creative commons
COMMONS DEED

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

dCollection

표 영 희 교수지도

석사학위 청구논문

홍국발효 곡물 식초가 *in vitro* 혈당 저하효소에 미치는 영향

- 초산 발효물의 항당뇨 작용 -

2020

성신여자대학교 대학원

식품영양학과

노 영 희

홍국발효 곡물 식초가 *in vitro* 혈당 저하효소에 미치는 영향

- 초산 발효물의 항당뇨 작용 -

표 영 희 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2020년 05월

성신여자대학교 대학원
식품영양학과
노 영 희

논문개요

다양한 생리적 활성의 기능이 보고되어 온 홍국균(*Monascus pilosus*)을 현미와 서리태에 접종하여 홍국 발효물을 생산한 다음, 기능성의 홍국발효곡물식초를(이하 홍국식초) 제조하여 *in vitro* 항당뇨 연구의 시료로 사용하였다. 제조된 홍국식초의 *in vitro* 항당뇨 활성의 측정은 α-amylase, α-glucosidase, 그리고 lipase에 대한 저해활성 및 항산화 활성(ABTS, DPPH, FRAP), 그리고 지방전구세포인 3T3-L1에 대한 영향을 측정하여 시판되는 천연발효 곡물식초인 현미식초와 오곡초를 대조군으로 하여 그 결과를 비교 평가하였으며, 실험결과는 다음과 같다.

첫째, 세 가지 식초의 일반 성분(pH 및 총산도) 및 생리활성 성분(총 폴리페놀함량, 총 플라보노이드 함량, 유기산)을 측정하였다. 세 가지 식초의 pH는 3.13~3.32, 총산도(%)는 4.00~7.21%로 우리나라 식초의 품질규격 범위 내로 들어 모든 식초가 식품기준에 적합한 결과를 나타내었다. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 홍국식초가 0.83±0.06mg GAE/mL로 현미식초에 비해 10.8%, 오곡초에 비해 24.1% 높은 것으로 나타났다. 총 플라보노이드 함량도 홍국식초가 0.11±0.00mg QE/mL로 현미식초에 비해 9.1%, 오곡초에 비해 36.4% 높은 함량으로 비교되어 플라보노이드 함량 또한 총 폴리페놀과 유사한 경향을 보였다. 유기산 함량은 HPLC를 이용하여 분석하였고, acetic acid, citric acid, malic acid, lactic acid, succinic acid 총 5가지의 유기산이 검출되었으며, 그 중 acetic acid 함량이 가장 높은 것으로 나타나 식초의 주요 유기산으로 확인되었다.

둘째, 항산화 활성을 측정하기 위해 ABTS 라디칼 소거활성, DPPH 라디칼 소거활성, 환원력(FRAP) 측정을 하였고, 세 가지 항산화 활성에 대한 결과는 홍국식초가 평균 0.12mM TE/mL로 현미식초보다 1.8배 높았으며, 오곡초보다 2.7배 높은 것으로 나타나 홍국식초의 항산화활성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

셋째, 세 가지 식초의 *in vitro* 소화효소 저해작용을 측정하기 위해 α-amylase, α-glucosidase, 그리고 pancreatic lipase 저해작용을 각각 측정하였다. 그 결과 α-amylase와 α-glucosidase 저해활성에 대한 홍국식초의 IC_{50}은 각각 0.10 mg/mL와 0.09 mg/mL의 농도로 나타났으며, Pancreatic lipase 저해활성에 대한 홍국식초의 IC_{50}은 0.48 mg/mL로 나타나 세 가지 식초 중 탄수화물 가수분해 효소 및 지방가수분해 효소에 대한 저해활성이 가장 높은 것으로 나타났다.

넷째, 지방전구세포 분화에 대한 영향을 알아보기 전 MTT assay를 통해 3T3-L1 preadupocytes의 성장에 영향을 주지 않고 세포독성을 나타내지 않는 농도(50, 500 μg/mL)를 결정하였다. 선택된 농도로 지방세포분화 억제 효과 평가를 수행하였고, 그 결과 50 μg/mL을 투여하였을 때 보다 500 μg/mL를 투여하였을 때 지방축적률이 홍국식초는 14.9% 감소하여 67.92%, 현미식초는 5.13% 감소하여 81.65%, 오곡초는 7.92% 감소하여 83.06%로 측정되었다. 따라서 세 가지 식초추출물의 지방축적 억제능력은 홍국식초>현미식초>오곡초 순으로 나타나, 홍국식초 추출물이 현미식초와 오곡초의 추출물보다 lipid droplet 형성을 저해하는 효과가 가장 높은 것으로 평가되었다.

따라서 *in vitro* 실험결과, 홍국식초는 총페놀화합물, 총플라보노이드, 유기산 등의 생리활성 성분이 다른 곡물식초에 비해 풍부하며, 항산화 활성도 가장 우수한 결과로 나타났다. 또한 혈당저하 및 지방 가수분해 효소와 관련된 소화효소에 대한 저해작용도 가장 높은 것으로 평가되었다. 나아가 홍국식초는 지방세포의 분화를 효과적으로 억제하는 것으로 나타나 항비만 효과에 따른 항당뇨에 대한 잠재적 효과가 확인되었다. 따라서 향후 홍국식초의 대사체 물질 규명과 함께 항당뇨와 항비만에 미치는 생화학적 기전 등의 추가적인 연구를 수행한다면 건강 기능성식품으로의 활용 가능성이 높을 것으로 기대할 수 있다.

목 차

논문개요

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 8

1. 실험 재료 및 방법 ····· 8

(1) 실험 재료 ····· 8

2. 일반 성분 및 생리활성 성분 측정 ····· 10

(1) pH/Acidity ····· 10

(2) 총 페놀 함량 측정 ····· 10

(3) 총 플라보노이드 함량 측정 ····· 11

(4) 유기산 정량 ····· 11

3. 항산화 활성 측정 ····· 12

(1) ABTS 라디칼 소거활성 ····· 12

(2) DPPH 라디칼 소거활성 ····· 12

(3) FRAP(ferric reducing antioxidant power) 측정 ····· 13

4. *In vitro* 소화효소 활성 저해작용 측정 ····· 13

(1) α-Amylase 저해작용 ····· 13

(2) α-Glucosidse 저해작용 ····· 14

(3) Pancreatic lipase 저해작용 ····· 14

5. 지방전구세포 분화에 대한 영향 ····· 15

(1) 3T3-L1 지방전구세포의 배양 및 분화 유도 샘플 처리 ····· 15

(2) 세포 독성 측정(Cell viability assay) ····· 16

(3) 지방전구세포 분화 억제 활성(Oil red O Staining) ·····16
6. 통계처리 ·····17

Ⅲ. 결과 및 고찰 ·····18
1. 일반 성분 및 생리활성 성분 측정 ·····18
(1) pH/Acidity ·····18
(2) 총 페놀 함량 측정 ·····20
(3) 총 플라보노이드 함량 측정 ·····22
(4) 유기산 정량 ·····24
3. 항산화 활성 측정 ·····29
(1) DPPH 라디칼 소거활성 ·····29
(2) ABTS 라디칼 소거활성 ·····29
(3) FRAP(ferric reducing antioxidant power) 측정 ·····29
4. *In vitro* 소화효소 활성 저해작용 측정 ·····32
(1) α-Amylase 저해작용 ·····32
(2) α-Glucosidse 저해작용 ·····34
(3) Pancreatic lipase 저해작용 ·····36
5. 지방전구세포 분화에 대한 영향 ·····40
(1) 세포 독성 측정(Cell viability assay) ·····40
(2) 지방전구세포 분화 억제 활성(Oil red O Staining) ·····42

Ⅳ. 요약 및 결론 ·····46

참고문헌

ABSTRACT

List of Tables

Table 1. Major ingredient of three vinegars used in this study ·····10
Table 2. Operating conditions of LC-MS for determination of Organic acid(Malic acid, Succinic acid, Citric acid, Lactic acid) ·····12
Table 3. pH and titratable acidity(%) of vinegar samples ·····19
Table 4. Organic acid contents of vinegar samples ·····28
Table 5. Antioxidant activity of vinegar samples ·····31
Table 6. IC_{50} value of digestive enzyme inhibition activity of vinegar samples ·····39

List of Figures

Figure 1. Hydrolysis of starch to glucose catalyzed by alpha-amylase and alpha-glucosidase ·····3
Figure 2. Classification of the manufacturing method of vinegar ·····6
Figure 3. Manufacturing process of vinegar using *Monascus*-fermented grains ·····9
Figure 4. Total phenol contents of vinegar samples ·····21
Figure 5. Total flavonoid contents of vinegar samples ·····23
Figure 6. Chromatogram of organic acid standards ·····25
Figure 7. Chromatogram of vinegar samples ·····27
Figure 8. α-amylase inhibition activity of vinegar samples ·····33
Figure 9. α-glucosidase inhibition activity of vinegar samples ·····35
Figure 10. pancreatic lipase inhibition activity of vinegar samples ·····37
Figure 11. Effects of vinegars on cell viability of 3T3-L1 preadipocytes ·····41
Figure 12. Inhibitory effects of vinegars on Oil Red O staining and lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 adipocytes ·····45

Ⅰ. 서론

현대인의 서구화된 식생활 패턴, 외식의 증가, 운동부족 등의 환경적 요인은 인간의 다양한 질병과 성인병의 원인으로 지목되어 사회적 문제로 대두되고 있으며, 특히 당뇨병의 유병률이 증가하고 있다(Jo 등, 2016; Lee 등, 2020). 2018년 통계청에서 발표한 한국인의 10대 사망 원인 중 당뇨병은 6위를 기록하고 있으며, 당뇨병의 사망률은 17.1%로 조사되었다.

당뇨병은 췌장의 β-cell에서의 인슐린 분비장애와 조직에서의 인슐린 저항성 등으로 발병되며 고혈당이 주요 증상이다(Kang 등, 2014). 혈당 수준이 증가하게 되면 체내에 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 과다하게 생성되어 산화적 스트레스가 높아지는데 이러한 산화적 스트레스의 증가는 인슐린 분비를 감소시키는 원인으로 알려져 왔다(Cho 등, 2013). 당뇨병은 혈관장애, 신경병증 등 고혈당 상태가 장기간 지속됨에 따라 심각한 만성 합병증을 일으키는 질환으로 발병률도 급격히 증가할 뿐만 아니라 유병연령이 점차 낮아지고 있어 그 심각성이 증대하고 있다(Cha 등, 2009). 또한 당뇨병의 경우 비만과의 큰 연관성을 보이며 당뇨병이 유발하는 합병증 중 가장 많이 발생하는 고지혈증의 경우 당뇨병 환자 2명 중 1명이 동반되어 그로 인해 LDL-콜레스테롤 관리의 중요성이 대두되고 있다(Lee 등, 2020). 현재 당뇨병의 약물치료로 acarbose, voglibose 등의 α-glucosidase 저해제가 판매되고 있으나 이러한 저해제는 복용에 따라 구토, 설사 등 부작용이 보고되어 왔다(Mooradian 등, 1999). 이러한 문제를 해결하기 위해 혈당 상승을 억제하는 천연물에 대한 관심이 높아지고 있으며, α-glucosidase inhibitor 혹은 α-amylase inhibitor와 같은 식후 혈당상승의 저해물질을 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 예를 들어, 청미래 덩굴 추출물(Lee 등, 2014), 산사 추출물(Kim 등, 2007), 강원도 자생 산채 추출물(Kim 등, 2011), 제비꽃 추출물(Lee 등, 2008), 노간주나무 추

출물(Kim 등, 2014), 보리수 열매 식초(Cho 등, 2017) 등 다양한 천연물이 식후 혈당상승을 억제하는 소재로 탐색되어 왔다. 제 2형 당뇨병과 관련된 *in vitro* 연구에서, 소화효소 저해제는 주로 α-amylase, α-glucosidase 와 lipase를 대상으로 그 저해활성의 결과가 보고되고 있다. 식사로 섭취한 탄수화물은 Figure 1에서와 같이 체내의 탄수화물 가수분해효소에 의해 포도당으로 분해되고 흡수됨으로써 혈당을 상승시키는데, 이 때 작용하는 효소가 췌장의 α-amylase와 소장점막의 α-glucosidase이다(Hanefeld 등, 1998). α-Amylase는 탄수화물의 α-D-1,4-glucan 결합을 분해하는 작용을 하며, α-glucosidase는 sucrase-isomaltase, trehalase 및 glucoamylase complex로 이루어진 복합체로 탄수화물 소화단계 중 최종 단계를 촉매하여 포도당으로 전환시키는 작용을 한다(Figure 1). 따라서 이들 효소의 과잉작용은 탄수화물이 소장에서 분해 및 흡수되는 속도를 증진시켜 고혈당을 유발할 수 있다(Mcgill 등, 2007). α-Amylase와 α-glucosidase 효소작용뿐 아니라, 췌장에서 분비되는 lipase는 triglyceride의 ester결합을 가수분해하는 효소로서 글리세롤과 지방산을 생성하며, 분해된 글리세롤과 지방산은 소장의 점막 세포에서 흡수되어 에너지원으로도 사용되지만 에너지원으로 사용되지 못하고 남은 지방은 체내에 축적되어 비만의 원인이 된다(Lee 등, 2010).

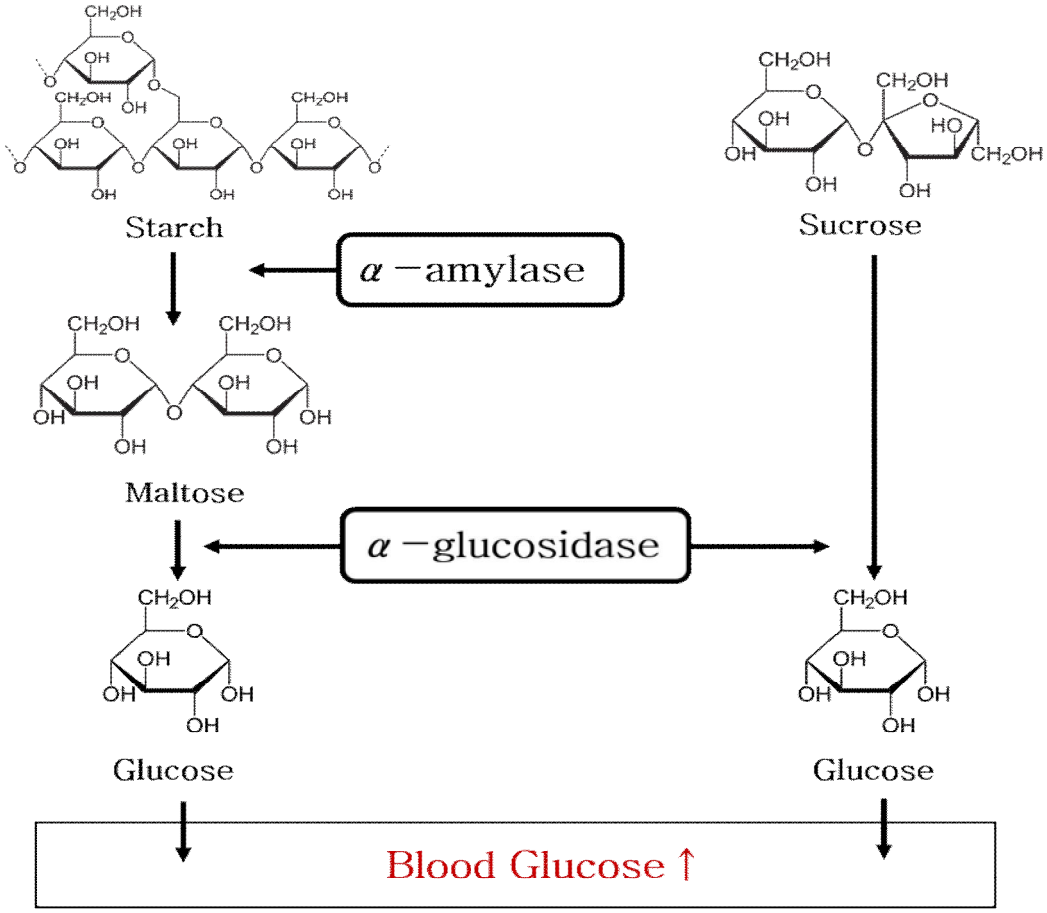


Figure 1. Hydrolysis of starch to glucose catalyzed by α-amylase and α-glucosidase.

