홍국발효 곡물식초의 In Vitro 항당뇨와 항비만 효과

노영희 · 표영희

성신여자대학교 식품영양학과

The *In Vitro* Anti-Diabetic and Anti-Obesity Effect of *Monascus*-Fermented Grain Vinegar

Young-Hee Noh and Young-Hee Pyo

Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University

ABSTRACT The present study aimed to identify the potential biological activities of *Monascus*-fermented grain vinegar (*Monascus* vinegar, MV) with respect to its antioxidant, anti-diabetic, and anti-obesity effects. MV showed inhibitory activity against pancreatic lipase, α -amylase, and α -glucosidase with IC₅₀ values of 0.48, 0.10, and 0.09 mg/mL, respectively as well as excellent antioxidant activity. Furthermore, MV showed significant inhibitory activity (P<0.05) on adipocyte differentiation in the 3T3-L1 preadipocytes without affecting cell viability as assessed by measuring fat accumulation using Oil Red O staining. These *in vitro* biological effects were higher in MV than in other kinds of commercial vinegar including brown rice vinegar (BV) and five kinds of cereal vinegar (CV). The results demonstrate that MV can inhibit the key enzymes related to type 2 diabetes (T2DM) and obesity. Our findings suggest that MV can be used for the prevention of lifestyle diseases such as obesity and T2DM.

Key words: Monascus vinegar, anti-diabetic, anti-obesity, 3T3-L1 preadipocytes

서 론

현대인의 서구화된 식생활 패턴, 외식의 증가, 운동 부족 등의 환경적 요인으로 인한 생활습관병이 사회적 문제로 대 두되고 있으며, 그중 당뇨병은 전 세계적으로 확대되고 있는 건강 문제로 비만 및 각종 성인병과 밀접한 관련이 있다 (Jacobson 등, 2005). 당뇨병 중 제2형 당뇨병은 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하여 혈중 포도당의 농도 가 높아지는데, 이는 감염, 수술, 유전자 결함 등에 의해 발생 할 수도 있지만 비만과 같은 환경적인 요인이 크게 작용하는 것으로 알려져 왔다(Qi 등, 2008). 제2형 당뇨병의 주요 원 인이 되는 비만은 에너지 소비량보다 과다한 영양소 섭취에 따른 잉여 열량으로 인한 지방조직의 축적 상태를 의미하며, 인슐린 저항성의 주요 원인으로 지목되고 있다. 현재 당뇨병 과 비만의 약물치료로 acarbose, voglibose 등의 당뇨 치료 제와 orlistat 등의 비만 치료제가 판매되고 있으나, 복용에 따른 구토, 복부 팽만감, 설사 등의 부작용이 보고되어 왔다 (Mooradian과 Thurman, 1999; Kim 등, 2006). 이러한 문

제를 해결하기 위해 혈당 상승을 억제하고 당 분해 저해 활성을 갖는 천연물에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이에 대한 활발한 연구가 진행 중이다.

식초는 대표적인 발효 식품 중 하나이며 최근 식초에 대한 여러 가지 효능이 과학적으로 입증되면서 단순한 조미 용도의 식초가 다양한 천연소재를 활용하여 개발된 기능성 건강음료로 소비되는 경향이 높아지고 있다(Cho 등, 2013; Lee 등, 2009). 식초에는 원료의 종류에 따라 초산, 구연산 등의유기산은 물론 아미노산과 무기질 및 비타민 등의 여러 가지영양소가 함유되어 있고, 페놀산과 플라보노이드 등의 생리활성 성분도 다량 함유되어 있어 대표적인 건강 기능성 식품의 하나로 활용되는 추세이다. 식초는 소화액의 분비를 촉진하고, 젖산 분해작용을 통한 피로회복 촉진은 물론, 식후 혈당 상승의 억제 효과로 인한 제2형 당뇨 및 비만의 예방 효과와 함께 혈압상승 억제 및 항종양 효과 등의 다양한 생리활성 작용이 보고되어 왔다(Park 등, 2012; Vogel 등, 2000). 홍국발효물은 자체 함유된 monacolin K 대사체가 콜레스테롤 생합성 경로에서 HMG-CoA reductase inhibitor로

Received 5 April 2021; Revised 20 May 2021; Accepted 21 May 2021

Corresponding author: Young-Hee Pyo, Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University, 76-Gagil Dobong-ro, Kangbuk-Gu, Seoul 01133, Korea, E-mail: rosapyo@sungshin.ac.kr

Author information: Young-Hee Noh (Graduate student), Young-Hee Pyo (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

784 노영희·표영희

작용하는 항콜레스테롤 활성의 천연소재로 널리 알려져 왔다. 또한 혈압과 혈당 강하 작용을 비롯한 항암 및 항산화활성 등의 다양한 기능성도 보고됨에 따라 홍국발효물의 기능성 소재로서 활용 가능성에 관한 연구는 다양하게 시도되어 왔다(Akihisa 등, 2005; Kuo 등, 2009; Hwang 등, 2016).

