기질의 총 적정산도 (%) 와 pH는 발효 20일 이후에 각각 5.87%와 3.0로 나타나 일반 식초류의 산도 범위내로 측정되었다.
2. 홍국 발효콩 식초에 함유되어 있는 주요 유기산 함량은 HPLC로 분석하였으며, 발효 20일 이후에 acetic acid 55.94 mg/mL와 lactic acid 3.82 mg/mL로 측정되어 초산 발효 전에 비해 각각 5.8배와 5.3배 증가하였다.
3. 식초 기질에 함유된 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 역시 초산 발효가 진행됨에 따라 각각 발효 전에 비해 각각 1.98배 (0.97 mg gallic acid equ./mL)와 1.76배 (0.30 mg quercetin equ./mL) 증가하는 것으로 나타났다.
4. 유리 아미노산 함량의 변화는 초산 발효 20일 후에 약 3.7배 증가한 4.55 mg/mL로 측정되었으며, 이 중에 필수아미노산 함유율은 45.16 Mol%로 나타났다. 특히 leucine의 함량은 10.07 Mol%로 가장 높았으며 phenylalanine > valine > isoleucine > arginine의 순으로 함유되었다.

5. GABA의 함량은 발효 전에 비해 발효 20일 이후에 4배 이상 증가하여 (21.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 초산 발효가 GABA 증대에 유의적인 영향을 ($p < 0.05$) 미치는 것으로 나타났다.
6. 홍국 발효콩 식초에 함유된 이소플라본의 종류는 (HPLC-UV) 비배당체 형의 daidzein, glycitein, genistein으로 확인되었으며, 초산 발효에 따른 농도의 유의적인 차이는 나타나지 않았다 ($p > 0.05$). 가장 많이 함유된 daidzein 과 genistein은 각각 3.38~3.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 2.97~3.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되어 전체 함량의 87% 이상을 차지하였다.
7. 식초기질의 유비퀴논 (CoQ9 + CoQ10) 함량에 미치는 초산 발효의 영향은, 발효 전의 0.079 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 20일 발효 후에 0.276 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 3배 이상 증가 하였다. 특히 CoQ9의 함량은 5.8배 증가하였으나, CoQ10의 함량은 오히려 감소하여 초산 발효가 기질의 CoQ9 증가에 영향을 미친 것으로 나타났다.
8. 홍국발효콩 식초의 항산화 활성은 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능 측정과 함께 환원력 분석의 FRAP을 적용하였다. 세 가지 측정방법을 통한 시료의 평균 항산화 활성은 발효 전에 비해 1.74배 증가하여 1.22 mM trolox/mL로 나타났다.
9. 식초의 80% ethanol 추출물에 대한 XO 저해활성은 초산 발효가 진행됨에 따라 증가하였으며 발효 20일 이후에 95.3%의 저해활성을 나타내어 1mM allopurinol과 비슷한 수준의 활성을 나타내었다. 이 같은 시료의 XO 저해 활성은 농도 의존적인 경향으로 나타났다.

10. 홍국발효 콩 식초의 평균 항산화 활성은 총 폴리페놀 ($R^2=0.9865$) 과 유리 아미노산 ($R^2=0.9196$) 함량과 높은 상관도를 나타내었으며, XO 저해활성은 유리아미노산 ($R^2=0.9555$) 과 총 폴리페놀 ($R^2=0.9376$) 함량과 각각 높은 정의 상관계수를 나타내어 이들 물질이 시료의 생리활성에 밀접한 영향을 미친 주요 성분들로 평가되었다.

참 고 문 헌

1. Choi CS, Jeon CP. 2009. Red yeast rice industry and green growth. *Food Ind Nutr* 14: 25-32.
2. Ainsworth GC, Sparrowr FK, Sassman AS. 1973. *The fungi*. Academic press New York p 35.
3. Su YC. 1975. Properties of *Monascus anka* and its utilization. *J Ferment Assoc* 33: 28-34.
4. Hwang J, Hseu TH. 1980. Specificity of the acid protease from *Monascus kaoliang* towards the B-chain of oxidized insulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Enzymol* 614: 607-612.
5. Watanabe T, Yamamoto A, Nagai S, Terabe S. 1997. Separation and determination of *Monascus* yellow pigments for food by micellar electrokinetic chromatography. *Anal Sci* 13: 571-575.
6. Friedrich J, Zuzek M, Bencina M, Cimerman A, Strancar A, Radez I. 1995. High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolic acid in fermentation broths. *J Chromatogr A* 704: 363-367.