홍국(紅麴)은 붉은 누룩이라는 뜻으로 쌀에 *Monascus*속 곰팡이를 배양한 것으로 중국, 대만에서 보존제나 천연소재로 오래전부터 사용되어 온 식용 곰팡이류의 하나이다(Jeong 등, 2013). 홍국은 예로부터 식품소재뿐 아니라 적색의 천연 착색제로도 이용되어 왔는데, 이는 홍국이 성장하는 동안 적색소(rubropuntain, monascorubin), 황색소(monascin, ankaflavin) 그리고 자색소(rubropunctamine, monascorubramine) 등의 대사산물인 색소를 생산하기 때문이다(Jeon 등, 2006). 대표적인 홍국균의 2차 대사산물인 Monacolin에는 hydroxy acid K형, dihydromonacolin K. dehydro monacolion K, monacolin L 및 J형 등 수종의 유도체가 존재하며, 그 중 K형이 가장 많이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌다(Choi 등, 2004). Monacolin K는 현재 고지혈증 치료제로 사용하고 있는 statin 계열의 의약품과 동일한 물질로, cholesterol생합성 효소인 HMG-CoA reductase를 저해하여 혈중 cholesterol수치를 효과적으로 감소시키는 활성을 나타낸다. 따라서 홍국균의 발효물은 이러한 monacolin K 및 유도체에 의한 콜레스테롤의 생합성 억제작용을 비롯한, 혈압과 혈당 강하작용, 항암 및 항산화 활성 등의 다양한 기능성이 보고됨에 따라 새로운 기능성 식품소재로 탐구되어 왔다(Lee 등, 2015). 최근 mevinolin과 isoflavone 등 특정의 유효활성 성분을 증강시키기 위하여 홍국 발효콩을 개발하여 항산화 활성과 항고혈압성 활성을 탐색함은 물론(Jeon 등, 2011), 홍국 발효 콩으로 제조한 두유의 생리적 활성과 함께 기능성 청국장 등이 개발되어 그 활용 가능성 등이 보고되었다(Kim 등, 2008;Lee 등, 2009). 또한 홍국발효콩 추출물이 고지방과 고콜레스테롤 식이로 유도된 실험동물의 혈중지질 상태를 개선함은 물론(Lee 등, 2013), tyrosinase와 elastase 등의 저해작용을 통해 미용 건강기능성 소재로서의 활용 가능성도 연구되어 왔다(Hwang 등, 2016).

식초는 술과 함께 인간이 만든 가장 오래된 대표적인 발효 식품 중 하나이며 최근 식초에 대한 여러가지 효능이 과학적으로 입증되면서 식초의 소비량은 점점 더 증가되고 있는 추세이다. 단순한 조미 용도의 식초가 다양한 천연소재를 활용한 기능성 건강음료로 개발되어 건강 보조식품으로 소비되는 경향이 높아지고 있다(Cho 등, 2013;Lee 등, 2009). 식초에는 원료의 종류에 따라 초산, 구연산 등의 유기산은 물론 아미노산과 무기질 및 비타민 등의 여러가지 영양소가 함유되어 있고, 페놀산과 플라보노이드 등의 생리활성 성분도 다량 함유되어 있어 대표적인 건강 기능성 식품의 하나로 활용되는 추세이다. 예를 들어, 젖산 분해작용을 통한 피로회복 촉진은 물론, 식후 혈당 상승의 억제효과로 인한 제 2형 당뇨 및 비만의 예방 효과와 함께 혈압상승억제 및 항종양효과 등의 다양한 생리활성 작용이 보고되어 왔다(Park 등, 2012;Kim 등, 2015). 식초는 Figure 2와 같이 제조방법에 따라 발효과정을 거치는 양조식초와, 빙초산을 희석해서 제조하는 합성식초로 분류된다(Park 등, 2016). 양조식초는 자연 발효식초와 주정식초로 다시 분류되며, 자연발효식초는 원료의 소재에 따라 곡물식초와 과실식초로 세분할 수 있다. 현미와 백미 등을 원료로 한 곡물식초는 곡물 술덧, 곡물 당화액, 알코올, 당류 등을 이용하여 초산발효과정을 거쳐 생산되며 이는 곡물 사용량이 4% 이상, 총산은 4~29%로 규정하고 있다(Baek 등, 2013). 최근 식생활의 다양화와 함께 품질이 우수하고 안전성이 확보된 양조식초에 대한 소비자들의 요구에 따라 새로운 과일이나 채소류 등을 소재로 한 독특한 풍미의 자연 발효식초가 개발되어 시판되는 추세이다. 그 밖에 천연소재를 원료로 하여 알코올 발효를 거친 술덧을 2단계 초산발효를 통해 원료에 함유된 기능성 물질을 약리학적 생리활성 물질로 전환하는 다양한 기법의 발효기술 등이 적용된 독창적인 식초제품의 생산도 시도되어 왔다(Park, 2018).

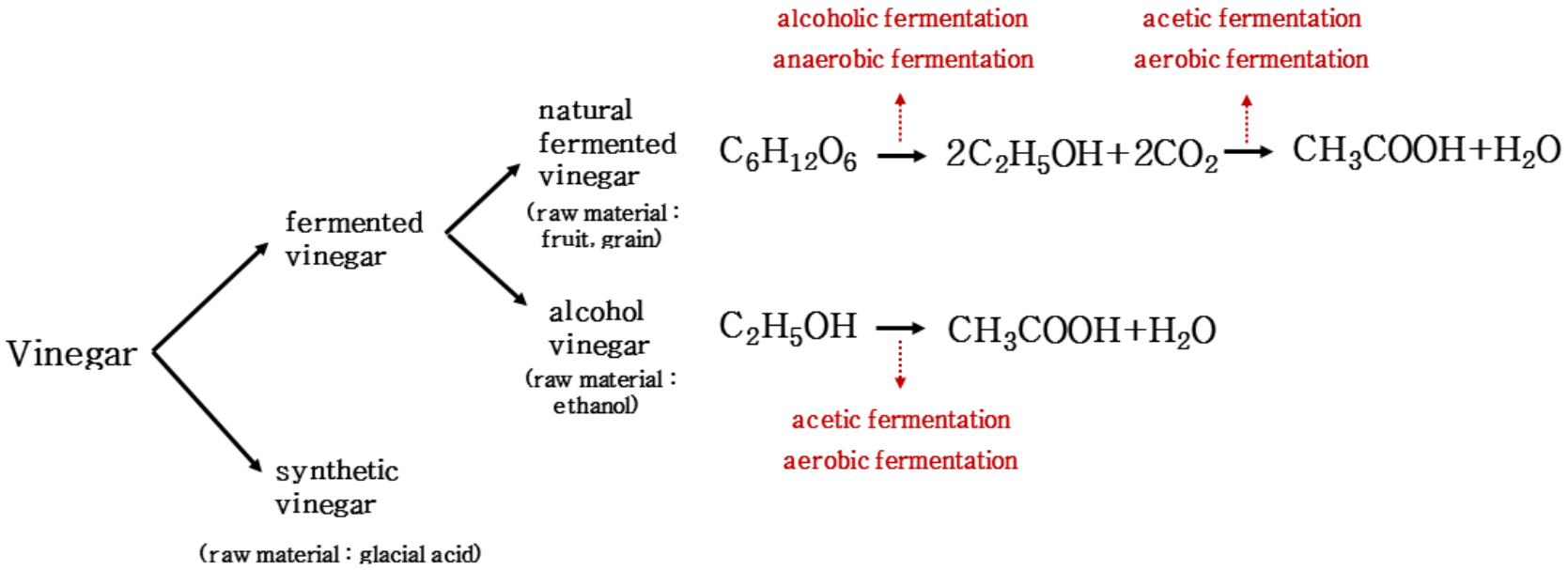


Figure 2. Classification of the manufacturing method of vinegar.

따라서 본 연구에서는 다양한 생리 활성 기능이 보고되어 온 홍국균을 이용하여 홍국발효곡물 식초를 제조한 후 시판되고 있는 천연 발효곡물 식초(현미식초, 오곡초)와 비교·평가하였다. 세 가지 식초에 대한 생리활성 성분 및 항산화 활성을 분석하여 홍국발효곡물 식초에 대한 기능성 식품 소재로의 활용 가능성을 연구하고자 하였다. 더불어 소화효소 저해 활성과 3T3-L1 세포에 대한 지방세포분화 억제 효과를 측정하여 홍국발효곡물 식초의 당뇨 및 비만 개선을 위한 식품소재 및 건강기능식품으로 사용 가능성에 대한 기초자료로 제공하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

실험에 사용된 현미식초와 오곡초는 서울의 백화점에서 구입한 (2019년) 전통 발효식초이며, 홍국발효곡물 식초(이하 홍국식초)는 성신여자대학교 식품영양학과 식품화학 연구실에서 제조한 식초를 이용하였다. 홍국식초의 제조방식은 Figure 3과 같으며, 각 식초에 대한 주요 원재료는 Table 1과 같다. 표준시약으로 사용한 Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, quercetin, acetic acid, lactic acid, citric acid, malic acid, succinic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, trolox, 2,2'-azion-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS), starch, α-amylase, α-glucosidase, ρ-nitro-phenyl-α-glucopyranoside, pancreatic lipase, p-nitrophenol laurate 모두 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

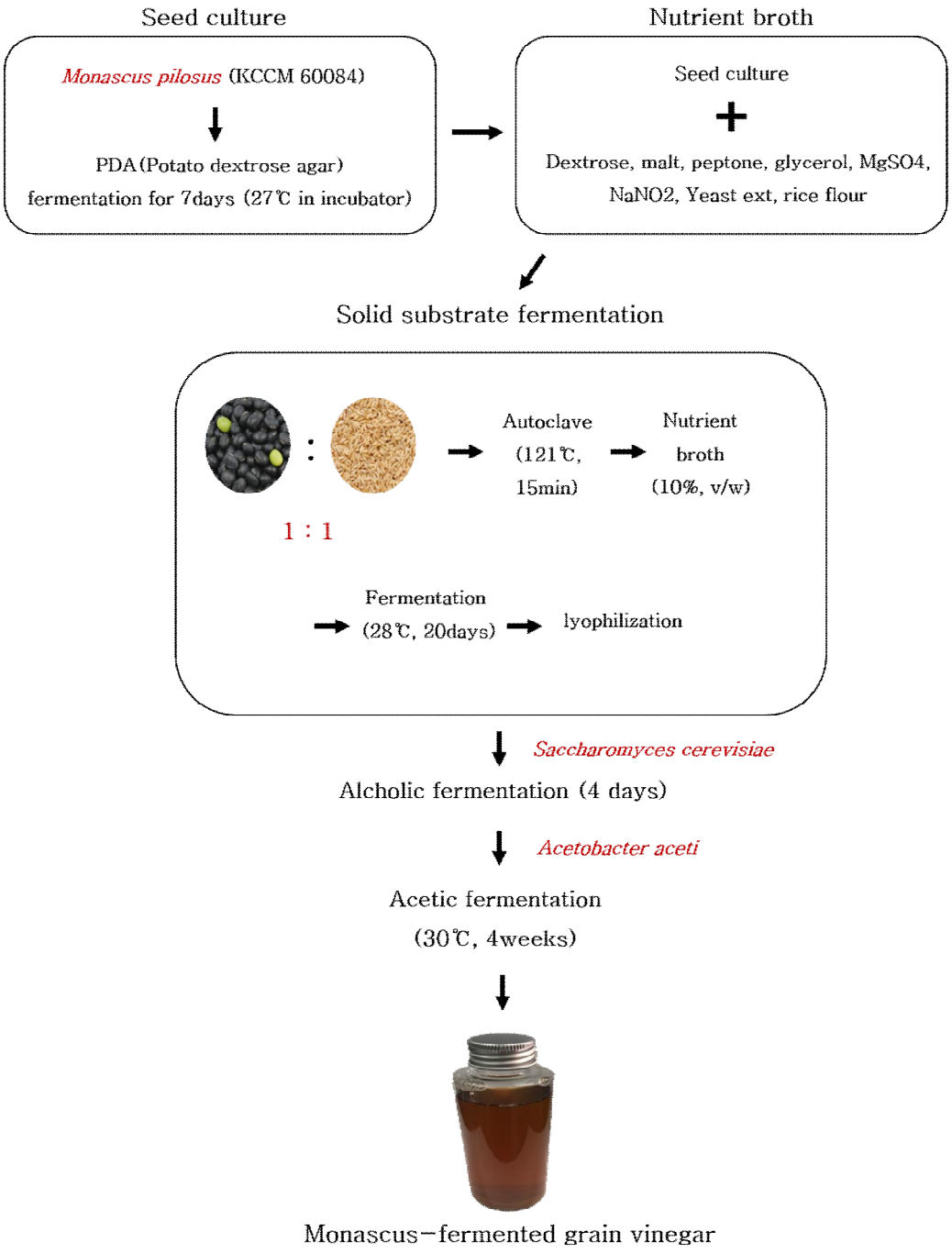


Figure 3. Manufacturing process of vinegar using *Monascus*-fermented grains.

Table 1. Major ingredient of three vinegars used in this study.

Sample	Major ingredient
Monascus-fermented grain vinegar (MV)	Brown rice and black soybean (1:1, w/w) fermented with *Monascus pilosus*: 50%
Brown rice Vinegar (BV)	brown rice: 50%
Five kinds of cereals vinegar (CV)	brown rice, barley, waxy millet, proso millet, sorghum: 32.7%

2. 일반성분 및 생리활성 성분 측정

1) pH 및 적정산도

식초의 pH는 pH meter (ohaus, Korea)를 이용하여 측정하였다. 총 적정산도(%)는 중화적정법을 이용하여 관찰하였다. 원심 분리한 식초 의 상등액 10 mL를 DW로 10배 희석한 후 0.1N NaOH용액으로 적정하여 적정산도를 측정하였다.