따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성을 나타내는 홍국 균을 현미와 서리태에 접종하여 발효시킨 발효물로 홍국발효 곡물식초를 제조한 후 본 연구의 시료로 사용하였다. 시료의 *in vitro* 생리활성을 평가하기 위해 현재 시판되고 있는 천연 발효 곡물식초인 오곡식초와 현미식초를 대상으로 항산화 활성(DPPH, ABTS, FRAP), 소화효소 저해 활성(a-amylase, a-glucosidase, pancreatic lipase), 그리고 3T3-L1 지방 전구세포를 통한 지방축적 억제 효과 등을 비교평가하여 본 시료의 항당뇨 및 항비만에 대한 천연 기능성소재로서의 활용 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 현미식초와 오곡식초는 서울의 백화점에서 구입한(2019년) 전통 발효식초이다. 현미식초(Sujinwon Farm, Gyeonggi, Korea)는 현미 50%를 원료로 하여 엿기름과 효모를 접종하여 고상 발효로 제조한 후 12개월간 숙성한 식초이며, 오곡식초(Chosanjung, Gyeongbuk, Korea)는 오곡(현미, 조, 보리, 밀, 수수; 32.7%)에 누룩과 엿기름등을 혼합하여 고상 발효를 통해 제조한 후 12개월 숙성하였다. 홍국발효 곡물식초의 제조 방식은 Fig. 1과 같으며(Hwang 등, 2016), 각 식초에 대한 주요 원재료는 Table 1과 같다. In vitro 항당뇨 및 항비만 활성 평가를 위한 시료

는 각각의 식초 원액 50 mL에 부탄을 500 mL를 가하여 추출한 후 감압 농축하여(CCA-1110, Eyela, Tokyo, Japan) -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 식초 추출물은 효소실험의 경우 동일 용량의 potassium phosphate buffer(pH 6.8, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 용해하였고, 세포실험의 경우 동일 용량의 DMSO(Sigma-Aldrich)에 녹여 사용하였다. 실험에 사용한 분석 시약들은 대부분 Sigma-Aldrich에서 공급받았으며, 그 밖의 시약들은 analytical grade를 구입하여 각 실험에 사용하였다.

pH 및 총 산도

식초 시료의 pH는 pH 미터(Thermo Orion, Beverly, MA, USA)를 사용하여 측정하였고, 총산 함량은 초산 발효 액 1 mL를 취하여 0.1 N NaOH 용액으로 중화 적정한 후에 초산 함량(%)으로 산출하였다.

총 폴리페놀 화합물 함량

시료의 총 폴리페놀 함량은 Singleton과 Rossi(1965)의 방법을 일부 변경하여 측정하였다. 시료 $50~\mu$ L에 $2\%~Na_2CO_3$ 용액 1~mL를 가하여 반응시킨 후, Folin-Ciocalteu reagent $50~\mu$ L를 혼합하였다. 모든 시료는 실온의 암소에서 30분동안 반응시킨 후 700~nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 폴리페놀 함량은 mg gallic acid equivalent(mg GAE/mL)로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량

시료 속에 함유된 플라보노이드 함량은 시료 1 mL에 NaNO₂ 20 μL를 가한 다음 5분간 반응시켜 10% AlCl₃ 20 μL와 1 N NaOH 150 μL를 혼합한 후에 510 nm에서 흡광도를 측정하였다(Zhishen 등, 1999). 시료의 총 플라보

Seed culture

Monascus pilosus (KCCM 60084)

PDA (Potato dextrose agar) fermentation for 7 days (27°C in incubator)

Nutrient broth

Seed culture

Dextrose, malt, peptone, glycerol, MgSO₄, NaNO₂, yeast ext, rice flour

Solid substrate fermentation

Brown rice (1): Black bean

→ Nutrient broth (10%, v/w)

→ Fermentation (28°C, 20 days)

→ Lyophilization

◆ Alcholic fermentation (4 days)

Acetic fermentation (30°C, 4 weeks)

Monascus-fermented grain vinegar

Fig. 1. Manufacturing process of vinegar using *Monascus*-fermented grains (Hwang et al., 2016).

Major ingredient Sample pН Acidity (%) Monascus fermented grain vinegar (MV) 3.32 ± 0.02 7.21±0.16 brown rice and black soybean (1:1, w/w) fermented with Monascus pilosus: 50% Brown rice vinegar (BV) 3.14±0.02 4.00±0.01 brown rice: 50% Five kinds of cereals vinegar (CV) 3.13 ± 0.01 5.20 ± 0.01 brown rice, barley, waxy millet, proso millet, sorghum: 42.7%

Table 1. pH, acidity (%), and major ingredient of *Monascus*-fermented grain vinegar (MV) and commercial grain vinegar (BV, CV) used in this study

노이드 함량은 mg quercetin equivalent(mg QE/mL)로 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거 활성

ABTS 라다칼 소거 활성을 이용한 식초 시료의 항산화력 측정은 ABTS cation decolorization assay 방법에 따라 측정하였다(Re 등, 1999). 7 mM의 ABTS와 2.45 mM의 potassium persulfate를 실온의 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS 양이온을 형성시켜 ABTS stock solution을 제조하였다. 734 nm에서 흡광도 0.70 ± 0.04 로 희석한 ABTS 용액 900 μ L에 시료 100 μ L를 첨가하여 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 다음 각 시료의 라디칼 소거능은 mg Trolox equivalent(mg TE/mL)로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성

식초의 항산화 활성은 DPPH(1,1-diphenyl-2-pic-rylhydrazyl) 라디칼에 대한 전자공여능으로 평가하였다 (Brand-Williams, 1995). 시료 100 μL와 0.2 μM DPPH 용액 900 μL를 첨가한 후 30분 후에 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거능은 mg Trolox equivalent(mg TE/mL)로 나타내었다.

FRAP 측정

Ferric reducing antioxidant power(FRAP)는 식초에 들어있는 특정 성분이 ferric-tripyridyltriazine(FeIII-TPTZ) sodium acetate trihydrate를 환원시키는 능력을 측정하였다(Benzie와 Strain, 1996). 37°C 항온기에서 15분 예비반응한 후 시료 50 μL에 FRAP solution 950 μL를 혼합하여 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 환원력을 통한 항산화 활성은 mg Trolox equivalent(mg TE/mL)로 나타내었다.