7. Manzoni M, Rollini M. 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 555-564.
8. Morovjan G, Szakacs G, Fekete J. 1997. Monitoring of selected metabolites and biotransformation products from fermentation broths by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 763: 165-172.
9. Strode JTB, Taylor LT, Howard AL, Ip D. 1999. Feasibility of lovastatin analysis by packed column supercritical fluid chromatography with ultraviolet detection. *J Pharm Biomed Anal* 20: 137-143.
10. Endo A. 1985. Compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase. *J Med Chem* 28 : 401-405.
11. Kang SA, Kwoun SJ, Choi YS, Lim Y, Park DK. 2005. The Effects of Monacolin-Inoculated Rice Embryo on the Body Fat and Serum Lipid Profiles of Obese Elementary School Students. *Korean J Community Nutr* 10: 565-573.

12. Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. 1976. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot* 29: 1346-1348.
13. Keisuke T, Tomio I, Nobukazu T, Hiroshi O, Shouichi T, Yasue N. 1992. Extraction of hypertensive substance from wheat beni-koji. *J Japanese Soc Food Sci Technol* 39: 913-918.
14. Patakova P. 2005. Red yeast rice. In: McGraw-Hill yearbook of science and technology. McGraw-Hill New York. 286-288.
15. Liao HF, Chen YJ, Yang YC. 2005. A novel polysaccharide of black soybean promotes myelopoiesis and reconstitutes bone marrow after 5-fluorouracil- and irradiation-induced myelosuppression. *Life Sci* 77: 400-413.
16. Shin HC, Sung HS, Lee YS, Sohn HS. 2001. Nutritional adequacy and beneficial effects of soy formula. *Korea Soyb Dig* 18: 10-32.
17. Pyo YH, Lee TC. 2007. The Potential Antioxidant Capacity and Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity of *Monascus* Fermented Soybean Extracts: Evaluation of *Monascus*-Fermented Soybean Extracts as Multifunctional Food Additives. *J food Sci* 72: S218-S223.

18. Lee SI, Kim SD, Lee YK, Kim MJ, Lee I, Choi J, Suh JW. 2013. Dietary effects of black bean fermented by *Monascus pilosus* on body weight, serum lipid profiles and activities of hepatic antioxidative enzymes in mice fed high fat diets. *Korean J Nutr* 46: 5-14.
19. Jeon CP, Lee JB, Choi CS, Kwon GS. 2011. Biological activities of ethanol extracts from *Monascus*-fermented Chinese yam. *J Life Sci* 21: 1142-1148.
20. Jo Y, Park Y, Lee HG, Lee HJ, Jeong YJ, Yeo SH, Kwon JH. 2015. Determination of Quality Index Components in High-Acidity Cider Vinegar Produced by Two-Stage Fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 47: 431-437.
21. Hong SM, Moon HS, Lee JH, Lee HI, Jeong JH, Lee MK, Seo KI. 2012. Development of functional vinegar by using cucumbers. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 927-935.
22. Kwon SH, Jeong EJ, Lee GD, Jeong YJ. 2000. Preparation method of fruit vinegars by two stage fermentation and beverages including vinegar. *Food Ind Nutr* 5: 18-24.

23. Jang SY, Jeong YJ. 2005. Effect of lactate and corn steep liquor on the production of bacterial cellulose by *Gluconobacter perimmonis* KJ145T. *Food Sci Biotechnol* 14: 561-565.
24. Horiuchi J, Kanno T, Kobayashi M. 2000. Effective onion vinegar production by two-step fermentation system. *J Biosci Bioeng* 90: 289-293.
25. Kim KO, Kim SM, Kim SM, Kim DY, Jo DJ, Yeo SH, Jeong YJ, Kwon JH. 2013. Physicochemical properties of commercial fruit vinegars with different fermentation methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 736-742.
26. Kim DH. 1999. Studies on the production of vinegar from fig. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 53-60.
27. Jeong YJ, Lee MH. 2000. A view and prospect of vinegar industry. *Food ind Nutr* 5: 7-12.
28. Son SM. 1991. Study on the Alcohol Fermentation and Subsequent Vinegar Production by Immobilized Cells from Saccharified Potato starch. master's thesis. Kon-Kuk University p.4.