2) 총 페놀함량

시료의 총 폴리페놀 함량은 Singleton과 Rossie의 방법(Singleton 등, 1965)을 일부 변경하여 측정하였다. 추출시료 50 μL에 2% Na2CO3 용액 1 mL을 가한 다음 3분간 반응시킨 후, Folin-Ciocalteu reagent 50 μL를 혼합하였다. 모든 시료는 실온의 암소에서 30분 동안 반응시킨 후 700nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 폴리페놀 함량은 mg gallic acid equivalent (mg GAE/ml)로 나타내었다.

3) 총 플라보노이드함량

시료 속에 함유된 플라보노이드 함량은 colormetric method의 방법을 수정하여 측정하였다(Zhishen 등, 1999). 시료 1 mL에 NaNO2 20 μL를 가한 다음 5분간 반응시킨 후, 10% $AlCl_3$ 20 μL와 1N NaOH 150 μL를 혼합한 후에 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 플라보노이드 함량은 mg quercetin equivalent (mg QE/mL)로 나타내었다.

4) 유기산 함량

식초의 유기산 함량을 측정하기 위해 식초를 원심분리한 후 상층액을 희석하여 0.20 μm syringe filter로 여과한 후 HPLC-UV로 분석하였다. 표준물질은 acetic acid, lactic acid, citric acid, malic acid, succinic acid를 사용하였다. Acetic acid를 측정하기 위해 preparative HPLC system(KNAUER, Azura)을 사용하였고, column(Rezex ROA-Organic Acid H+, 300x7.8mm, Phenomenex)에 시료 30 μL를 주입하고 60℃에서 이동상 용매(0.005N H2SO4)를 1mL/min 속도로 이동시키면서 UV detector 210nm에서 정량하였다. Lactic acid, citric acid, malic acid, succinic acid의 분석은 LC-MS(Agilent Technology, Agilent 6130)와 Rezex ROA-Organic Acid H+(300x7.8mm, Phenomenex)컬럼을 사용하였다. 시료 2 μL를 이동상 용매인 0.1% Acetonitrile(A)과 0.1% formin acid(B)로 60℃에서 0.5 mL/min 속도로 10분 동안 기울기 용매 조건으로 용출시켜 분석하였으며, 이동상의 자세한 조건은 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Operating conditions of LC-MS for determination of organic acid (malic acid, succinic acid, citric acid, lactic acid).

Mobile phase	A : Acetonitrile B : 0.1% formic acid			
Gradient table	Time(min)	Flow (mL/min)	%A	%B
	0	0.5	0	100
	8	0.5	0	100
	10	0.5	50	50

3. 항산화 활성 측정

1) ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라다컬 소거활성을 이용한 황산화력 측정은 ABTS cation decolorization assay 방법에 따라 측정하였다(Re 등, 1999). 7mM의 ABTS(2,2’-azion-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45mM의 potassium persulfate를 실온의 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS 양이온을 형성시켜 ABTS stock solution을 제조하였다. 734 nm에서 흡광도 0.70±0.04로 희석한 ABTS 용액 900 μL에 시료 100 μL를 첨가하여 ABTS 라디컬 소거능을 측정한 다음 각 시료의 라디컬 소거능은 mg trolox equivalent (mg TE/ml)로 나타내었다.

2) DPPH 라디칼 소거활성

식초의 항산화 활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디컬에 대한 전자 공여능으로 평가하였다(Brand 등, 1995). 시료 100 μL와 0.2 μM DPPH 용액 900 μL를 첨가한 후 30분 후에 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 trolox를 이용하여 검량선을 작성한 후, 각 시료의 라디컬 소거능은 mg

trolox equivalent (mg TE/ml)로 나타내었다.

3) FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Ferric reducing antioxidant power는 식초에 들어있는 특정 성분이 ferric-tripyridyltriazine(Fe Ⅲ-TPTZ) sodium acetate trihydrate를 환원시키는 능력을 측정하였다 (Benzie 등, 1996). 37℃ 항온기에서 15분 예비 반응한 후 시료 50 μL에 FRAP solution 950 μL 혼합하여 37℃에서 15분간 반응시킨 다음 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 환원력을 통한 항산화 활성은 mg trolox equivalent (mg TE/mL)로 나타내었다.

4. *In vitro* 소화효소 활성 저해작용 측정

1) α-Amylase 저해작용

각각의 식초 발효액을 원심분리한 상등액 50 μL와 α-amylase(1.0 U/mL) 효소 용액 50 μL, 그리고 0.2mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) 50 μL를 첨가하여 37℃에서 10분간 예비 반응시킨다. 이 반응액에 0.2mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 녹인 1% 전분 용액을 0.25 mL를 가하여 다시 37℃에서 20분간 반응시킨 다음 DNS 시약을 0.25 mL 첨가하여 100℃에서 10분간 끓여 발색시킨 후, 바로 냉각하여 증류수 1mL를 첨가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 효소 저해 활성의 음성 대조구는 시료 대신에 완충액을 사용하였으며 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도(optical density, OD) 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{α-Amylase 저해율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구 } OD}{\text{시료무첨가구 } OD}\right) \times 100$$

2) α-Glucosidase 저해 작용

시료 200uL에 0.5 U/mL α-glucosidase 효소액 100 μL(in 0.1M potassium phosphate buffer, pH 6.8)를 혼합하여 37℃에서 10분 동안 미리 반응시켰다. 5 mM ρ-NPG(ρ-nitro-phenyl-α-glucopyranoside, in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.8) 100 μL를 가한 후 37℃에서 10분간 반응시킨 후 0.1M Na2CO3 750uL를 가하여 반응을 정지시켰다. 이때 생성된 ρ-nitrophenol의 양을 분광광도계를 사용하여 흡광도 405nm에서 측정하였다. 대조구는 배양액 대신 0.1M Potassium phosphate buffer (pH 6.8)를 사용하였으며, blank는 시료 및 효소액 대신 0.1M Potassium phosphate buffer (pH 6.8)를 사용하였다. 각 시료의 효소 억제 활성은 다음 식에 의해 시료 반응구와 무처리구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{α-Glucosidase 저해율 (\%)} = (1 - \frac{\text{시료첨가구}OD}{\text{시료무첨가구}OD}) \times 100$$

3) Pancreatic lipase 저해 작용

Pancreatic lipase 저해 활성은 식초 발효액을 원심분리한 상등액 100 μL, pancreatic lipase (0.1g/mL) 효소 용액 100 μL, 그리고 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 100 μL를 혼합하여 37℃에서 15분간 예비 반응시켰다. 반응 후, sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 녹인 5mM *p*-nitrophenollaurate(*p*-NPL) 50 μL를 가하여 30분간 반응시킨 다음, 100 mM Na2CO3 0.75 mL를 가해 반응을 종결한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 효소 저해 활성의 음성 대조구는 시료 대신에 완충액을 사용하였으며 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{Lipase 저해율 (\%)} = (1 - \frac{\text{시료첨가구}OD}{\text{시료무첨가구}OD}) \times 100$$

5. 지방전구세포 분화에 대한 영향

1) 3T3-L1 지방전구세포의 배양 및 분화 유도

실험에 사용한 3T3-L1 지방전구세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 세포 배양 및 분화에 사용된 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Welgene, Daegu, Korea)에 10% Donor Bovine Serum(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)와 1% penicillin-streptomycin(P/S, Welgene, Daegu, Korea)를 첨가하여 37℃, 5% CO_2 환경에서 세포가 confluent 상태가 되기 전에 0.25% trypsin-EDTA(Welgene, Daegu, Korea)를 이용하여 세포를 떼어낸 후 원심분리하여 계대배양하였다. 분화를 유도하기 위해 8 X 10^4 cells/well 밀도로 6well flate (SPL)에 분주하고 100% confluence가 될 때까지 배양하였다. Confluence 상태로 2일을 더 배양한 후, 분화를 유도하기 위해 DMEM에 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Carpricorn Scientific Gmbh, Ebsdorfergrund, Germany), 1% P/S, MDI (0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), 1 μM dexamethasone, 10 μg/mL insulin)를 첨가하여 배양하였다. 분화 유도 2일 째에는 10% FBS-DMEM 배지에 10 μg/mL insulin이 첨가된 배지로 2일간 배양하고, 4일 째부터는 10% FBS와 1% P/S만 포함된 DMEM 배지로 이틀에 한 번씩 교체하며 8일까지 배양하였다. 시료의 처리는 분화 유도 배지 첨가 시점과 동시에 처리하였다

2) 세포 독성 측정(Cell viability assay)

시료의 세포증식과 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Duchefa, Haarlem, Netherlands) 용액을 사용하여 측정하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 24 well plate에 2.5×10^4 cells/mL로 분주하고 24시간 동안 배양시킨 다음, 식초 추출액을 5-500 μg/ml의 농도로 24시간 처리하였다. 배지를 제거하고 각 well에 5mg/ml MTT 용액 20 μL를 첨가하여 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. MTT 용액을 제거하고 각 well에 DMSO를 200 μL씩 첨가하여 formazan 결정을 용해시킨 후, 96-well plate에 100 μl씩 옮겼다. 최종적으로 microplate reader(Bio-Rad Laboratories,Hercules, CA, USA)를 사용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 지방전구세포 분화 억제 활성(Oil red O Staining)

식초 추출물 농도에 따른 지방구 형성에 대한 영향은 Oil red O 염색을 통해 확인하였다. 3T3-L1 세포를 6-well plate에 8×10^4 cells/mL로 분주하고 배양 및 분화하여 분화 8일 째에 배양액을 제거하였다. 1 x phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Welgene)을 각 well 당 1 mL씩 넣고 2번 세척한 후, 4% para-formaldehyde로 30분 간 상온에서 고정하였다. 1 x PBS로 고정액을 세척하고 완전히 건조시킨 다음, Oil red O 용액을 넣어 1시간 동안 상온에서 염색하였다. 염색된 지방구는 well을 1 x PBS로 3회 세척하여 현미경으로 관찰하였다. 이후 isopropanol로 염색된 지방구를 추출하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 통계처리

모든 실험 결과의 통계처리는 SPSS (Statical Package for Social Science. version 25. SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 시료간의 유의성 검정은 분산분석(ANOVA)과 다중범위검정(Duncan's multiple range test)으로 $P<0.05$ 수준에서 실시하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 일반성분 및 생리활성 성분 측정

1) pH 및 적정산도

홍국식초, 현미식초, 오곡초의 pH 및 적정산도 결과는 Table 3과 같았다. pH의 경우, 3.13-3.32 범위로 나타났으며, 세 가지 식초가 유의적인 차이를 보였다($P<0.05$). 홍국식초의 수소이온 농도는 3.32±0.00으로 시료 중 유의적으로 가장 낮았으며, 오곡초가 3.13±0.00으로 가장 높게 측정되었다. 그러나 적정 총산도 (%)의 결과는 홍국식초가 7.21%로 가장 높게 측정되었고, 오곡초(5.20%)와 현미식초 (4.00%)의 순으로 나타났다($P<0.05$). 식초는 산도에 따라 저산도 식초(4~5%), 일반산도 식초(6~7%), 2배 식초(12~14%), 3배 식초(18~19%)로 나누어진다. 산도가 10% 이상인 고산도 식초에 비해 저산도 식초와 일반산도 식초는 신맛이 부드러워 음식 고유의 맛과 풍미를 살려주는 특징을 지니고 있다(Park 등, 2018). 현미식초와 오곡초는 각각 4.00, 5.20%로 저산도 식초에 해당하며, 홍국식초는 7.21%로 일반산도 식초에 해당되는 것으로 나타났다. 우리나라 식초의 품질규격은 총산의 경우 초산으로서 4.0~29.0%의 범위로 규정하고 있어 모든 시료가 식품기준에 적합한 결과를 보이는 것으로 나타났다(Na 등, 2013).

Table 3. pH and titratable acidity(%) of vinegar samples.

sample	pH	Acidity(%)
MV	3.32±0.00[a1)]	7.21±0.16[a]
BV	3.14±0.00[c]	4.00±0.01[c]
CV	3.13±0.00[b]	5.20±0.01[b]

MV: Monascus-fermented grain vinegar, BV: Brown rice Vinegar CV: Five kinds of cereals vinegar. All values are means of determinations in three independent experiments. Values are means±standard deviation. [1)] Means with different superscripts in a column (a-c) are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

2) 총 폴리페놀 함량

폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물 중의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며, 이러한 폴리페놀 화합물은 penolic hydroxy기를 가지고 있어 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 나타내며, DNA를 보호하고, 세포구성 단백질 및 효소를 보호하는 역할을 한다(Bidlack 등, 2000). 과일이나 채소에서의 폴리페놀은 강하게 결합된 상태로 존재하여 쉽게 흡수될 수 없는데, 알코올에서는 수용성 상태로 존재하여 생물학적 이용성이 증진되는 장점이 있고, 알코올에서 유래된 제품 역시 폴리페놀 화합물로 인한 항산화 작용을 기대할 수 있다(Alonso 등, 2004). 3가지 식초(MV, BV, CV)의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Figure 4와 같다. 홍국식초의 경우, 총 폴리페놀 함량을 gallic acid 등량값으로 환산할 때 0.83±0.06mg GAE/mL로 가장 높았으며, 현미식초가 0.74±0.02mg GAE/mL으로 다음 순이었으며, 오곡초가 0.63±0.01mg GAE/mL로 총 폴리페놀 함량이 가장 적은 것으로 나타났다. 홍국식초는 현미식초에 비해 폴리페놀 함량이 10.8%, 오곡초에 비해 24.1% 높은 것으로 나타났다. 이전 연구에 따르면, 홍국발효 콩을 첨가한 시료의 총 페놀 함량이 현미 식초보다 높은 것은 이소플라본 등의 다양한 폴리페놀 화합물이 함유되었기 때문으로 보고되었다(Hwang 등, 2016). 또한 인칼균(*Incalgyun)* 첨가 잡곡식초의 총 폴리페놀함량은 0.28~0.41 mg/mL로 보고되었으며(Woo 등, 2010), 당근식초의 총 폴리페놀함량은 0.18 mg/mL(Kim 등, 2018), 막걸리 종초를 농도별로 첨가하여 제조한 토마토 식초의 총 폴리페놀 함량은 0.23~0.31 mg/mL(Lee 등, 2018)로 나타나 본 연구에 사용한 세 가지 식초의 총 폴리페놀 함량이 다른 소재의 식초들보다 높은 것으로 비교되었다.