α-Amylase 저해 활성

α-Amylase 저해 활성은 Kawamura-Konishi 등(2012) 의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 각 식초 추출물은 potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 녹인 후 α-amylase (Sigma-Aldrich Co.) 효소 1.0 U/mL 용액, 0.2 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8, Sigma-Aldrich Co.) 50 μL를 각각 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 0.2 mM potassium phosphate buffer에 녹인 1% 전분 용액을

가하여 다시 20분간 반응시켰다. DNS 시약을 0.25 mL 첨가하여 100°C에서 10분간 가열한 후 바로 냉각하여 증류수 1 mL를 첨가한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 효소 저해 활성의 음성 대조구는 추출 시료 대신 완충액을 사용하였으며, 효소의 저해 활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내어 산출하였다

α-Glucosidase 저해 활성

 α -Glucosidase 저해 활성을 Tibbot과 Skadsen(1996)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 식초 추출물 시료 200 μ L에 0.5 U/mL α -glucosidase 효소액 100 μ L를 혼합하여 37°C에서 10분 동안 미리 반응시켰다. 5 mM p-NPG 100 μ L를 가한 후 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 0.1 M Na₂CO₃ 750 μ L를 가하여 반응을 정지시켰다. 이때 생성된 p-nitrophenol의 양은 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 배양액 대신 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)를 사용하였으며, blank는 추출 시료 및 효소액 대신 0.1 M potassium phosphate buffer를 사용하였다. 각 시료의 효소 억제 활성은 시료 첨가구와 무첨가구 간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내어 산출하였다.

Pancreatic lipase 저해 활성

Pancreatic lipase 저해 활성은 Cho 등(2017)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 식초 추출물 시료 $100~\mu$ L에 0.1~g/mL pancreatic lipase 효소 용액과 200~mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)를 각각 $100~\mu$ L 혼합하여 37° C 에서 15분간 반응시킨 후, 5~mM p-nitrophenollaurate $50~\mu$ L를 가하여 30분간 반응시켰다. 반응 용액에 100~mM $Na_2CO_3~0.75~m$ L를 가해 반응을 종결한 후 420~m에서 30 광도를 측정하였다. 모든 효소 저해 활성의 음성 대조구는 시료 대신에 완충액을 사용하였으며, 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

786 노영희 · 표영희

세포독성 측정

추출 시료의 세포 증식과 독성은 Green 등(1984)의 방법을 일부 수정하여 측정하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Duchefa, Haarlem, Netherlands) 용액을 사용하여 측정하였다. 3T3-L1 지방 전구세포를 24-well plate에 2.5×10⁴ cells/mL로 분주하고 24시간 동안 배양시킨 다음, 식초 추출물을 5~5,000 μg/mL의 농도로 48시간 처리한 후 배지를 제거하고 각 well에 5 mg/mL MTT 용액 20 μL를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. MTT 용액을 제거하고 각 well에 DMSO를 200 μL씩 첨가하여 formazan 결정을 용해한후, 96-well plate에 100 μL씩 옮긴 다음 최종적으로 microplate reader(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3T3-L1 지방 전구세포의 배양 및 분화 유도

실험에 사용한 3T3-L1 지방 전구세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분 양받아 사용하였다. 세포배양 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)과 1% penicillinstreptomycin(Welgene)을 첨가하여 사용하였다. 세포배 양은 37°C, 5% CO₂ 환경에서 confluent 상태가 되기 전에 0.25% trypsin-EDTA(Welgene)를 이용하여 세포를 떼어 낸 후 원심분리하여 계대 배양하였다. 분화를 유도하기 위해 8×10⁴ cells/well 밀도로 6-well plate(SPL)에 분주하고 100% confluence가 될 때까지 배양하였다. Confluence 상 태로 2일을 더 배양한 후 DMEM에 10% fetal bovine serum(FBS, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany), 1% P/S, MDI(0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin(IBMX), 1 μM dexamethasone, 10 μg/mL insulin) 를 첨가하여 배양하였다. 분화 유도 2일째에는 10% FBS-DMEM 배지에 10 μg/mL insulin이 첨가된 배지로 2일간 배 양하고, 4일째부터는 10% FBS와 1% P/S만 포함된 DMEM 배지로 이틀에 한 번씩 교체하며 8일까지 배양하였다. 식초 추출물의 처리는 분화 유도 배지 첨가 시점과 동시에 처리하 였다.

Oil Red O 염색

식초 추출물의 농도에 따른 지방구 형성에 대한 영향은 Oil Red O 염색을 통해 확인하였으며, 3T3-L1 preadipocyte 분화 억제 활성을 측정하였다(Ramirez-Zacarias 등, 1992). 3T3-L1 세포를 6-well plate에 8×10⁴ cells/mL로 분주하고 배양 및 분화하여 분화 8일째에 배양액을 제거하였다. Phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)을 각 well 당 1 mL씩 넣고 2번 세척한 후 4% para-formaldehyde로 30분간 상온에서 고정하였다. 고정액을 다시 세척하고 완전

히 건조한 다음 Oil Red O 용액을 넣어 1시간 동안 상온에서 염색하였다. 염색된 지방구는 PBS로 3회 세척하여 현미경으로 관찰하였다. 이후 isopropanol로 염색된 지방구를 추출하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Triglyceride 함량 측정