29. Kim MJ, Park EJ. 2011. Feature analysis of different in vitro antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1053-1062.
30. Kang YH, Park YK, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging, and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol* 28: 232-239.
31. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany* 91: 179-194.
32. Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci India* 82: 1227-1238.
33. Block G, Langseth L. 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technol* 48: 80-84.
34. Fukuzawa K, Takaishi Y. 1990. Antioxidants. *J Act Oxyg Free Rad* 1: 55-70.

35. Hatano T. 1995. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols. *Nat Med* 49: 357-363.
36. Jung HJ, Choi YJ, Won CW, and Seo YR. 2006. The chemopreventive effects of antioxidant enzyme. *Environ Mutagen Carcinogen* 6: 35-64.
37. Lee SH, Jang GY, Kim MY, Kim S, Lee YR, Lee J, Jeong HS. 2015. Effect of Monascus Fermentation on Content of Monacolin K and Antioxidant Activities of Germinated Brown Rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1186-1193.
38. Jeon CP, Lee JB, Choi CS, Kwon GS. 2011. Biological activities of ethanol extracts from Monascus-fermented Chinese yam. *J Life Sci* 8: 1142-1148.
39. Jin YJ, Pyo YH. 2015. Effect of Monascus-fermentation on the Content of Bioactive Compounds in White and Black Soybeans. *Korean J Food Sci Technol* 47: 409-412.
40. Pyo YH. 2008. Effect of Monascus-fermentation on the content of GABA and free amino acids in soybean. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1208-1213.

41. Lin SM, Wu JY, Su C, Ferng S, Lo CY, Chiou RYY. 2012. Identification and Mode of Action of 5-Hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) and 1-Methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic Acid (MTCA) as Potent Xanthine Oxidase Inhibitors in Vinegars. *J Agr Food Chem* 60: 9856-9862.
42. Luk AJ, Simkin PA. 2005. Epidemiology of hyperuricemia and gout. *Am J Manag Care* 11: S435-442.
43. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. 2006. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 58: 87–114.
44. Lee SI, Lee YK, Choi JK, Yang SH, Lee I, Suh JW, Kim SD. 2012. Quality characteristics and antioxidant activity of mulberry leaf tea fermented by *Monascus pilosus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 706-713.
45. Pyo YH, Oh HJ. 2011. Ubiquinone Contents in Korean Fermented Foods and Average Daily Intakes. *J Food Compos Anal* 24: 1123-1129.

46. Singleton VL, Rossi JAJ. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158.
47. Jia Z, Tang M, Wu J. 1999. The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
48. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 26: 1231-1237.
49. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* 28: 25-30.
50. Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
51. Joo KH, Cho MH, Park KJ, Jeong SW, Lim JH. 2009. Effects of fermentation method and brown rice content on quality characteristics of brown rice vinegar. *Korean J Food Preserv* 16: 33-39.

52. Cunha MAAD, Lima KPD, Santos VAQ, Heinz OL, Schmidt CA. 2016. Blackberry Vinegar Produced By Successive Acetification Cycles: Production, Characterization And Bioactivity Parameters. Braz Arch biol Technol 59.

53. Muraoka H, Watabe Y, Ogasawara N. 1982. Effect of oxygen deficiency on acid production and morphology of bacterial cells in submerged acetic acid fermentation by *Acetobacter aceti*. J Ferment Technol 60: 171-180.

54. Hekmat D, Vortmeyer D. 1992. Measurement control and modeling of submerged acetic acid fermentation. J Ferment Bioeng 73: 26-30.

55. Kang CH, Jeong HG, Koo JR, Jeon EJ, Kwak DY, Hong CH, So JS. 2012. Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated from Shellfishes. KSBB J 27: 151-156.