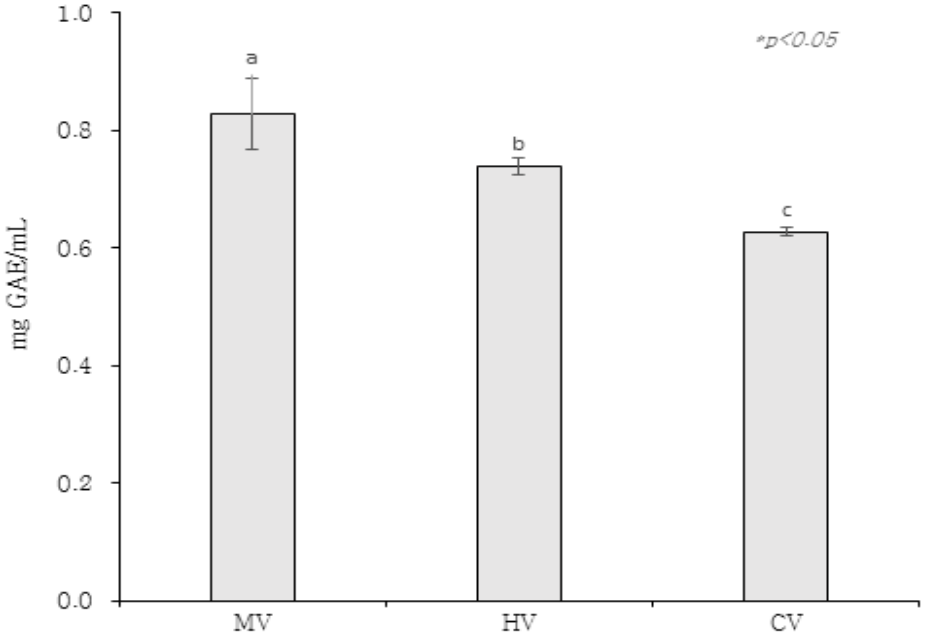


Figure 4. Total phenol contents of vinegar samples.

MV: Monascus-fermented grain vinegar, BV: Brown rice Vinegar CV: Five kinds of cereals vinegar. All values are means of determinations in three independent experiments. Values are means±standard deviation. Means with the same lettered superscripts on the bar are not significantly different at the 5% level.

3) 총 플라보노이드 함량 측정

플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 화합물로 주로 anthocyanidins, flavonols, flavones, cathechins 및 flavanones 등으로 구성되어 있으며, 이러한 플라보노이드는 항산화작용, 항염, 면역증강 등 다양한 생리활성 효과를 보이는 것으로 알려졌다(Park 등, 2012). 식이성 플라보노이드에 대한 연구는 catechin과 quercetin을 중심으로 2000년 이후에 활발히 이루어졌다. 플라보노이드는 in vitro와 in vivo의 여러 연구 결과에서 암세포의 증식, 전이, 혈관 생성을 억제하고 세포자멸사를 일으켜 항종양 효능을 나타낸다고 보고되는 등 높은 평가를 받고 있다(Ravishankar 등, 2013). 본 실험에 사용된 홍국식초, 현미식초, 오곡초의 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Figure 5와 같다. 홍국발효 곡물식초의 경우, quercetin 등량값으로 나타낼 때, 0.11±0.00mg QE/mL로 가장 높았으며 현미식초는 0.10±0.00mg QE/mL, 오곡초는 0.07±0.00mg QE/mL로 가장 낮은 함량으로 비교되었다 (P<0.05). 홍국발효식초는 현미식초에 비해 플라보노이드 함량이 9.1%, 오곡초에 비해 36.4% 높은 것으로 각각 나타나 플라보노이드 함량 또한 총 폴리페놀과 같은 경향을 보였다. 이 같은 결과는 잡곡류 등의 곡류만 원료로 하여 식초를 제조할 때 보다, 곡류와 함께 콩을 첨가하여 제조한 식초의 총페놀 함량이 플라보노이드 함량의 증가로 인해 모두 증가한 것으로 평가할 수 있다. 당근식초의 총 플라보노이드 함량은 0.1 mg/mL이라 보고하였는데(Kim 등, 2018), 본 연구에서 사용된 세 가지 식초 중 오곡초를 제외한 홍국식초와 현미식초의 플라보노이드 함량이 더 높은 것을 알 수 있다.

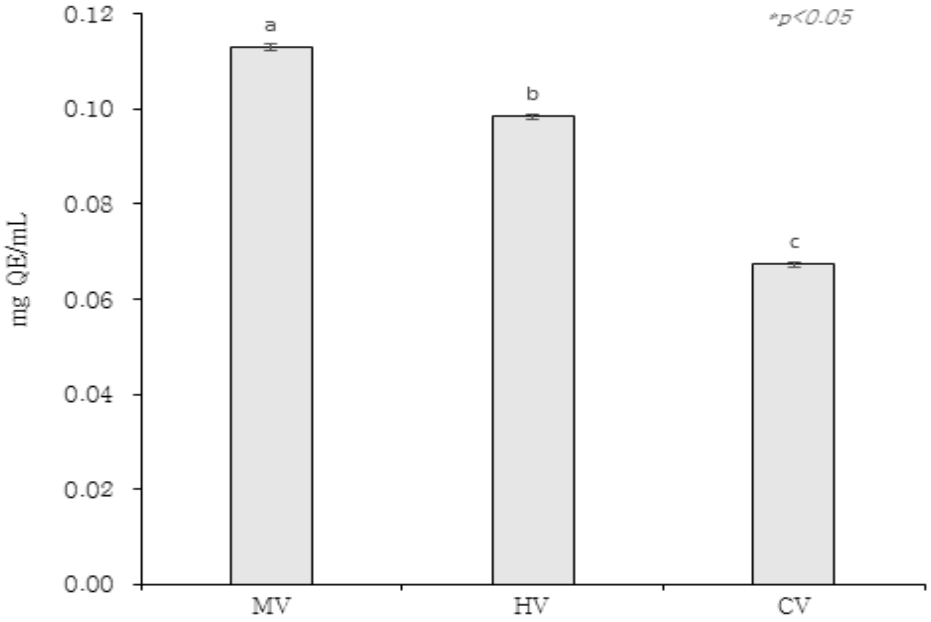


Figure 5. Total flavonoid contents of vinegar samples.

MV: Monascus-fermented grain vinegar, BV: Brown rice Vinegar CV: Five kinds of cereals vinegar. All values are means of determinations in three independent experiments. Values are means±standard deviation. Means with the same lettered superscripts on the bar are not significantly different at the 5% level.

4) 유기산 정량

홍국식초, 현미식초, 오곡초에 함유된 유기산은 acetic acid, malic acid, citric acid, lactic acid, succinic acid로 총 5가지의 유기산이 검출되었다. 표준 시약과 세 가지 식초의 HPLC chromatogram은 Figure 6 및 Figure 7과 같으며, 세 가지 식초에 함유된 유기산의 함량을 mg%로 나타낸 결과는 Table 4와 같다(Park 등, 2012). 유기산은 식초의 산미와 지미에 영향을 주어 식초 품질에 중요한 영향을 미친다. 특히 식초의 양조과정 중 *Acetobacter*균의 작용에 의해 생성되는 acetic acid는 식초의 주성분으로 발효 공정 관리의 지침이 된다(Park 등, 2012). 본 실험에서 분석한 세 가지 식초 모두 5가지 유기산 중 acetic acid 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 총 유기산에 대한 acetic acid의 비율(A/T)은 홍국식초가 0.98, 현미식초가 0.94, 오곡초가 0.87로 나타나 홍국식초가 총 유기산 함량 대비 acetic acid 함량이 높은 것으로 나타났다. Citric acid와 malic acid는 시료 간 유의적인 차이가 없었으며, citric acid는 5가지 유기산 중 함량이 가장 적은 것으로 확인되었다. Succinic acid는 오곡초가 25.00±5.06 mg%로 나타나 가장 적게 함유되어 있었다. citric acid, malic acid, 그리고 succinic acid는 원료에 함유된 성분이 식초로 이행하거나 발효 중 부산물로 생성되는 것으로 추정하였다(Lee 등, 1999). Lactic acid는 오곡초가 490.73±62.63 mg%로 가장 높았으며, 현미식초가 193.97±34.58 mg%로 다음으로 높았으며, 홍국식초가 60.29±1.21 mg%로 가장 적게 함유된 것으로 나타났다. 식초에서 lactic acid가 검출되는 이유는 식초 제조를 위한 당질의 알코올 발효 초기에 젖산균이 번식하여 생성된 것이라고 보고하였다(Shoji 등, 1963;Entani 등, 1985). 세 가지 식초에 대한 총 유기산 함량은 홍국식초>오곡초>현미식초 순으로 나타났다. 시판 현미식초에 주정을 첨가하여 발효를 진행할 때 acetic acid 함량은 6240~6890 mg%(Kim

등, 2009)로 홍국식초와 비슷한 결과를 나타냈지만 현미식초와 오곡초는 이보다 낮은 것으로 나타났다. 현미식초에 주정을 첨가하여 발효를 진행한 식초의 lactic acid는 50mg%로 본 실험에서 연구된 세 가지 식초보다 적게 함유된 것으로 비교되었다.

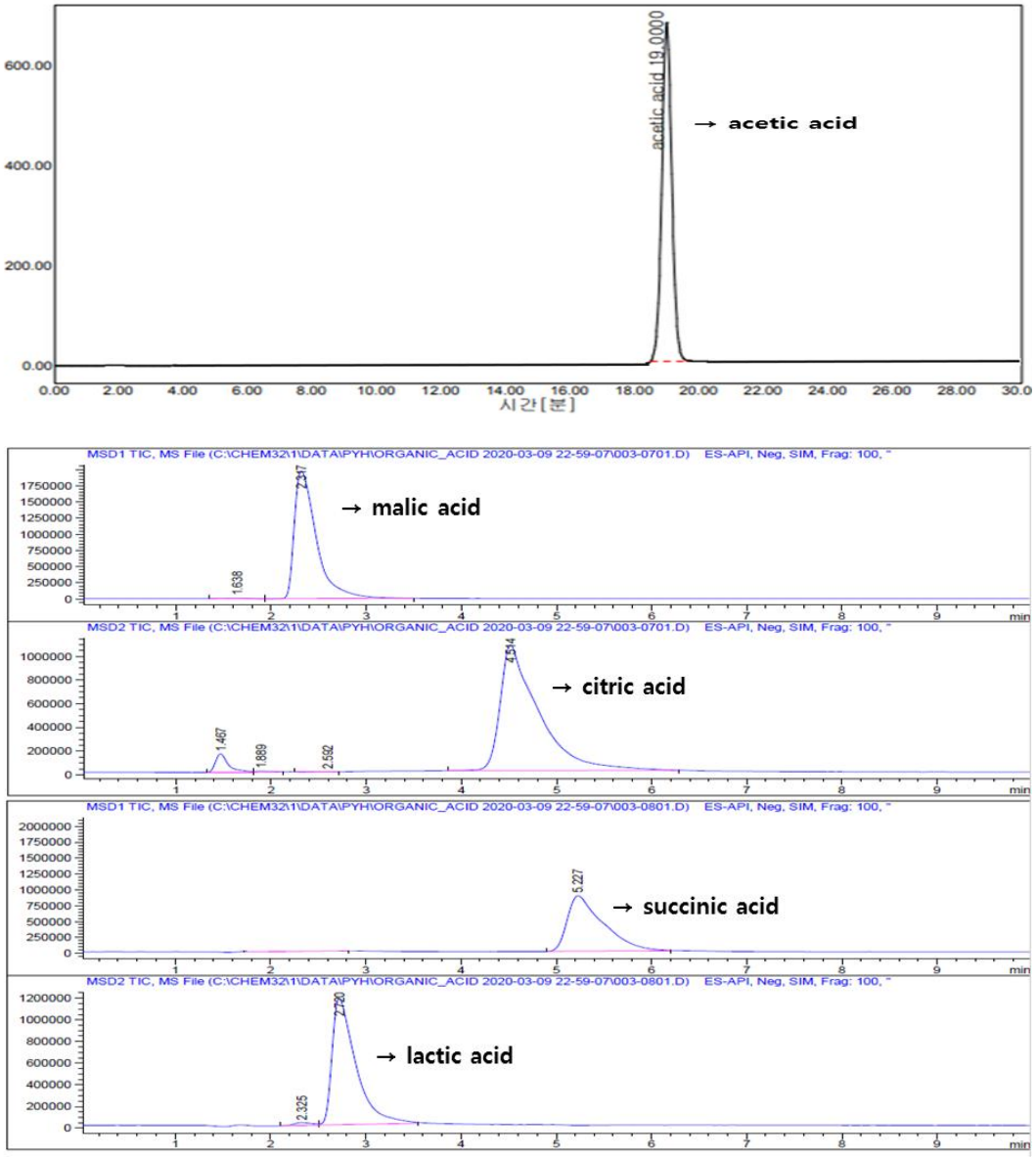
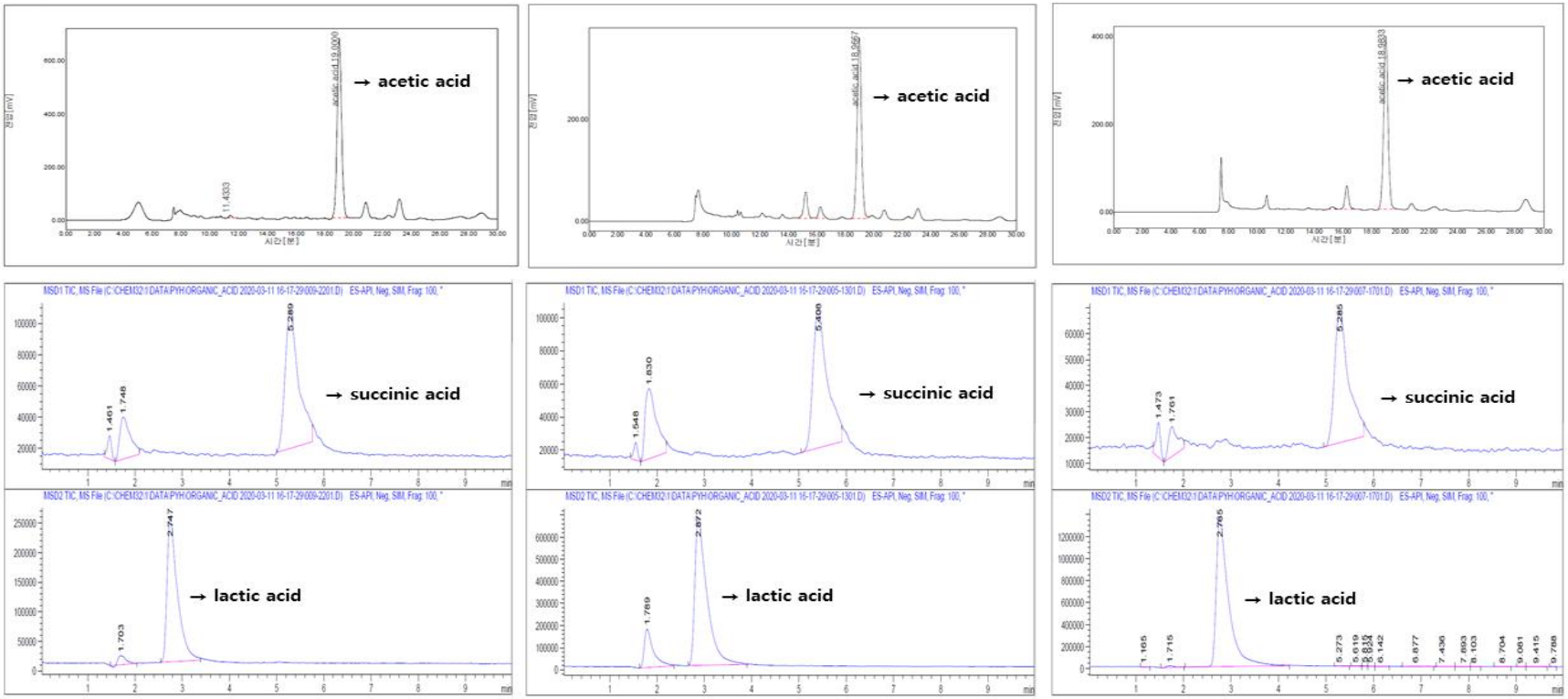


Figure 6. Chromatograms of organic acid standards.