식초 농도에 따른 지방축적 정도는 triglyceride assay kit(Biomax, Seoul, Korea)을 사용하여 triglyceride(TG) 함량을 측정하였으며 제공된 방법에 따라 실험을 수행하였다. 96-well plate에 3T3-L1 세포를 1×10^4 cells/mL로 분주하여 분화를 완료하고, 분화된 세포는 5% NP-40 용액에 균질화한 다음 100° C 항온수조에서 5분간 가열한 후 원심분리한 상등액을 시료로 이용하였다. 새로운 96-well plate에 시료 $50~\mu$ L를 분주한 후 lipase $2~\mu$ L를 넣고 실온에서 20분간 배양하였다. 배양액에 반응혼합물(assay buffer $46~\mu$ L, enzyme mix $2~\mu$ L, probe $2~\mu$ L) $50~\mu$ L를 분주한 후 빛을 차단하여 실온에서 30분 동안 반응시킨 다음 $570~\mu$ C mm에서 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험 결과의 통계처리는 SPSS(version 25, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 시료 간의 유의성 검정은 분산분석(ANOVA)과 다중범위검정(Duncan's multiple range test)으로 P < 0.05 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

pH 및 총 산도

식초 품질 판정의 지표로 이용되는 발효식초 시료의 초산 함량은 $4.00 \sim 7.21\%$ 이고 pH의 범위는 $3.13 \sim 3.32$ 로 나타 났다(Table 1). 식품공전에서 제시하는 식초의 총산(초산, w/v%) 함량은 $4.0 \sim 20.0\%$ 범위로 규정하고 있어(MFDS, 2007) 본 실험에 사용된 발효식초 시료는 식초의 품질 규격에 적합한 것으로 판정된다. 흥미롭게도 세 가지 시료 중가장 약한 pH 3.32를 나타낸 홍국발효 곡물식초의 총 산도는 7.21%로 가장 높게 측정되었다. 이 같은 결과는 홍국발효 곡물식초의 기질에 분포한 총 유기산의 농도가 해리된 H⁺의 농도보다 상대적으로 높았기 때문이며, 해리되지 않은 유기산이 다량 함유된 것으로 추정할 수 있다. 일반적으로식초에 함유된 유기산의 농도와 종류는 원재료 및 부재료의함량과 발효 방법 등에 따라 차이가 나는 것으로 알려졌다 (Shin과 Jeong, 2003).

총 폴리페놀과 플라보노이드 함량

천연 항산화제로 잘 알려진 식물체에는 2차 대사산물의 하나인 페놀 화합물이 함유되어 있으며, 이 물질은 콜레스테 롤 저하 작용, 항암 및 항산화 작용 등 다양한 생리활성 기능

Table 2. Total phenol and flavonoid contents of *Monascus*-fermented grain vinegar (MV) and commercial grain vinegar (BV, brown rice vinegar; CV, five kinds of cereals vinegar)

Sample	Total phenol contents (mg GAE/mL)	Total flavonoid contents (mg QE/mL)
MV	0.83 ± 0.06^{a1}	0.11 ± 0.00^{a}
BV	0.74 ± 0.02^{b}	0.10 ± 0.11^{b}
CV	0.63 ± 0.01^{c}	0.07 ± 0.00^{c}

¹⁾Each value is mean±SD (n=3). Means with different letters (a-c) within in a column are significantly different at *P*<0.05 by Duncan's multiple range test.

을 갖는 것으로 알려졌다(Kim 등, 2000). 홍국발효 곡물식 초와 시판 곡물식초의 총 페놀 화합물의 함량은 Table 2와 같다. 홍국발효 곡물식초의 총 페놀 함량은 0.83±0.06 mg GAE/mL로 나타나, 현미식초(0.74±0.02 mg GAE/mL)와 오곡식초(0.63±0.01 mg GAE/mL)에 비해 각각 12.2%와 31.7%로 유의적으로 높게 측정되었다(P<0.05). 폴리페놀 성분의 하나인 플라보노이드 화합물은 주로 anthocyanidins, flavonols, flavones, cathechins 및 flavanones 등으 로 구성되어 있으며, 이러한 플라보노이드 화합물 역시 항산 화 작용을 비롯한 항염 작용과 면역증강 등의 다양한 생리활 성 효과를 보이는 것으로 알려진다(Park 등, 2012). Table 2에서와 같이 홍국발효 곡물식초의 총 플라보노이드 함량은 0.11±0.00 mg QE/mL로 나타나 현미식초(0.10±0.11 mg QE/mL)에 비해 10%, 오곡식초(0.07±0.00 mg QE/mL)에 비해 57.1% 더 높은 함량으로 비교되었다(P<0.05). 이 같은 결과는 식초 원료 중의 하나인 홍국 발효콩에 함유된 isoflavones 등의 다양한 페놀 화합물에 따른 결과로 설명할 수 있다(Hwang 등, 2016). 따라서 곡류만을 원료로 하여 식초를 제조할 때보다 곡류와 함께 콩을 첨가하여 제조한 식초의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량이 유의적 으로 증가한 것으로 나타났다.

항산화 활성

홍국발효 곡물식초와 시판 곡물식초에 대한 항산화 활성은 ABTS와 DPPH 라디칼 소거 활성 작용과 환원력(FRAP)을 통해 측정되었으며 그 결과는 Fig. 2와 같다. 그림에서와 같이 홍국발효 곡물식초의 Trolox 당량 값으로 나타낸 항산