56. Lomax AR, Cheung LV, Tuohy KM, Noakes PS, Miles EA, Calder PC. 2012. β -1 Fructans have a bifidogenic effect in healthy middle-aged human subjects but do not alter immune responses examined in the absence of an in vivo immune challenge: results from a randomised controlled trial. Br J Nutr 108: 1818-1828.

57. Jeong YJ, Shin SR, Kang MJ, Seo CH, Won CY, Kim KS. 1996. Preparation and quality evaluation of the quick fermented persimmon vinegar using deteriorated sweet persimmon. *J East Asian Soc Dietary Life* 6: 221-227.

58. Jo JS. 1984. Varieties and characterization of vinegar. *Food Sci Ind* 17: 38-60.

59. Lee JC, Han WC, Lee JH, Jang KH. 2012. Quality Evaluation of Vinegar Manufactured using Rice and *Rosa rugosa* Thunb. *Korean J Food Sci Technol* 44: 202-206.

60. Woo CH, Park CH, Yoon HH. 2000. Production of acetic acid from cellulosic biomass. *Korean J Biotechnol Bioeng* 15: 458-463.

61. Cho Y, Rhee HS. 1979. A study on flavorful taste components in kimchi-on free amino acids. *Korean J Food Sci Technol* 11: 26-31.

62. Noh CH, Jeon SE, Son D, Cho YS, Lee BJ. 2015. Changes of Nutritive Component with before Processing Feeding Type for Larva of *Protaetia Brevitarsis*. *Korean J. Int. Agric* 27: 675-681.

63. Shin WB, Seo DY, Baek YH. 2010. Combined Effects of L-Carnitine Supplementation and Exercise on the Body Composition, Serum Lipids and Adiponectin in the High School Obese Female Students. *J Life Sci* 20: 33-39.
64. Lee SK, Woo IA, Kim CJ. 1996. Soy protein-lipid film preparation and its physicochemical properties. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 331-337
65. Park JS, Lee MR, Kim JS, Lee TS. 1994. Compositions of nitrogen compound and amino acid in soybean paste (Doenjang) prepared with different microbial sources. *Korean J Food Sci Technol* 26: 609-615.
66. Yoon DY, Park KM, Lee JH. 2010. Characteristics and Biological Properties of *Pleurotus eryngii* grown on Monosodium Glutamate-enriched Media. *KSBB J* 25: 277-282.
67. Lee HH, Kim GH. 2013. Changes in the levels of γ -aminobutyric acid and free amino acids during Kimchi fermentation. *Korean J Food Cook Sci* 29: 671-677.

68. Lee SW, Yoon SR, Kim GR, Kyung HK, Jeong YJ, Yeo SH, Kwon, JH. 2011. Effect of nuroks and crude amyolytic enzyme on free amino acid and volatile components of brown rice vinegar prepared by static culture. *Korean J Food Sci Technol* 43: 570-576.
69. Pyo YH. 2006. Optimum conditions for production of mevinolin from the soybean fermented with *Monascus* sp. *Korean J Food Sci Technol* 38: 256-261.
70. Narayan S, Nair PM. 1990. Metabolism enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochem* 29: 367-375
71. Mody I, Koninck DY, Otis TS, Soltesz I. 1994. Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci* 17: 517-525.
72. Oh SH, Oh CH. 2003. Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Sci Biotechnol* 12: 248-252.
73. Oh CH, Oh SH. 2004. Effects of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis. *J Med Food* 7: 19-23.

74. Jo SJ, Hong CO, Yang SY, Choi KK, Kim HK, Yang H, Lee KW. 2011. Changes in contents of γ -aminobutyric acid (GABA) and isoflavones in traditional Korean Doenjang by ripening periods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 557-564.

75. Streeter JG, Thompson JF. 1972. In vivo and in vitro studies on γ -amino butyric acid metabolism with the radish plant (*Raphanus sativus*, L.). *Plant Physiol* 49: 579-584

76. Chen JC, Wang J, Wang ZJ, Li YJ, Pang J, Lin HT, Yin SW. 2015. Effect of *Monascus* aged vinegar on isoflavone conversion in soy germ by soaking treatment. *Food Chem* 186: 256-264.