(A) (B) (C)


→ acetic acid
→ acetic acid
→ acetic acid
→ succinic acid
→ succinic acid
→ succinic acid
→ lactic acid
→ lactic acid
→ lactic acid

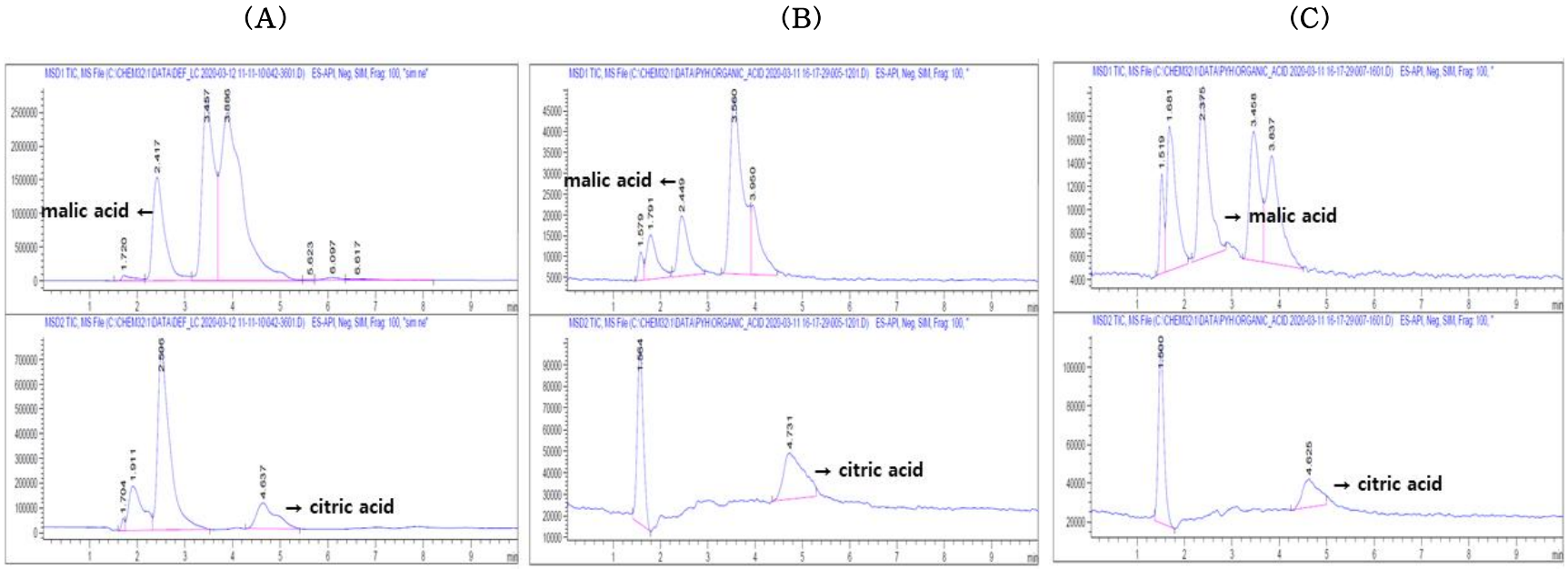


Figure 7. Chromatograms of vinegar samples.

(A) *Monascus*-fermented grain vinegar, (B) Brown rice vinegar, (C) Five kinds of cereals vinegar.

Table 4. Organic acid contents of vinegar samples.

vinegar	organic acid (mg%)					Total organic acid
	acetic acid	citric acid	malic acid	lactic acid	succinic acid	
MV	6830.17±87.61$^{aA1)}$	0.43±0.06^{B}	7.43±1.41^{B}	60.29±1.21^{cB}	37.84±2.55^{aB}	6936.16±92.84^{a}
BV	3673.03±16.02^{cA}	0.47±0.01^{C}	7.09±1.22^{C}	193.97±34.58^{bB}	38.71±3.19^{aC}	3913.26±55.02^{c}
CV	5663.30±29.63^{bA}	0.59±0.01^{C}	6.55±1.48^{C}	490.73±62.63^{aB}	25.00±5.06^{bC}	6186.16±98.81^{b}

MV: Monascus-fermented grain vinegar, BV: Brown rice Vinegar CV: Five kinds of cereals vinegar. All values are means of d eterminations in three independent experiments. Values are means±standard deviation. [1)] Means with different superscripts in a row (A-C) and a column (a-c) are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

3. 항산화 활성 측정

1). ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거활성은 ABTS diammonium salt와 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS free radical이 식초 시료의 항산화 물질에 의해 제거되어 free radical 특유의 청록색이 탈색되는 정도를 측정하여 항산화제인 trolox 등량값으로 나타낸 결과는 Table 5와 같다(Lee 등, 2014). ABTS 라디칼 소거활성 결과는 홍국식초가 0.15±0.00mg TE/mL로 가장 높았다. 홍국식초는 현미식초(0.13±0.00mg TE/mL)에 비해 소거활성이 1.1배 높았으며, 오곡초(0.09±0.00mg TE/mL)보다 소거활성이 1.7배 높은 것으로 나타났다.

2) DPPH 라디칼 소거활성

DPPH는 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여 환원되어짐에 따라 짙은 자색이 탈색되어지는 원리를 이용하여 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 탐색하기 위해 많이 이용되고 있다(Jeong 등, 2009). DPPH 라디칼 소거활성 결과는 홍국식초가 0.07±0.00mg TE/mL으로 가장 높았으며, 현미식초(0.01±0.00mg TE/mL) 보다 소거활성이 7배 높았으며, 오곡초(0.02±0.00mg TE/mL)보다 3.5배 높은 것으로 나타났다.

3) FRAP(ferric reducing antioxidant power)

FRAP 활성은 화합물의 환원력(ferric reducing ability)을 측정하는 것으로 Fe3+-TPTZ이 환원제에 의해서 Fe2+-TPTZ으로 환원되는 원리를 이용한 것이며, 이는 DPPH 및 ABTS 실험방법과는 다른 메커니즘의 항산화 활성 측정 방법이다(Jung 등, 2017;Yoo 등, 2007). 홍국식초의 환원력은 0.25±0.00mg

TE/mL으로 가장 높았으며, 현미식초와 오곡초는 각각 0.13±0.00mg, 0.07±0.00mg TE/mL으로 나타났다. 따라서 세 가지 시료 중 오곡초는 가장 환원력이 낮은 것으로 나타났다.

세 가지 식초의 전체적인 항산화 활성 결과는 Table 5와 같다. 홍국식초는 평균 항산화활성이 0.12mg TE/mL로 나타나 항산화능이 가장 높은 것으로 나타났으며, 현미식초보다 1.8배, 오곡초보다 2.7배 높은 것으로 나타났다 (p<0.05). 항산화 활성의 지표 물질은 Phenolic acid와 flavonoid 화합물이라 하였으며, Phenolic 화합물의 농도가 상승할수록 증가한다고 보고하였다(Kang 등, 1996). 또한 현미 식초에 비해 홍국발효 콩 함유 식초의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능이 최대 6.3~7.9배 더 높은 것으로 나타났으며, 이는 홍국발효 콩에 함유된 이소플라본 등의 항산화 물질이 기초 기질에 용출되어 나타난 결과라고 보고하였다(Hwang 등, 2016). 또한 홍국균 발효콩의 isoflavones 함량을 측정하였을 때 대부분이 발효과정 중 aglycon 형태로 전환되어 체내 이용률이 높고 유해한 활성산소를 제거하는 항산화 활성이 높다고 보고되었다(Kim 등, 2008). 따라서 본 연구에서 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성, 환원력을 분석한 결과, 항산화활성과 항산화성분(폴리페놀, 플라보노이드 함량)이 유사한 경향을 나타내는 것으로 보아, 식초의 항산화활성에 주요 관여물질을 폴리페놀, 플라보노이드 성분인 것으로 사료되며, 홍국식초가 현미식초와 오곡초 보다 항산화 활성이 우수하며, 항산화 성분이 보다 풍부한 식초인 것으로 사료된다.

Table 5. Antioxidant activity of vinegar samples.

vinegar	mg TE/mL		
	ABTS radical scavenging	DPPH radical scavenging	FRAP
MV	0.15±0.00$^{aB1)}$	0.07±0.00^{C}	0.25±0.00^{aA}
BV	0.13±0.00^{bA}	0.01±0.00^{B}	0.13±0.00^{bA}
CV	0.09±0.00^{cA}	0.02±0.00^{C}	0.07±0.00^{cB}

MV: Monascus-fermented grain vinegar, BV: Brown rice Vinegar CV: Five kinds of cereals vinegar. All values are means of determinations in three independent experiments. Values are means±standard deviation. [1)] Means with different superscripts in a row (A-C) and a column (a-c) are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

4. *In vitro* 소화효소 활성 저해작용

1) α-Amylase 저해작용

α-Amylase는 전분이나 글리코겐과 같이 α-결합의 glucose로 구성되어 있는 다당류의 α-D-(1,4)-glucoside 결합을 분해하는 효소로서, 탄수화물 대사에 필수적인 효소이다(Lee 등, 2008). 이러한 효소의 활성이 저해될 경우, 식사를 통해 체내로 들어온 전분의 분해와 흡수가 감소되어 혈중으로 유리되는 당의 양이 감소됨으로써 혈당 조절 역할을 할 수 있다. 따라서 인슐린 비의존형 당뇨와 비만 및 고혈당증과 같은 질환에서 혈당상승에 관여하는 α-amylase의 저해활성은 혈당 상승억제 지표로서의 역할을 한다(Kim 등, 2011). 세 가지 식초 추출물의 *in vitro* 소화효소에 의한 항당뇨 활성을 알아보기 위해 α-amylase 저해 활성을 측정한 결과는 Figure 8과 같다. 세 가지 식초 모두 농도 의존적(0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 mg/mL)으로 α-amylase 저해활성이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다($p<0.05$). 특히 0.05 mg/mL 이후부터 홍국식초의 α-amylase 저해활성은 현미식초와 오곡초에 비해 유의적으로 더 높은 저해활성을 갖는 것으로 비교되었다($p<0.05$). 홍국식초의 경우, 0.2 mg/mL일 때 α-amylase 저해활성은 91.33%로 나타나 현미의 36.25%, 오곡식초의 38.20%에 비해 모두 50% 이상 더 높은 저해활성으로 비교되었다. 또한 0.3 mg/mL 농도일 때, 99%의 저해율을 나타내어 선행연구에서 보고된 삼잎국화, 꾸지뽕 열매 및 잎, 줄기를 이용하여 제조한 식초 원액의 α-amylase 저해효과인 80-90%(Ko 등, 2017) 보다 더 높은 저해활성을 보여 주었다.

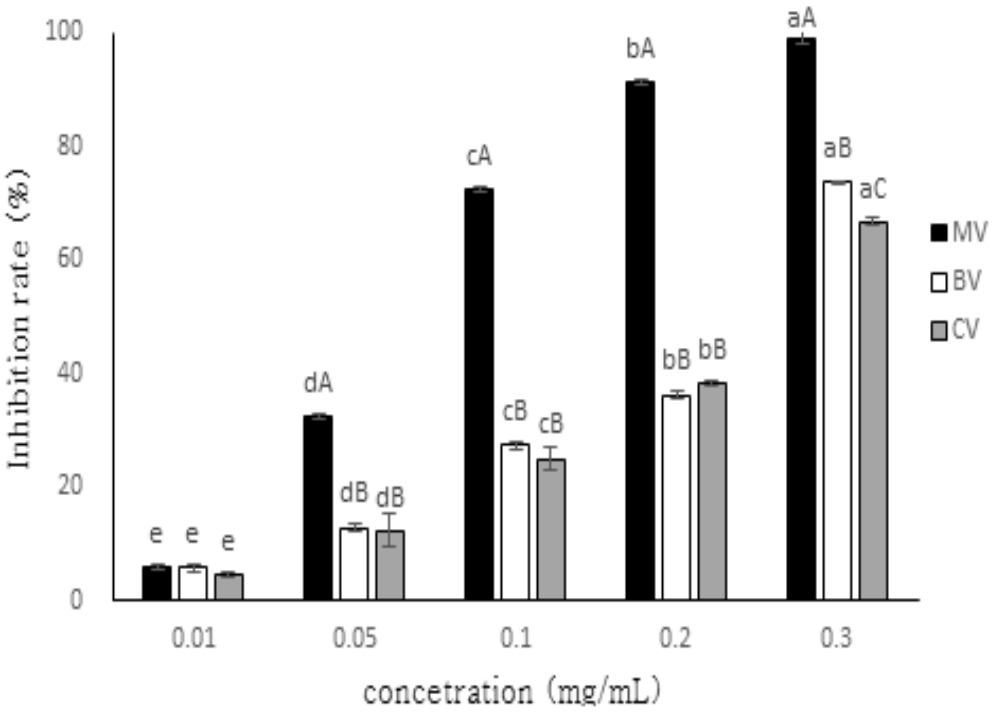


Figure 8. Effect of vinegar samples on the α-amylase inhibition activity

MV: Monascus-fermented grain vinegar, BV: Brown rice Vinegar CV: Five kinds of cereals vinegar. All values are means of determinations in three independent experiments. Means with the same lettered superscripts on the bar are not significantly different at the 5% level.