화 활성은 ABTS 라디칼 소거 활성(0.15±0.01 mg TE/ mL), DPPH 라디칼 소거 활성(0.07±0.00 mg TE/mL), 환 원력(0.25±0.01 mg TE/mL) 측정에서 모두 현미식초(0.13 ±0.01 mg, 0.01±0.00 mg, 0.13±0.01 mg)와 오곡식초 (0.09±0.01 mg, 0.02±0.00 mg, 0.07±0.00 mg)보다 유의 적으로 우월한 항산화 활성을 함유한 것으로 평가되었다. 이 같은 결과는 홍국발효 곡물식초의 총 페놀 함량과 총 플 라보노이드 함량이 시판 곡물식초보다 유의적으로 더 높게 나타난 앞에서의 결과와 일치하는 것으로 평가된다. 일반적 으로 항산화 활성의 지표 물질은 phenolic acid와 플라보노 이드 화합물과 같은 페놀 화합물로 지목되며, 일반적으로 페놀 화합물의 농도가 증가할수록 항산화 활성은 높아지는 것으로 보고되어 왔다(Kang 등, 1996). 특히 식초 원료 중 의 하나인 홍국 발효콩의 이소플라본 함량은 홍국발효는 물 론 식초 제조 시의 초산 발효 과정이 배당체형의 이소플라본 화합물을 비배당체형으로 전환시켰다는 선행 연구의 결과 (Hwang 등, 2016)와도 유관함을 알 수 있다. 대부분의 페놀 화합물은 배당체형보다 비배당체형의 화합물이 생체 이용 률이 높고 유해 활성산소를 제거하는 항산화 활성의 기능도 탁월한 것으로 알려져 왔다(Kim 등, 2009). 따라서 본 연구 의 시료인 홍국발효 곡물식초의 항산화 활성이 시판 곡물식 초보다 높게 나타난 것은 자체 내 함유된 폴리페놀 성분은 물론 비배당체형의 분자 구조의 유형도 영향을 미친 결과로 이해할 수 있다.

α -Amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase 저해 작용

홍국발효 곡물식초와 시판 곡물식초의 당질 소화효소인 α -amylase와 α -glucosidase, 그리고 지질 소화효소인 pancreatic lipase에 대한 저해 작용은 IC_{50} (half maximal inhibitory concentration)으로 나타내었으며 그 결과는 Table 3과 같다. 현재 혈당 조절제이면서 비만 억제의 수단으로 개발된 acarbose는 설사와 복통 등의 부작용이 알려져천연 소재의 대체물 탐색은 매우 필요한 실정이다. Table 3에서와 같이 α -amylase 저해 활성에 대한 홍국발효 곡물식초의 IC_{50} 은 0.10 mg/mL로 나타나 현미식초(0.22 mg/mL)와 오곡식초(0.23 mg/mL)보다 각각 54.5%와 56.5% 저해 활성이 더 높은 것으로 나타났다. α -Glucosidase 저해

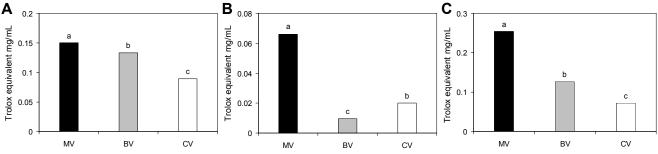


Fig. 2. Antioxidant activity of *Monascus*-fermented grain vinegar (MV) and commercial grain vinegar (BV, brown rice vinegar; CV, five kinds of cereals vinegar). A: ABTS radical scavenging activity, B: DPPH radical scavenging activity, C: FRAP test. Each value is mean±SD (n=3). Means with different letters (a-c) are significantly different at *P*<0.05 by Duncan's multiple range test.

788 노영희·표영희

Table 3. IC₅₀ value of digestive enzyme inhibition activity of *Monascus*-fermented grain vinegar (MV) and commercial grain vinegar (BV, brown rice vinegar; CV, five kinds of cereals vinegar)

IC ₅₀ ¹⁾ (mg/mL)		
α-Amylase	α-Glucosidase	Pancreatic lipase
$0.10\pm0.00^{c2)}$	0.09 ± 0.00^{d}	0.48 ± 0.00^{b}
0.22 ± 0.00^{b}	0.11 ± 0.00^{b}	0.50 ± 0.01^{b}
0.23 ± 0.01^{a}	0.12 ± 0.00^{a}	0.55 ± 0.01^{a}
0.05±0.01 ^d	0.10±0.01°	_
_	_	0.07 ± 0.01^{c}
	$0.10\pm0.00^{c2)}$ 0.22 ± 0.00^{b} 0.23 ± 0.01^{a}	$\begin{array}{ccc} \alpha\text{-Amylase} & \alpha\text{-Glucosidase} \\ 0.10\pm0.00^{c2)} & 0.09\pm0.00^d \\ 0.22\pm0.00^b & 0.11\pm0.00^b \\ 0.23\pm0.01^a & 0.12\pm0.00^a \end{array}$

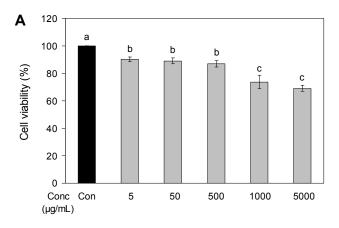
¹⁾IC₅₀: Half maximal inhibitory concentration.

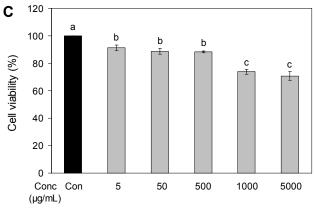
활성에 대한 홍국발효 곡물식초의 IC_{50} 은 0.09~mg/mL의 농도로 나타나 현미식초(0.11~mg/mL)와 오곡식초(0.12~mg/mL)보다 각각 18.2%와 25.0%의 더 높은 저해 활성으로 비교되었다. 특히 홍국발효 곡물식초는 동일 농도에서 양성 대조군인 acarbose의 α -amylase에 대한 저해 활성보다 50%의 저해 활성을 보였으나(P<0.05), α -glucosidase에 대해서는 acarbose의 저해 농도(IC_{50} =0.10~mg/mL)보다오히려 더 높은 저해 활성으로 나타나(IC_{50} =0.09~mg/mL) 홍국발효 곡물식초 추출물은 α -glucosidase를 더욱 더 효과적으로 저해하는 것으로 평가되었다. α -Glucosidase에