77. Kim JS, Kim JG, Kim WJ. 2004. Changes of isoflavone contents in soybean cultivars pickled in persimmon vinegar. *Korean J Food Sci Technol* 36: 833-836.

78. Kim MH, Kang WW, Lee NH, Kwon DJ, Kwon OJ, Chung YS, Hwang YH, Choi UK. 2007. Changes in quality characteristics of cheonggukjang made with germinated soybean. *Korean J Food Sci Technol* 39: 676-680.

79. Chen JC, Wang J, Wang ZJ, Li YJ, Pang J, Lin HT, Yin SW. 2015. Effect of *Monascus* aged vinegar on isoflavone conversion in soy germ by soaking treatment. *Food Chem* 186: 256-264.
80. Bhandari KH, Newa M, Kim JA, Yoo BK, Woo JS, Lyoo WS, Yong CS. 2007. Preparation, characterization and evaluation of coenzyme Q10 binary solid dispersions for enhanced solubility and dissolution. *Biol Pharm Bull* 30: 1171-1176.
81. Ernster L, Dallner G. 1995. Biochemical, physiological, and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1271: 195-204.
82. Overvad K, Diamant B, Holm L, Holmer G, Mortensen SA, Stender S. 1999. Coenzyme Q10 in health and disease. *Europ J Clin Nutr* 53: 764-770.
83. Park YC, Kim SJ, Choi JH, Lee WH, Park KM, Kawamukai M, Ryu YW, Seo JH. 2005. Batch and fed-batch production of coenzyme Q10 in recombinant *E. coli* containing the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Gluconobacter suboxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 192-196.

84. Kim DH. 1999. Studies on the production of vinegar from fig. J Korean Soc Food Sci Nutr 28: 53-60.
85. Attwood MM, Van Dijken JP, Pronk JT. 1991. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. J Ferment Bioeng 72: 101-105.
86. Hyon JS, Kang SM, Senevirathne M, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, Oh CK, Jeon YJ, Kim SH. 2010. Antioxidative activities of extracts from dried Citrus sunki and C. unshiu Peels. J Korean Soc Food Sci Nutr 39: 1-7.
87. Ferreres F, Gomes D, Valentão P, Gonçalves R, Pio R, Chagas EA, Andrade PB. 2009. Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: Variation of phenolics and antioxidative potential. Food Chem 114: 1019-1027.
88. Hertog MG, Hollman PC, Katan MB. 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. J Agric Food Chem 40: 2379-2383.
89. Andlauer W, Stumpf C, Frst P. 2000. Influence of the acetification process on phenolic compounds. J Agr Food Chem 48: 3533-3536.

90. Su MS, Silva JL. 2006. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) by-products as affected by fermentation. *Food Chem* 97: 447-451
91. Lee SY, Yoo KM, Moon BK, Hwang IK. 2010. A study on the development of vinegar beverage using yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*) and analysis of components changes during the fermentation. *Korean J Food Cook Sci* 26: 95-103.
92. Friedman M, Jürgens HS. 2000. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J Agr Food Chem* 48: 2101-2110.
93. Jo D, Lee HJ, Jeong YJ, Yeo SH, Kwon JH. 2014. Quality Properties of Pear Vinegars with High-Acidity under Different Fermentation Conditions. *Korean J Food Sci Technol* 46: 418-424.
94. Cheun KS, Kang SG, Kang SK, Jung ST, Park YK. 2005. Changes of the Flavonoids in Onion Vinegar Fermented with Onion Juice and Ethanol. *Korean J Food Preserv* 12: 650-655.
95. Middleton E, Kandaswami C. 1994. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol* 48: 115-119.