2) α-Glucosidase 저해작용

α-Glucosidase는 소장점막의 미세융모막에 존재하는 효소로서, 다당류의 탄수화물을 단당류로 분해하여 탄수화물의 소화와 흡수에 필수적으로 관여하는 효소인 동시에 경구혈당강하제로 사용되고 있다(Standl 등, 1999). α-Glucosidase의 활성이 저해되면 포도당 흡수가 억제되어 식후의 혈당상승을 감소시킬 수 있다. 특히 저혈당의 부작용을 일으키지 않는 큰 장점을 갖고 있어 α-glucosidase 저해 활성을 갖는 천연물질에 대한 탐색은 활발하게 진행되어 왔다(Kim 등, 2009). 따라서 본 연구에서는 *in vitro* 소화효소 저해활성을 통한 식초 시료의 항당뇨 활성을 알아보기 위해 α-glucosidase 저해 활성을 측정한 결과는 Figure 9와 같다. 그림과 같이 세 가지 식초시료의 각기 다른 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/mL)에 따른 α-glucosidase 저해활성의 결과는 농도 의존적으로 증가하였다. 홍국식초의 경우, 모든 농도에서 α-glucosidase 저해활성은 다른 식초보다 유의적으로 높게 나타났다($p<0.05$). 예를들어, 홍국식초는 0.2 mg/mL일 때 α-glucosidase 의 저해활성이 98.98%까지 증가하였으나, 현미식초와 오곡초는 0.3 mg/mL일 때 비로소 각각 95.40%와 96.42%로 나타나 홍국식초가 상대적으로 1.5배나 낮은 농도에서도 보다 더 강한 저해활성을 갖는 것으로 평가되었다. 보리수 열매 식초를 60일간 자연 발효 시켰을 때, α-glucosidase저해 활성은 원액 식초에서 85.42%라고 보고하여(Cho 등, 2017), 홍국식초의 α-glucosidase 저해 활성이 상대적으로 매우 높다는 것을 알 수 있다.

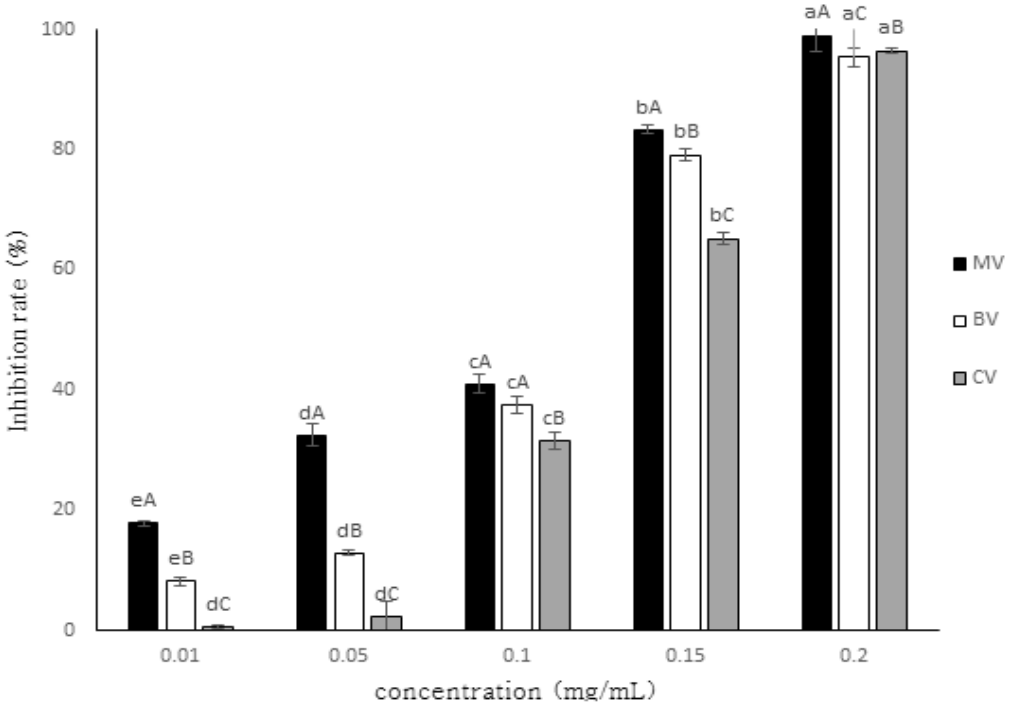


Figure 9. α-glucosidase inhibition activity of vinegar samples.

MV: Monascus-fermented grain vinegar, BV: Brown rice Vinegar CV: Five kinds of cereals vinegar. All values are means of determinations in three independent experiments. Means with the same lettered superscripts on the bar are not significantly different at the 5% level.

3) Pancreatic lipase 저해작용

식이로 섭취한 지방의 분해와 흡수는 장내 낮은 pH에 의한 물리·화학적인 지방의 변화와 함께, 여러 가지 소화효소의 작용이 동반되는 매우 복잡한 경로를 거쳐 진행된다(Kim 등, 2011). 이중 pancreatic lipase는 지방의 물질대사에 관여하는 효소로, 지방의 소화를 진행하고 장내 상피세포가 분해 산물을 흡수하도록 돕는다. 따라서 lipase의 활성이 저해되면, 혈중의 지방흡수를 저하시킬 수 있어 체중 증가와 더불어 당뇨, 동맥경화, 심혈관질환 등의 위험에 노출되는 것을 방어할 수 있다(Kim 등, 2006). 본 연구에서 세 가지 식초 추출물의 lipase 저해 활성을 측정한 결과는 Figure 10과 같이 나타났다. 그림에서와 같이 모든 식초 추출물은 전체적으로 농도(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL) 의존적인 lipase 저해활성의 경향을 나타내었다 ($p<0.05$). 홍국식초의 경우, 0.2 mg/mL에서의 저해활성이 19.31%에서 1 mg/mL의 농도일 때 97.50%까지 증가하였고, 현미식초와 오곡초의 경우도 각각 23.21%에서 97.41%, 9.21%에서 96.28%까지 저해활성이 증가하는 것으로 나타났다. 보리수 열매 식초를 60일간 자연 발효 시켰을 때 pancreatic lipase 저해 활성은 원액 식초에서 53.66%라는 결과(Cho 등, 2017)와 비교하면, 본 연구에 사용한 세 가지 식초 추출물의 지방 분해효소의 활성이 더 높다는 것을 알 수 있다. 세 가지 식초 시료간의 지방분해 효소인 pancreatic lipase에 대한 유의적인 저해활성의 크기는 0.4-0.8mg/mL 농도에서 홍국식초가 약간 더 높은 것으로 비교되었다.

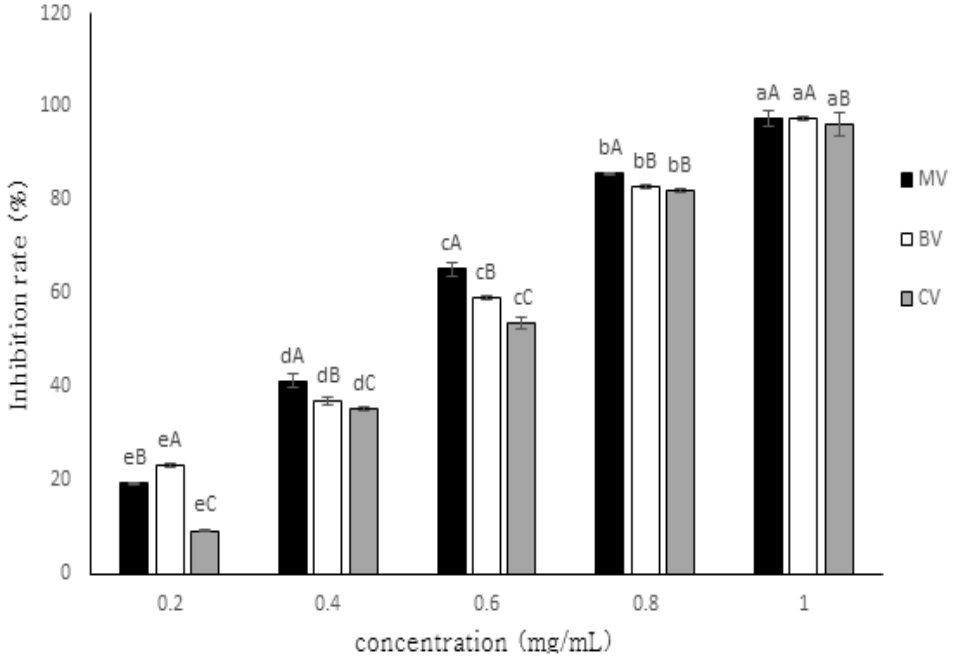


Figure 10. lipase inhibition activity of vinegar samples.

MV: Monascus-fermented grain vinegar, BV: Brown rice Vinegar CV: Five kinds of cereals vinegar. All values are means of determinations in three independent experiments. Means with the same lettered superscripts on the bar are not significantly different at the 5% level.

한편, 세 가지 식초 추출물의 소화효소 저해작용에 대한 IC_{50} (Half maximal inhibitory concentration)을 측정한 결과는 Table 6과 같다. α-Amylase와 α-glucosidase 저해활성에 대한 홍국식초의 IC_{50}은 각각 0.10 mg/mL와 0.09 mg/mL의 농도로 나타나 세 가지 식초 중 탄수화물 가수분해 효소에 대한 저해활성이 가장 높은 것을 확인할 수 있다. 특히 동일농도에서 positive control인 acarbose 저해활성에 비해, 홍국식초 추출물은 α-amylase는 50%, α-glucosidase는 90%의 저해활성을 각각 함유하는 것으로 비교되었다. 혈당 조절제이면서 비만억제의 수단으로 개발된 acarbose는 설사와 복통 등의 부작용이 보고되어 천연소재의 대체물의 탐색은 매우 필요한 실정이다. Pancreatic lipase 저해활성에 대한 홍국식초의 IC_{50}은 0.48 mg/mL로 나타나, 다른 식초에 비해 지방가수분해 효소에 대한 저해활성이 높은 것으로 비교되나, positive control로 사용한 orlistat에 비하면 약 15% 활성을 갖는 것으로 평가되었다. Oristat 역시 비만과 당뇨 치료물질로 그 효능이 우수하지만 위장장애, 과민증, 담즙분비 장애, 그리고 지용성 비타민 흡수 억제 등의 부작용이 나타나는 것으로 보고되었다(Kim 등, 2018). 따라서 탄수화물과 지방의 소화효소를 억제하는 동시에 부작용이 없거나 위해 요소가 미미한 새로운 소재를 탐색하고자 실행한 본 연구의 결과는, 곡물식초인 현미와 오곡식초에 비해 홍국발효물을 이용한 홍국식초가 소화효소인 α-amylase, α-glucosidase, 그리고 pancreatic lipase에 대해 뚜렷한 저해활성을 갖는 것으로 측정되었다. 그러나 지방가수분해 효소에 대한 홍국식초의 저해활성은 대조군인 oristat에 비해 미약한 것으로 비교되었다.

본 실험의 이 같은 결과는, 세 가지 식초 추출물에 함유된 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, 그리고 유기산 함량과 밀접하게 관계되는 것으로 나타났다. 즉 홍국식초>현미식초>오곡초 순으로 이들 생리활성 성분의 함량이 높게 나타나, 이들 결과에 따라 세 가지 소화효소에 대한 저해활성도의 순서

도 동일하게 측정되었다. 따라서 본 실험에 사용한 곡물식초의 소화효소 저해 활성은, 자체 내에 함유된 페놀화합물과 유기산의 농도에 따른 결과로 추정되지만 구체적인 관련 화합물은 추후의 연구를 통해 밝혀내야 한다. 특히 세 가지 소화효소들에 대한 저해활성이 가장 우수했던 홍국식초의 대사체 물질 규명과 함께 항당뇨와 항비만에 미치는 생화학적 기전 등이 추가적인 연구를 통해 규명되어야 할 것이다.

Table 6. IC_{50} value of digestive enzyme inhibition activity of vinegars and positive controls.

	IC_{50} (mg/mL)		
	α-amylase inhibition activity	α-glucosidase inhibition activity	pancreatic lipase inhibition activity
MV	$0.10\pm0.00^{cB1)}$	0.09 ± 0.00^{dC}	0.48 ± 0.00^{bA}
BV	0.22 ± 0.00^{bB}	0.11 ± 0.00^{bC}	0.50 ± 0.01^{bA}
CV	0.23 ± 0.01^{aB}	0.12 ± 0.00^{aC}	0.55 ± 0.01^{aA}
Acarbose	0.05 ± 0.01^{d}	0.10 ± 0.01^{c}	-
Orlistat	-	-	0.07 ± 0.01^{c}

MV: Monascus-fermented grain vinegar, BV: Brown rice Vinegar CV: Five kinds of cereals vinegar. IC_{50} : Half maximal inhibitory concentration. All values are means of determinations in three independent experiments. Values are means±standard deviation. [1)] Means with different superscripts in a row (A-C) and a column(a-d) are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

5. 지방전구세포 분화에 대한 영향

1) 세포 독성 측정(Cell viability assay)

세 가지 식초 추출물의 3T3-L1 지방전구세포(preadipocyte)에 대한 세포독성 여부를 조사하기 위해 MTT assay를 실시하였다. 일반적으로 세포의 적정 생육 조건은 pH 6.9-7.8의 범위로 알려진다(Park 등, 2014). 식초시료 추출물에 함유된 유기산 성분이 세포의 생육에 영향을 미치는 것을 방지하기 위해 추출물의 pH를 평가한 결과, 모든 시료의 pH는 7로 측정되었다. 3T3-L1 전지방세포의 생존에 미치는 시료의 영향을 조사하기 위해 각 시료의 농도를 50, 100, 500, 1000, 5000 μg/mL의 농도로 24시간 처리하였을 때, 지방전구세포의 생존율을 측정한 결과는 Figure 11과 같다. 세포만 배양한 대조군(control)의 생존율을 100%로 기준했을 때, 세 가지 식초 시료 모두 50-500 μg/mL까지는 80% 이상의 생존율을 유지하였으나, 처리농도가 증가할수록 세포의 생존율이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 3T3-L1 지방전구세포의 성장에 영향을 주지 않고 세포독성을 나타내지 않는 농도인 50 μg/mL과 500 μg/mL에서 지방세포 분화에 대한 억제 효과 평가를 수행하였다.

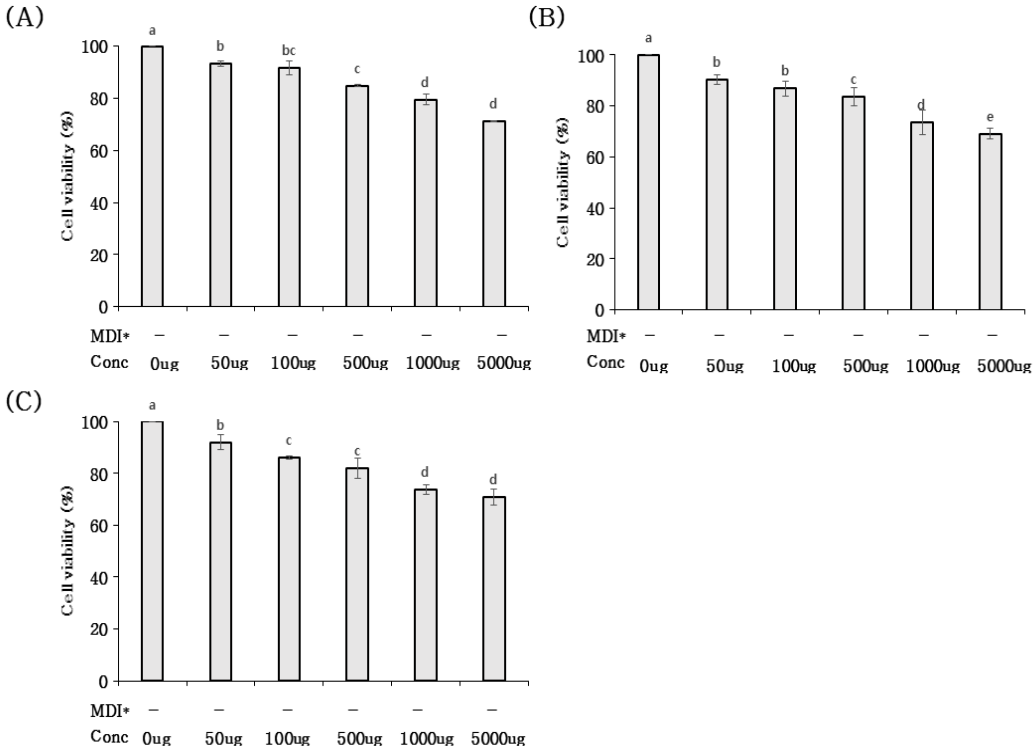


Figure 11. Effects of vinegars on cell viability of 3T3-L1 preadipocytes.