대한 저해 활성은 탄수화물 식사 후 혈당 상승을 억제할 수 있어 항당뇨 활성 측정법으로 널리 이용되며, 특히 α-glucosidase 저해 활성은 총 폴리페놀과 유의적인 양의 상관관 계가 존재하는 것으로 보고되어 왔다(de Camargo 등, 2017). 한편 pancreatic lipase 저해 활성에 대한 홍국발효 곡물식초의 IC50은 0.48 mg/mL로 나타나 현미식초(0.50 mg/mL)와 오곡식초(0.55 mg/mL)보다 각각 4.2%와 14.6 % 더 높은 저해 활성으로 비교되나, 양성 대조군으로 사용된 orlistat의 저해 활성보다 약 15% 정도의 활성으로 비교되 었다. Orlistat 역시 비만 치료 물질로 그 효능이 우수하지만 위장 장애, 과민증, 담즙분비 장애, 지용성 비타민 흡수 억제 등의 부작용이 나타나는 것으로 보고되었다(Kim 등, 2006). 따라서 탄수화물과 지방의 소화효소를 억제하는 동시에 부 작용이 없거나 위해 요소가 미미한 새로운 소재를 탐색하고 자 실행한 본 연구의 결과는 현미식초와 오곡식초보다 홍국 발효물을 이용한 홍국발효 곡물식초가 α-amylase, α-glucosidase, pancreatic lipase에 대해 뚜렷한 저해 활성을 갖는 것으로 평가되었다.

세포독성 측정

식초 추출물의 시료가 3T3-L1 지방세포에 대한 세포 증식능에 미치는 영향을 평가하기 위해 세포독성 평가를 수행하였다. 살아 있는 세포의 미토콘드리아 내에 존재하는 reductase는 MTT 시약을 처리할 경우 formazan을 형성하고





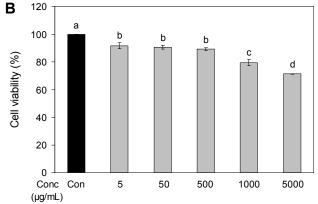


Fig. 3. Effects of *Monascus*-fermented grain vinegar (MV) and commercial grain vinegar (BV, brown rice vinegar; CV, five kinds of cereals vinegar) on cell viability of 3T3-L1 preadipocytes. A: cell viability of MV, B: cell viability of BV, C: cell viability of CV. 3T3-L1 preadipocytes were treated with various concentrations (0, 5, 50, 500, 1,000, and 5,000 μg/mL) of vinegars. All values are means of determinations in three independent experiments. Values are means±SD. Means with the same letter above the bars are not significantly different at the 5% level.

²⁾Each value is mean±SD (n=3). Means with different letters (a-d) within in a column are significantly different at *P*<0.05 by Duncan's multiple range test.

DMSO로 재수화시키면 보라색이 나타나는 비색법을 적용 하여 측정하였다(Green 등, 1984). 세포독성이 나타나지 않 는 농도를 확인하기 위해 MTT 분석법을 이용하여 시료의 농도(5, 50, 500, 1,000, 5,000 μg/mL)에 따른 세포 생존율 의 변화를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 시료의 농도 5~500 μg/mL 수준에서 대조군보다 3T3-L1 지방세포의 생존율이 평균 88% 이상(MV, 88.05%; BV, 89.16%; RV, 88.38%) 으로 나타나 약 12%의 생존율이 감소하였으며, 1,000 μg/ mL 이상의 농도에서는 세포 생존율이 80% 미만으로 나타 나 20% 이상의 세포 생존율이 감소하였다(P<0.05). 세포 생존율 평가에서 대조군 대비 50% 이상의 생존율 감소 (IC50)는 세포독성이 있다고 평가하며, 세포배양 48시간 경 과 시점까지 생존율 85% 이상을 유지하면 저독성의 수준으 로 평가한다(Suraiya 등, 2019). 따라서 본 실험에서는 세포 생존율에 대한 시료 간 농도에서 세포독성 효과가 낮은 5~ 500 μg/mL 농도를 추후 본 실험에 적용하였다. Lee 등 (2018)의 보고에 따르면 토마토 식초의 세포독성은 500 µg/ mL의 농도까지 80% 이상의 생존율을 유지하는 것으로 나 타나 본 실험의 결과와 유사하였으나, 미나리 발효식초는 3T3-L1 지방세포에 대해 1,000 μg/mL까지 유의적인 사멸 이 나타나지 않았다(Park 등, 2014). 일반적으로 세포의 생

존율은 추출용매나 세포 및 시료의 종류 등에 따라 각기 다른 영향을 받는 것으로 알려졌다.

3T3-L1 세포를 통한 지방축적 억제 능력

3T3-L1 preadipocyte의 분화를 유도한 후 lipid droplet 만을 Oil Red O로 염색한 다음 위상차 현미경으로 관찰한 결과(Fig. 4A), 세포만을 배양한 대조군에서는 lipid droplet 형성이 활발하게 이루어진 것을 확인할 수 있었으며, 식초를 투여했을 때 lipid droplet 형성이 억제된 것을 알 수 있었다. 염색된 lipid droplet을 isopropanol로 추출하여 세포 내 지 방축적 정도를 정량화하여 나타낸 결과(Fig. 4B), 세포만을 배양한 대조군의 지방축적 정도를 100%로 하였을 때 홍국 발효 곡물식초와 시판 곡물식초 모두 식초 처리 농도가 증가 함에 따라 지방축적이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났 다(P<0.05). 식초 시료를 500 μg/mL 농도로 투여했을 때 지방축적률은 각각 홍국발효 곡물식초(67.92%), 현미식초 (81.65%), 오곡식초(83.06%) 순으로 나타났으며, 홍국발 효 곡물식초의 지방축적률은 현미식초보다 13.73%, 오곡식 초보다 15.14% 더 감소시킨 것으로 나타나 홍국발효 곡물 식초의 지방축적 억제 능력이 더욱 효과적인 것으로 비교되 었다.