96. Kim SW, Park JH, Jun HK. 2008. Analysis of optimum condition for production of an onionic vinegar by two-step fermentations. *J Life Sci* 18: 1410-1414.
97. Jo D, Park EJ, Kim GR, Yeo SH, Jeong YJ, Kwon JH. 2012. Quality comparison of commercial cider vinegars by their acidity levels. *Korean J Food Sci Technol* 44: 699-703.
98. Kim MJ, Park EJ. 2011. Feature analysis of different in vitro antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1053-1062.
99. Hwang JY, Cho HY, Pyo YH. 2016. Effect of Unpolished Rice Vinegar Containing Monascus-Fermented Soybean on Inhibitory Activities of Tyrosinase and Elastase. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 149-154.
100. An BJ, Park JM, Bae HJ, Pyun JR and Song MA. 2006. Antioxidant and antibacterial effects of korean *Isodon japonicus* H. *J Korean Soc Appl Bi* 49: 129-134.
101. Lee YS, Kim KK, Kim NW. 2011. The physiological activities of bark extract of *Albizia julibrissin*. *Korean J Food Preserv* 18: 79-86.

102. Seo SJ, Kim NW. 2010. Physiological activities of leaf and root extracts from *Liriope platyphylla*. *Korean J Food Preserv* 17: 123-130.
103. Jee SO. 2009. Antioxidant activities and whitening effect of the mulberry (*Morus alba* L.) root bark extracts. *Korean J Plant Res* 22: 145-151.
104. Lee SW. 2013. The Efficacy and Safety of Febuxostat in Korean Patients with Gout. *J Rheum Dis* 20: 277-279.
105. Samad A, Azlan A, Ismail A. 2016. Therapeutic effects of vinegar. *Current Opinion Food Sci* 8: 56-61.

ABSTRACT

Effect of acetic acid fermentation on bioactive components and antioxidant and anti-xanthine oxidase activities in vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybeans

Hwang, Ji-Young

Department of Food and Nutrition

Graduate school of

Sungshin University

In this study, acetic acid fermentation was applied for the first time to *Monascus*-fermented soybeans to examine its effect on the bioactive components together with the antioxidant activity and xanthine oxidase inhibitory (XOI) activity of the soy vinegar. An appreciable decrease in pH (4.13 to 3.09) and increase in titratable acidity (0.74 to 5.87%) were noted in soy vinegar during acetic acid fermentation at 30°C. The content

of total polyphenols (0.47~0.97 mg gallic acid equivalents/mL) and flavonoids (0.18~0.39 mg quercetin equivalents/mL) were spectrophotometrically determined, and the content of organic acid (10.22~59.76 mg/mL) and isoflavones (6.79~7.46 $\mu\text{g/mL}$) were determined using HPLC-UV. The analytical method for ubiquinones (0.079~0.276 $\mu\text{g/mL}$) employed saponification before solvent extraction and quantification using LC-MS. The analysis of free amino acids (FAAs) and γ -aminobutyric acid (GABA; 5.37~21.03 $\mu\text{g/mL}$) were derivatized using phenylisothiocyanate prior to HPLC-UV. The significant increase ($p<0.05$) of GABA was observed in soy vinegar with an average 3.9-fold increase of during acetic acid fermentation. The results indicate that acetic acid fermentation on *Monascus*-fermented soybeans have great potential for the enrichment of GABA and FAA. The antioxidant activities were evaluated by ABTS (0.86~0.95 mM trolox equivalents/mL), DPPH (0.39~0.48 mM trolox equivalents/mL) radical scavenging methods and FRAP (0.78~2.24 mM trolox equivalents/mL) assay. The average antioxidant capacities of soy vinegar were increased by a 1.74-fold (1.22 mM trolox equivalent/mL) when compared with those of the soy vinegar without acetic acid fermentation ($p<0.05$). There were significant ($p<0.05$) correlations between the total polyphenol ($R^2=0.9865$) and FAAs ($R^2=0.9196$) and the average antioxidant capacities, suggesting that these components were likely a significant contributor to the antioxidant activity of soy vinegar. Soy vinegar also showed significant XOI (95.3% after 21 days of acetic

acid fermentation at 30 °C) activity. The vinegars showed high XO activity, related to the great concentrations of FFAs ($R^2=0.9555$) and total phenolics ($R^2=0.9865$). The presence of FFAs and total polyphenol in soy vinegar could be responsible for its XO effect. Xanthine oxidase inhibitors play an important role in the treatment of gout and many other diseases related to superoxide anion metabolism. The results suggest that soy vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybean has potential as a novel medicinal food or multifunctional food supplement.