3T3-L1 preadipocytes were treated with various concentrations (0, 5, 50, 100 and 500ug/mL) of vinegars. (A) Monascus-fermented grain vinegar (B) Brown rice vinegar (C) Five cereals vinegar. Cell viability was calculated using MTT assay. MDI: 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), 1 μM dexamethasone, 10 μg/ml insulin. All values are means of determinations in three independent experiments. Values are means±standard deviation. Means with the same lettered superscripts on the bar are not significantly different at the 5% level.

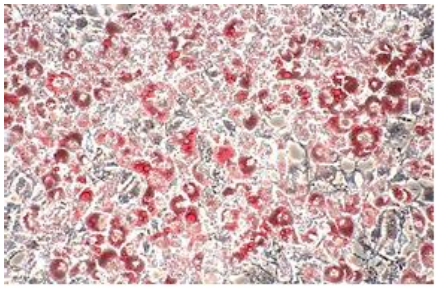
2) 3T3-L1 지방전구세포의 lipid droplet 생성에 미치는 영향

세 가지 식초 추출물이 3T3-L1 전지방세포의 지방구 형성에 미치는 영향을 확인하였다. 지방전구세포의 분화 유도와 함께 식초 추출물이 독성을 나타내지 않는 농도(50, 500 μg/mL)로 처리할 때, 지방구 형성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 Oil Red O 염색한 후 lipid droplet 생성 정도를 위상차 현미경으로 관찰한 결과는 Figure 12(A)와 같다. 그림에서 보듯이, 대조군의 세포질 내 lipid droplet의 형성은 과다하게 축적되었으나, 식초추출물 시료의 처리군은 지방구 형성이 억제되는 것으로 나타났으며, 특히 홍국식초의 처리군(500 μg/mL)에서 lipid droplet 형성이 다른 시료군에 비해 유의적으로 보다 더 억제되는 것으로 나타났다(P<0.05). Lipid droplet은 지방세포의 분화 중 생성되는 인지질 단분자층으로 둘러싸여 있는 비활성 소낭으로, 소포체의 이중막 사이에 중성지방과 cholesterol이 축적되어 만들어진다(Padilla 등, 2016). Oil Red O는 중성지방 및 cholesterol만 염색시키고 그 외 인지질이나 유리지방산 등은 염색시키지 않기 때문에 lipid droplet을 염색하여 지방전구세포의 지방축적 정도를 확인 할 수 있다(Kim 등, 2018).

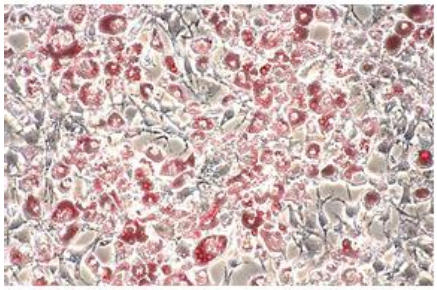
염색된 세포를 isopropanol로 용출시켜 세포 내 지방축적 정도를 측정한 결과는 Figure 12(B)에 나타내었다. 세포만을 배양한 대조군의 지방축적 정도를 100%로 하였을 때, 식초추출물 시료의 투여량이 증가함에 따라 지방축적 정도가 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보여 주었다(P<0.05). 각 식초 추출물의 농도를 500 μg/mL으로 처리한 결과는 Figure 12(B)에서와 같이 50 μg/mL을 투여하였을 때 보다 지방축적률이 홍국식초는 14.9% 감소하여 67.92%, 현미식초는 5.13% 감소하여 81.65%, 오곡초는 7.92% 감소하여 83.06%로 측정되었다. 따라서 세 가지 식초추출물의 지방축적 억제능력은 홍국식초>현미식초>오곡초 순으로 나타나, 홍국식초 추출물이 현미식초와 오곡초의 추출물보다 lipid

droplet 형성을 저해하는 효과가 가장 높은 것으로 평가되었다. 이 같은 결과는, 토마토 식초(Lee 등, 2018)와 미나리 발효 식초(Park 등, 2014)의 3T3-L1 세포에 대한 지방 축적률이 500 μg/mL에서 모두 약 70%라고 한 결과와 유사하지만, 본 실험의 홍국식초는 67.92%로 나타나 이들 시료들 보다 홍국식초의 지방축적 억제능력이 보다 우수할 것으로 기대되었다.

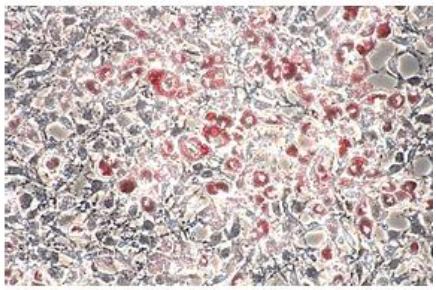
(A)



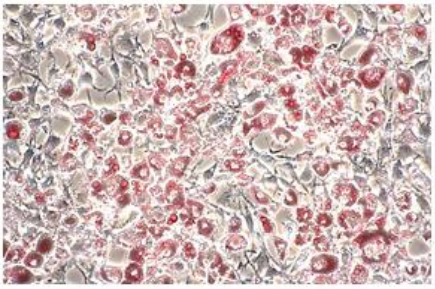
control



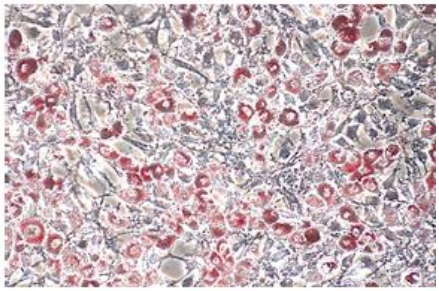
MV 50ug



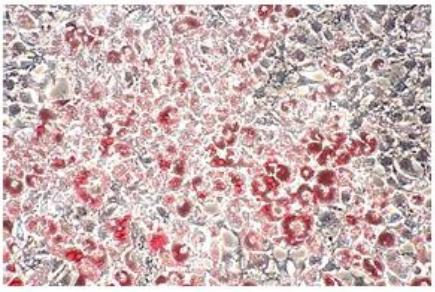
MV 500ug



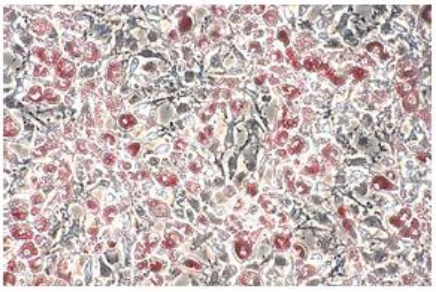
BV 50ug



BV 500ug



CV 50ug



CV 500ug

(B)

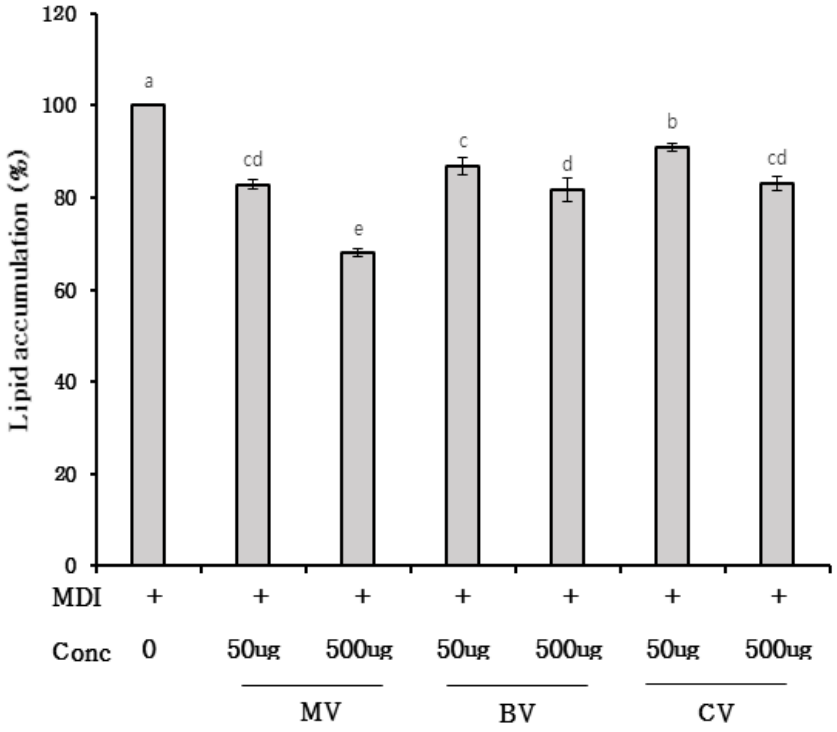


Figure 12. Inhibitory effects of vinegars on Oil Red O staining and lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 adipocytes.

MV: Monascus-fermented grain vinegar, BV: Brown rice Vinegar CV: Five kinds of cereals vinegar. (A) Intercellular triglycerides were stained with Oil Red O and observed 20x magnification. (B) Quantified by measuring the lipid accumulation. MDI : 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), 1 μM dexamethasone, 10 μg/ml insulin. All values are means of determinations in three independent experiments. Values are means±standard deviation. Means with the same lettered superscripts on the bar are not significantly different at the 5% level.

Ⅳ. 요약 및 결론

다양한 생리적 활성의 기능이 보고되어 온 홍국균(*Monascus pilosus*)을 현미와 서리태에 접종하여 홍국 발효물을 생산한 다음, 이들 발효곡물을 이용하여 홍국발효곡물 식초를 제조하여 *in vitro* 항당뇨 효과를 측정하였다. 제조된 식초의 *in vitro* 항당뇨 활성의 측정은 α-amylase, α-glucosidase, 그리고 lipase에 대한 저해활성 및 항산화 활성(ABTS, DPPH, FRAP), 그리고 지방전구세포인 3T3-L1에 대한 영향을 측정하여 시판되는 천연발효 곡물식초인 현미식초와 오곡초를 대조군으로 하여 그 결과를 비교 평가한 결과는 다음과 같다.

1. 세 가지 식초의 pH는 3.13~3.32였으며, 총산은 4.00~7.21%로 우리나라 식초의 품질규격인 4.0~29.0%의 범위 내에 분포되어 모든 시료가 식품기준에 적합한 품질규격으로 나타났다.

2. 총 폴리페놀 함량을 gallic acid 등량값으로 환산할 때 홍국식초가 0.83±0.06mg GAE/mL로 가장 높았으며, 현미식초가 0.74±0.02mg GAE/mL으로 다음 순이었으며, 오곡초가 0.63±0.01mg GAE/mL로 총 폴리페놀 함량이 가장 적은 것으로 나타났다.

3. 총 플라보노이드 함량을 quercetin 등량값으로 나타낼 때 홍국식초가 0.11±0.00mg QE/mL로 가장 높았으며 현미식초는 0.10±0.00mg QE/mL, 오곡초는 0.07±0.00mg QE/mL로 가장 낮은 함량으로 비교되었다.

4. 유기산 함량은 HPLC, 및 LC/MS를 이용하여 분석하였고, acetic acid, malic acid, citric acid, lactic acid, succinic acid 등 총 5가지의 유기산이 검출되었으며, 그 중 acetic acid 함량이 가장 높은 것으로 나타나 식초의 주요 유기산으로 확인되었다. 세 가지 식초에 대한 총 유기산 함량은 홍국식초(6936.16 mg%)>오곡초(6186.16 mg%)>현미식초(3913.26 mg%) 순으로 나타났다.

5. 항산화 활성은 ABTS 라디칼 소거활성, DPPH 라디칼 소거활성, 환원력 측정의 FRAP을 적용하였다. 세 가지 측정방법을 통한 세 가지 시료의 항산화 활성은 홍국식초 0.47mM TE/mL, 현미식초 0.27mM TE/mL, 오곡식초 0.18mM TE/mL로 홍국식초의 항산화활성이 현미식초보다 1.74배 높았으며, 오곡초보다 2.6배 높은 것으로 나타났다.

6. 식초시료의 *in vitro* 혈당저하효소를 측정하기 위해 α-amylase 저해작용, α-glucosidase 저해작용, pancreatic lipase 저해작용을 측정하였다. 그 결과 α-Amylase와 α-glucosidase 저해활성에 대한 홍국식초의 IC_{50}은 각각 0.10 mg/mL와 0.09 mg/mL의 농도로 각각 나타나 세 가지 식초 중 탄수화물 가수분해 효소에 대한 저해활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 특히 동일농도에서 positive control인 acarbose 저해활성에 비해, 홍국식초 추출물은 α-amylase는 50%, α-glucosidase는 90%의 저해활성을 각각 함유하는 것으로 비교되었다. Pancreatic lipase 저해활성에 대한 홍국식초의 IC_{50}은 0.48 mg/mL로 나타나, 다른 식초에 비해 지방가수분해 효소에 대한 저해활성이 높은 것으로 비교되나, positive control로 사용한 orlistat에 비하면 약 15% 활성을 갖는 것으로 평가되었다.

7. 식초가 지방전구세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 전에 MTT assay를 통해 지방전구세포의 성장에 영향을 주지 않으면서 세포독성을 나타내지 않는 농도를 결정하였다. 세 가지 식초 모두 50~500 μg/mL까지는 80% 이상의 생존율을 유지하여 50 μg/mL과 500 μg/mL 농도의 수준에서 지방세포분화에 대한 억제 효과 평가를 수행하였다.

8. 지방전구세포의 분화 유도와 함께 식초 추출물이 독성을 나타내지 않는 농도(50, 500 μg/mL)로 처리할 때, 지방구 형성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 Oil Red O 염색한 후 lipid droplet 생성정도를 측정한 결과는 50 μg/mL을 투여하였을 때 보다 500 μg/mL를 투여하였을 때 지방축적률이 홍국식초는 14.9% 감소하여 67.92%, 현미식초는 5.13% 감소하여 81.65%, 오곡초는 7.92% 감소하여 83.06%로 측정되었다. 따라서 세 가지 식초추출물의 지방축적 억제능력은 홍국식초>현미식초>오곡초 순으로 나타나, 홍국식초 추출물이 현미식초와 오곡초의 추출물보다 lipid droplet 형성을 저해하는 효과가 가장 높은 것으로 평가되었다.