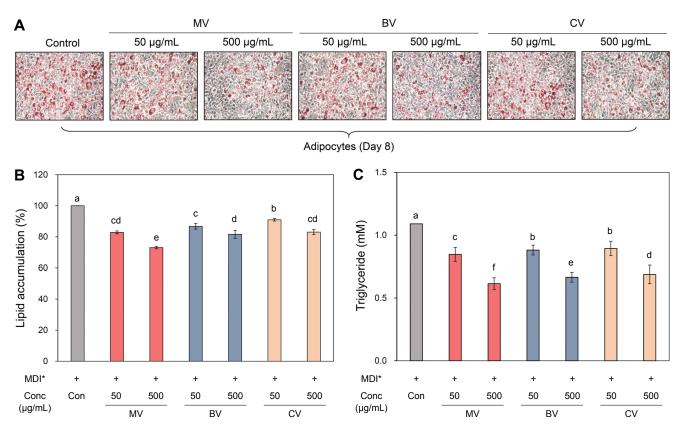


Fig. 4. Inhibitory effects of *Monascus*-fermented grain vinegar (MV) and commercial grain vinegar (BV, brown rice vinegar; CV, five kinds of cereals vinegar) on Oil Red O staining and lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 adipocytes. A: Intercellular triglycerides were stained with Oil Red O and observed 20× magnification. B: Quantified by measuring the lipid accumulation. C: Triglyceride contents. All values are means of determinations in three independent experiments. Values are means±SD. Means with the same letter above the bars are not significantly different at the 5% level.

790 노영희·표영희

비만은 adipogenesis에 의한 지방조직의 팽창과 더불어 lipogenesis를 통해 중성지방이 축적되는 것과 관련이 있다 (Wang 등, 2017). 따라서 홍국발효 곡물식초의 항비만 효과 를 검증하기 위해 지방세포 내 중성지방 함량을 측정하였다. 중성지방 함량을 측정한 결과(Fig. 4C), 시료의 농도가 증가 함에 따라 중성지방 함량이 농도 의존적으로 감소하는 것으 로 나타났다(P<0.05). 홍국발효 곡물식초의 경우 500 ug/ mL의 농도로 처리한 결과, TG 함량이 0.61 mM로 대조군보 다 43.72% 감소하는 효과를 보였으며, 현미식초의 경우 0.67 mM로 39.06% 감소하였고 오곡식초는 0.69 mM로 대조군보다 37.01% 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 세 가지 식초 시료 추출물의 지방축적 억제 능력은 홍국발효 곡물식초> 현미식초> 오곡식초 순으로 나타났으며, lipid droplet을 염색한 Oil Red O 결과와도 일치하여 홍국발효 곡물식초가 시판 곡물식초에 비해 항비만 효과가 우수한 것 으로 평가되었다. 이 같은 결과는 선행연구와 유사한 경향으 로, Jou 등(2010)에 따르면 홍국균의 이차대사산물인 monascin과 ankaflavin은 중성지방을 억제한다고 보고하였으 며, 3T3-L1 preadipocyte 분화 시 홍국발효물은 지방 생성 을 억제하고 관련 유전자의 발현을 저해하는 것으로 보고하 였다(Suraiya 등, 2019). 따라서 홍국(Monascus sp.)으로 발효한 곡류나 두류를 소재로 식초를 제조한 홍국발효 곡물 식초는 일반 국균(*Aspergillus* sp.)으로 발효한 곡물식초에 비해 총 페놀 화합물이나 총 플라보노이드 함량이 증가하여 보다 우수한 항산화 활성 및 당과 지질 가수분해 효소의 저 해 활성과 함께 중성지방 억제 능력이 상대적으로 우월한 것으로 평가되었다.

요 약

홍국균을 현미와 서리태에 접종하여 제조한 홍국발효 곡물 식초(MV)의 항산화 활성, 소화효소 저해 활성, 그리고 3T3-L1 세포를 통한 지방축적 억제 효과 등을 측정하여 시판 곡물발효 식초인 현미식초(BV), 오곡식초(CV)와 그 결과를 비교 평가하였다. 홍국발효 곡물식초의 총 폴리페놀과 플라 보노이드 함량은 각각 0.83 mg GAE/mL와 0.11 mg QE/ mL로 나타나 시판 곡물식초(0.68 mg GAE/mL, 0.08 mg QE/mL)보다 유의적으로 높았다(P<0.05). ABTS와 DPPH 라디칼 소거 활성 및 FRAP을 통한 MV의 평균 항산화 활성 을 측정한 결과, 0.47 mM TE/mL로 나타나 BV와 CV보다 각각 1.74배와 2.6배 높은 항산화 활성을 나타내었다. MV 의 α-amylase와 α-glucosidase에 대한 저해 활성은 항당 뇨 약제인 acarbose보다 50% 이상의 효과적인 저해 활성을 나타내었으며, 지방 가수분해 효소(pancreatic lipase)에 대 한 저해 활성은 비만 치료제인 orlistat보다 약 15%의 저해 활성을 보여 주었다. 3T3-L1 지방세포에 대한 세 가지 식초 추출물의 처리는 대조군보다 모두 중성지방의 억제 활성이 관찰되었으며, 특히 시판 곡물식초보다 홍국발효 곡물식초

가 효과적으로 지방축적을 억제하였다. 따라서 홍국발효 곡물식초는 당뇨 및 비만 관련 소화효소의 in vitro 저해 활성은 물론 3T3-L1 지방 전구세포에 대한 지방축적 억제 효과를 나타내어, 향후 항당뇨나 항비만을 위한 기능성 식품의소재로 활용할 수 있는 잠재적 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(과제번호: 2019-0233)의 결과로 감사드립니다.