9. 따라서 *in vitro* 실험결과, 홍국식초는 총페놀화합물, 총플라보노이드, 유기산 등의 생리활성 성분이 다른 곡물식초에 비해 풍부하며, 항산화 활성도 가장 우수한 결과로 나타났다. 또한 혈당저하 및 지방 가수분해 효소와 관련된 소화효소에 대한 저해작용도 가장 높은 것으로 평가되었다. 나아가 홍국식초는 지방세포의 분화를 효과적으로 억제하는 것으로 나타나 항비만 효과에 따른 항당뇨에 대한 잠재적 효과가 확인되었다. 따라서 향후 홍국식초의 대사체 물질 규명과 함께 항당뇨와 항비만에 미치는 생화학적 기전 등의 추가적인 연구를 수행한다면 건강 기능성식품으로의 활용 가능성이 높을 것으로 기대할 수 있다.

Ⅴ.참고문헌

Alonso AM, Castro R, Rodriguez MC, Guillen DK, Barosso CG. (2004). Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from sherry wines and correlation with their content in polyphenols. Food Res Int 37, 715-721.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology, 28(1), 25-30.

Benzie IF, Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry, 239(1), 70-76.

Bidlack WR, Omaye ST, Meskin MS, Topham DK. (2000). Phytochemicals as bioactive agents. CRC Press Co., Boca Raton, FL, USA, 25-36.

Baek CH, Jeong DH, Baek SY, Choil JH, Park HY, Choi HS, Jeong ST, Kim JH, Jeong YJ, Kwon JH, Yeo SH. (2013). Quality characteristics of farm-made brown rice vinegar via traditional static fermentation. Korean J Food Preserv. 20(4), 564-572.

Choi MY, Kwak EJ, Lim SI. (2004). Stability and Isolation of Monacolin K from Red Yeast Rice. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 33(6), 1022-1027.

Cha MR, Park JH, Choi YH, Choi W, Hong KS, Choi SU, Kim YS, Kim YK, Kim YH, Ryu SY. (2009). Alpha-glucosidase inhibitors from the branches extract of Continus coggygria. Korean J Pharmacogn 40, 229-232.

Cho EK, Choi YJ. (2013). Antioxidant, Antidiabetic, and Anti-Inflammatory Effects of Extracts and Fractions from Parthenocissus tricuspidata Stems. Journal of Life Science. 23(3), 399-405.

Cho KM, Shin JH, Seo WT. (2013). Production of Korean Domestic Wheat (keumkangmil) Vinegar with Acetobacter pasteurianus A8. Koreann J. Food SCI. Technol. 45(2), 252-256.

Cho KM, Hwang CE, Joo OS. (2017). Change of physicochemical properties, phytochemical contents and biological activities during the vinegar fermentation of Elaeagnus multiflora fruit. Korean J. Food Preserv. 24(1), 125-133

Entani E. Masai H. (1985). Changes in flavor components and microbial flora during Fukuyama rice vinegar manufacture. J. Fement. Technol., 63, 211-220.

Hanefeld M. (1998) The role of acarbose in the treatment of noninsulindependent diabetes mellitus. Journal of Diabetes and its Complications, 12, 228-237.

Hwang JY, Cho HY, and 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(1), 149-154.

Jeong HS, Han JG, Ha JH, Kim Y, Oh SH, Kim SS, Jeong MH, Choi GP, Park UY, Lee HY. (2009). Antioxidant activites and skin-whitening effects of nano-encapsuled water extract from Rubus coreanus Miquel. Korean. J. Med. Crop Sci. 17, 83-89.

Jeon JP, Lee JB, Choi SY, Lee OS, Choi CS, Kwon GS. (2006). Optimal Conditions for Production of Water-soluble Monascus Natural Pigments by Monascus purpureus MK2. Kor. J. Microbiol Biotechnol. 34(3), 250-256.

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.

Jeong EJ, Kim KP, Bang BH. (2013). Quality Characteristics of Muffin Added with Red Yeast Rice and white rice. Korean J. Food & Nutr. 26(2), 177-183.

Jo YB. (2016). Effect of The Dendropanax Mobifera Nakai Extract on Anti-hypertensive and Anti-diabetic Activity. Department of Convergence Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University.

Jung KM, Kim SY, Lee SH. (2017). In vitro correlation and analysis of anti-oxidant and anti-inflammatory activities by fruit ripening of peach

cultivars. Korean Journal of Food Preservation, 24(5), 638-646.

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.

Kang YH, Kim DJ, Kim KK, Lee SM, Choe M. (2014). Study of the mechanisms underlying increased glucose absorption in Smilax china L. leaf extract-treated HepG2 cells. Journal of Nutrition and Health. 47(3), 167-175.

Kim YJ, Kim BH, Lee SY, Kim MS, Park CS, Rhee MS, Lee KH, Kim DS. (2006). Screening of medicinal plants for development of functional food ingredients with antiobesity. J Korean Soc Apl Biol Chem 49, 221-226.

Kim JH, Kim MY, Cho YJ. (2007). Isolation and Identification of Inhibitory Compound from Crataegi Fructus on α-amylase and α-glucosidase. Applied Biological Chemistry. 50(3), 204-209.

Kim JJ. (2008). Physicochemical characteristics and bioactivity compounds of soymilk from Monascus fermented soybean. Kookmin Univ.

Kim GR, Yoon SR, Lee JH, Yeo SH, Kim TY, Jeong YJ, Yoon KY, Kwon JH. (2009). Quality Comparison of Commercial Brown Rice Vinegar Fermented with and without Ethanol. Korean J. Food Preserv.16(6), 893-899.

Kim JE, Joo SI, Seo JH, Lee SP. (2009). Antioxidant and α-glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzymes. J Korean Soc Food Sci Nutr, 38, 989-995.

Kim HY, Lim SH, Park YH, Ham HJ, Lee KJ, Park DS, Kim JH, Kim SM. (2011). Screening of -Amylase, -Glucosidase and Lipase Inhibitory Activity with Gangwon-do Wild Plants Extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr. 40(2), 308-315.

Kim JH, Lee SY, Park JM, Park JH, Kwon OJ, Lee JY. (2014). Antioxidant activity and inhibition activity against -amylase and -glucosidase of Juniperus rigida Sieb extracts. Korean J Food Preserv. 21(3), 396-403.

Kim DS, Hurh BS, Shin KS. (2015). Chemical characteristics and immuno-stimulatory activity of polysaccharides from fermented vinegars manufactured with different raw materials. J Korean Soc Food Sci Nutr 5, 13-17.

Kim EH. (2018). Antioxidative activities and anti-adipogenesis effect of extrac ts from different parts of Cudrania tricuspidata and Morus alba. MT thesis. D uksung Women's University, Seoul, Kora.

Kim JI, Han DW, Yun JA, Baek HJ, Lim SW. (2018). Pancreatic Lipase Inhibitory Activity and Antioxidant Activity of Carrot Vinegar. KSBB Journal.

33(2), 104-109.

Ko HS. (2017). Development of Functional Vinegar using Cudrania tricuspidata Bureau and Rudbeckia laciniata var. hortensis, and Their Quality Characteristics. Mokpo university.

Lee YC, Jang OY, Kim HW, Choi CU, Yoon SK. (1999). Physicochemical characteristics of traditional vinegars in andong province. Korean J. Dietary Culture. 14, 17-20.

Lee BB, Park SR, Han CS, Han DY, Park EJ, Park HR, Lee SC. (2008). Antioxidant Activity and Inhibition Activity against -Amylase and -Glucosidase of Viola mandshurica Extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr. 37(4), 405-409.

Lee SJ. (2009). Development of a functional chungkookjang using Monascus-fermented soybean. Kookmin Univ.

Lee SM, Choi YM, Kin YW, Kim DJ, Lee JS. (2009). Antioxidant Activity of Vinegars Commercially Available in Korean Markets. Food Engineering Process. 13(3), 221-225.

Lee SJ. (2010). Lipase and α-Amylase Inhibitory Activity of Sarg assum thunberg ii Extracts. Pukyoung national university.

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.

Lee SY, Kim JH, Park JM, Lee IC, Lee JY. (2014). Antioxidant activity and inhibition activity against -amylase and -glucosidase of Smilax China L. Korean J Food Preserv. 21(2), 254-263.

Lee SH, Jang GY, Kim MY, Kim SJ, Lee YR, Lee JS, 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(8), 1186-1193.

Lee HB, Oh HH, Jun HI, Jeong DY, Song GS, Kim YS. (2018). Functional Properties of Tomato Vinegar Manufactured Using Makgeolli Seed Culture. J Korean Soc Food Sci Nutr. 47(9), 904-911.

Lee MS, Lee KS, Lee JJ. et al. (2020). Directions and Current Issues on the Policy of Prevention andManagement for Hypertension and Diabetes, and Developmentof Chronic Disease Prevention and Management Model in Korea.Journal of Agricultural Medicine and Community Health 45(1), 13-40.

Lee YJ. (2020). Antioxidant · Antidiabetic Activities and Quality Characteristics of Pasta Noodle Added with Capsicum annum L. cv. DangZo. The Graduate School Sookmyung Women's University.

Mcgill M, Felton AM. (2007). New global recommendations: A multi-disciplinary approach to improving outcomes in diabetes. Primary Care Diabetes, 1, 49-55.

Mooradian AD, Thurman JE. (1999). Drug therapy of postprandial hyperglycaemia. Drugs, 57, 19-29.

Na HS, Choi GC, Yang SI, Lee JH, Cho JY, Ma SJ, Kim JY. (2013). Comparison of characteristics in commercial fermented vinegars made with different ingredients. Korean Journal of Food Preservation. 20(4), 482-487.

Park SY, Chae KS, Son CR, Jung RH, Jung JH, Im YR, Kwon JW. (2012). Quality Characteristics and Antioxidant Activity of Bokbunja(Black Raspberry) Vinegars. Food Enginerring Process. 16(4), 340-346.

Park YH, Choi JH, Whang K, Lee SO, Yang SA and Yu MH. (2014). Inhibitory effects of lyophilized dropwort vinegar powder on adipocyte differentiation and inflammation. Journal of Life Science, 24(5), 476-484.

Padilla BT, Velez DC, Marsch MM, Castro MF, Kuri HW. (2016). Lipogenic en zymes complexes and cytoplasmic lipid droplet formation during adipogenesis. J Cell Biochem. 117(10), 2315-2326.

Park EH, Choi CY, Kwon HJ, Kim MD. (2016). Literature review on type and

manufacturing methods of korean traditional vinegar. Food Science and Industry. 49(4), 94-99.

Park YO. (2018). Quality Comparison of Natural Fermented Vinegars Manufactured with Different Raw Materials. J Korea Soc Food Sci Nutr. 47(1), 46-54.

Ravishankar D, Rajora AK, Greco F, Osborn HM. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. Int J Biochem Cell Biol. 45, 2821-2831.

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 biology and medicine, 26(9-10), 1231-1237.

Shoji, F. and Ryuzo, U. (1963). Contents of non-volatile organic acids in commercial vinegars. J. Ferment. Technol., 41, 14-19.

Singleton VL, Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture, 16(3), 144-158.

Standl E, Baumgartl HJ, Fŭchtenbusch M, Stemplinger J. (1999). Effect of acarbose on additional insulin therapy in type 2 diabetic patients with late

failure of sulphonylurea therapy. Diabetes Obes Metab, 1, 215-220.

Woo KS, Ko JY, Song SB, Lee JS, Kang JR, Oh BG, Nam MH, Jeong JH, Jeong HS, Seo MC. (2010). Physicochemical Characteristics of Vinegars Fermented from Cereal Crops with Incalgyun. J Korean Soc Food Sci Nutr. 39(8), 1171-1178.

Yoo KM, Kim DO. Lee CY. (2007). Evaluation of different methods of antioxidant measurement. Food science and biotechnology, 16(2), 177-182.

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry, 64(4), 555-559.

ABSTRACT

Effect of *Monascus*-fermented grain vinegar on *in vitro* anti-hyperglycemic enzyme (α -amylase, α -glucosidase) and pancreatic lipase

Noh Young Hee

Department of Food & Nutrition

Graduate School of

Sungshin University

Monascus philosus, which has been reported for various physiological activities, was inoculated with brown rice and Seoritae (black soybean) to produce *Monascus*-fermented products and then manufactured functional *Monascus*-fermented grain vinegar (MV) and used as a sample of this study. To Measure *in vitro* anti-hyperglycemic activity of MV, α -amylase, α -glucosidase, and pancreatic lipase inhibition activity were measured. Also, antioxidant activity (ABTS, DPPH, FRAP) and the effects on 3T3-L1 cell were measured. Brown rice vinegar (BV) and five cereals vinegar (CV), the natural fermented cereal vinegar sold on the market, were used as controls. The pH of the three vinegar samples is 3.13 to 3.32 and the total acidity (%) is 4.00% to 7.21%, which is within the quality standard of the vinegar in Korea. The total polyphenol content of MV was

investigated to 0.83±0.06 mg GAE(Gallic Acid Equivalent)/mL, which was 12.2% higher than BV and 31.7% higher than CV. The total flavonoid content of MV was also investigated to 0.11 ± 0.00 mg QE(Quercetin Equivalent)/mL, which was 10% higher than BV and 57.1% higher than CV, indicating that the flavonoid content also showed the same tendency as the total polyphenols. The organic acid content was analyzed using HPLC and five types of organic acids including acetic acid, malic acid, citric acid, lactic acid, and succinic acid were detected. Acetic acid among the organic acids was investigated to be the highest, so it was confirmed to be the main organic acid of vinegar. Three assay methods (ABTS, DPPH, FRAP) were used to measure antioxidant activity. Results of antioxidant activity showed that MV was investigated to 0.47 mM TE (Trolox Equivalent)/mL, which was 1.74 times higher than BV, and 2.6 times higher than CV. In order to measure *in vitro* anti-hyperglycemic enzymes of three vinegars, α-amylase inhibition, α-glucosidase inhibition, and pancreatic lipase inhibition activity were measured. As a result, IC_{50} of MV for α-amylase and α-glucosidase inhibitory activity was investigated to 0.10 mg/mL and 0.09mg/mL, respectively, and IC_{50} of MV for pancreatic lipase inhibitory activity was 0.48mg/mL. To identify the cell toxicity of vinegar samples, MTT assay was conducted. It was treated at 0, 50 and 500ug/ml concentrations during the differentiation phase of 3T3-L1 cells to ensure that the effect of vinegar was concentration dependent. As a result, lipid accumulation rate was significantly decreased when 500 μg/mL was treated

than when 50 μg/mL was treated (P<0.05). MV was assessed to have the highest effect of inhibiting the formation of lipid droplet than BV and CV. This research is the first showing the potential anti-diabetic activity of *Monascus*-fermented grain vinegar.

인 준 서

노영희의 석사학위 논문으로 인준함

2020년 05월

심사위원장 이승민 (서명 또는 인)

심 사 위 원 고성희 (서명 또는 인)

심 사 위 원 (서명 또는 인)

성신여자대학교 대학원