REFERENCES

- Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Ukiya M, Kiyota A, Sakamoto N, et al. Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. J Agric Food Chem. 2005. 53:562-565.
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Anal Biochem. 1996. 239:70-76.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT Food Sci Techonol. 1995. 28:25-30.
- Cho KM, Hwang CE, Joo OS. Change of physicochemical properties, phytochemical contents and biological activities during the vinegar fermentation of *Elaeagnus multiflora* fruit. Korean J Food Preserv. 2017. 24:125-133.
- Cho KM, Shin JH, Seo WT. Production of Korean domestic wheat (keumkangmil) vinegar with *Acetobacter pasteurianus* A8. Korean J Food Sci Technol. 2013. 45:252-256.
- de Camargo AC, Regitano-d'Arce MAB, Shahidi F. Phenolic profile of peanut by-products: antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. J Am Oil Chem Soc. 2017. 94:959-971.
- Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colormetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. J Immunol Methods. 1984. 70:257-268.
- Hwang JY, Cho HY, Pyo YH. Effect of unpolished rice vinegar containing *Monascus*-fermented soybean on inhibitory activities of tyrosinase and elastase. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2016. 45:149-154.
- Jacobson PB, von Geldern TW, Ohman L, Osterland M, Wang J, Zinker B, et al. Hepatic glucocorticoid receptor antagonism is sufficient to reduce elevated hepatic glucose output and improve glucose control in animal models of type 2 diabetes. J Pharmacol Exp Ther. 2005. 314:191-200.
- Jou PC, Ho BY, Hsu YW, Pan TM. The effect of *Monascus* secondary polyketide metabolites, monascin and ankaflavin, on adipogenesis and lipolysis activity in 3T3-L1. J Agric Food Chem. 2010. 58:12703-12709.
- Kang YH, Park YK, Lee GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. Korean J Food Sci Technol. 1996. 28:232-239.
- Kawamura-Konishi Y, Watanabe N, Saito M, Nakajima N, Sakaki T, Katayama T, et al. Isolation of a new phlorotannin, a potent inhibitor of carbohydrate-hydrolyzing enzymes, from the brown alga *Sargassum patens*. J Agric Food Chem. 2012. 60:5565-5570.

- Kim HJ, Jun BS, Choi ML, Cho YS. Antioxidative activities by water-soluble extracts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspi*data. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol. 2000. 43:148-152.
- Kim JY, Chung JH, Hwang I, Kwan YS, Chai J, Lee KH. Quantification of quercetin and kaempferol contents in different parts of cudrania tricuspidata and their processed foods. Kor J Hort Sci Technol. 2009. 27:489-496.
- Kim YJ, Kim BH, Lee SY, Kim MS, Park CS, Rhee MS, et al. Screening of medicinal plants for development of functional food ingredients with anti-obesity. J Korean Soc Appl Biol Chem. 2006. 49:221-226.
- Kuo CF, Hou MH, Wang TS, Chyau CC, Chen YT. Enhanced antioxidant activity of *Monascus pilosus* fermented products by addition of ginger to the medium. Food Chem. 2009. 116: 915-922
- Lee HB, Oh HH, Jun HI, Jeong DY, Song GS, Kim YS. Functional properties of tomato vinegar manufactured using *Makgeolli* seed culture. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2018. 47: 904-911
- Lee SM, Choi YM, Kim YM, Kim DJ, Lee J. Antioxidant activity of vinegars commercially available in Korean markets. Food Eng Prog. 2009. 13:221-225.
- MFDS. Korean Food Standard Codex. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea. 2007. p 166-167.
- Mooradian AD, Thurman JE. Drug therapy of postprandial hyperglycaemia. Drugs. 1999. 57:19-29.
- Park SY, Chae KS, Son RH, Jung JH, Im YR, Kwon JW. Quality characteristics and antioxidant activity of bokbunja (black raspberry) vinegars. Food Eng Prog. 2012. 16:340-346.
- Park YH, Choi JH, Whang K, Lee SO, Yang SA, Yu MH. Inhibitory effects of lyophilized dropwort vinegar powder on adipocyte differentiation and inflammation. J Life Sci. 2014. 24: 476-484.
- Qi L, Hu FB, Hu G. Genes, environment, and interactions in prevention of type 2 diabetes: a focus on physical activity

- and lifestyle changes. Curr Mol Med. 2008. 8:519-532.
- Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. Histochemistry. 1992. 97:493-497.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999. 26:1231-1237.
- Shin JS, Jeong YJ. Changes in the components of acetic acid fermentation of brown rice using raw starch digesting enzyme. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2003. 32:381-387.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 1965. 16:144-158.
- Suraiya S, Choi YB, Park HD, Jang WJ, Lee HH, Kong IS. Saccharina japonica fermented by Monascus spp. inhibit adipogenic differentiation and gene expression analyzed by real-time PCR (Q-PCR) in 3T3-L1 cell. J Funct Foods. 2019. 55:371-380.
- Tibbot BK, Skadsen RW. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. Plant Mol Biol. 1996. 30:229-241.
- Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. The postprandial effect of components of the mediterranean diet on endothelial function. J Am Coll Cardiol. 2000. 36:1455-1460.
- Wang Z, Kim JH, Jang YS, Kim CH, Lee JY, Lim SS. Anti-obesity effect of *Solidago virgaurea* var. *gigantea* extract through regulation of adipogenesis and lipogenesis pathways in highfat diet-induced obese mice (C57BL/6N). Food Nutr Res. 2017. 61:1273479. https://dx.doi.org/10.1080/16546628.2016. 1273479
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 1999. 64:555-559.