

미나리 프락토올리고당 발효액의 발효기간에 따른 품질특성 및 간암세포 증식 억제 효과

김민주^{1,3} · 양선아² · 박정현² · 김혁일¹ · 이삼빈^{1,2*}

¹계명대학교 식품가공학과, ²계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터, ³비슬청록농장

Quality Characteristics and Anti-proliferative Effects of Dropwort Extracts Fermented with Fructooligosaccharides on HepG2 Cells

Min-Ju Kim^{1,3}, Seun-Ah Yang², Jung-Hyun Park², Hyeok-Il Kim¹, and Sam-Pin Lee^{1,2*}

¹Department of Food and Technology, Keimyung University

²The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University

³Bissell Chunglog Farm

Abstract The quality characteristics and effects on the proliferation of human hepatoma HepG2 cells due to dropwort (*Oenanthe javanica*) extracts naturally fermented with fructooligosaccharides were investigated. Dropwort was fermented by steeping with the same weight of oligosaccharide at room temperature for 1 year, and then stored at 4°C for 1 or 2 more years. During the fermentation periods, total flavonoid content, Hunter's color (a value), and viable cell counts decreased, but reducing sugars including glucose and fructose increased. HepG2 cell proliferation was inhibited significantly by the three extracts, but no effects were observed on Chang cells. In particular, the dropwort extract fermented for 1 year showed the highest inhibitory effect. These results demonstrate that the quality characteristics and anti-proliferative effects of dropwort were affected by fermentation period. It is concluded that dropwort extract fermented for 1 year showed the highest functional properties and quality.

Keywords: dropwort, *Oenanthe javanica*, HepG2 cells, fructooligosaccharide, fermentation

서 론

미나리(Dropwort, *Oenanthe javanica*)는 산형과의 다년생 초본으로서 우리나라 전역에서 자생하고 있으며 중국, 일본 등 아한대에서 열대에 이르는 지역에서 널리 분포하고 식용으로 재배하고 있다. 중국에서는 기원전 2000년경부터 논미나리와 밭미나리를 재배했다고 알려져 있으며, 우리나라에서도 사람들이 좋아하는 향채 중의 하나로 식육을 되찾는 식품으로 이용되고 있다(1). 미나리는 다른 식품에는 없는 독특한 향미와 비타민이 풍부한 식물로 김치를 담글 때 함께 쓰이기도 하며, 강회, 나물, 생채, 장아찌 및 생선찌개 등의 여러 요리에 다양하게 이용되고 있다(2). 미나리는 한방에서 수근(水芹)이라 하여, 생즙을 짜서 마시면 혈압이 낮아지고 피를 깨끗이 하며 해열과 진정작용을 하고 간장 질환, 신경통 및 류머티즘에도 약효가 있다. 미나리의 잎에는 향기가 좋은 정유를 함유하고 있어 발한 작용 및 보온 작용이 있으며, 식육을 촉진시켜 대장 활동을 도와 변비를 예방한다(3,4). 또한, 음주 후에는 숙독을 제거하는데 사용하기도 하며, 민간요

법에서는 이질을 치료하는데 효과가 있는 것으로 알려져 있다(5,6). 미나리의 독특한 향의 주성분은 isoramnetin, α -pinene, myrcene 등으로 알려져 있다(7). 미나리의 주요 성분으로는 수분 94.9%, 단백질 2.1%, 탄수화물 1.5%, 비타민 A와 B₁을 비롯하여 비타민 B₂와 C도 풍부하고, 칼슘, 인 및 철 등과 같은 무기 성분도 고르게 함유되어 있다(1).

미나리에 관한 연구로는 미나리의 형태적 특성 및 계통 분류에 관한 연구(8)와 미나리의 단백질 및 아미노산 조성에 관한 화학적인 성분에 관한 연구(5), 미나리의 향기 성분에 관한 연구가 있다(9). 최근에는 미나리 추출물의 항돌연변이 효과, MNNG에 의해서 유도된 위암세포의 성장을 억제한다는 연구와 동물실험에서 진통 효과 등도 보고되어 약품으로서의 개발 가능성도 고려되고 있다(10-12). 일반적으로 채소와 녹즙의 경우 저장성이 문제되기 때문에 장기 저장과 효능을 강화할 목적으로 발효시킨 가공품이 많이 생산되고 있으며, 미나리의 경우도 자연 발효 공정에 의한 기능성 증가 및 보존성 강화가 된 가공품이 있으나 자연 발효 공정에 따른 여러 가지 기능 변화에 대해서는 아직 연구가 매우 미흡한 실정이다(13).

현대인의 간 손상의 원인은 다양하며, 알코올, 흡연 외에도 바이러스에 의한 감염, 독물 또는 약제에 의한 중독, 영양장애 및 순환장애에서 스트레스 같은 신변의 원인 등이 있다(14). 바이러스나 음주에 의해서 가장 많이 발생하는 간염이나, 간암의 경우 확실한 치료약이 없기 때문에 치유보다는 더 이상 질병이 진행되지 않도록 하여 소극적 치료 조절에 의존하고 있는 것이 대부분의 실정이다. 간을 보호하고 치유하는 효과가 있는 약물이나

*Corresponding author: Sam-Pin Lee, Department of Food and Technology, The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
Tel: 82-53-580-5554
Fax: 82-53-580-6447
E-mail: splee@kmu.ac.kr
Received January 19, 2011; revised April 18, 2011;
accepted April 25, 2011

기능성 식품을 개발하는 것은 대단히 중요하며(15), 이러한 간 질환의 치료를 위한 합성 의약품에 관한 보고가 있으나(16,17) 합성 의약품은 부작용과 독성을 간과 할 수 없다. 따라서 천연물로부터 부작용 없는 간 기능 개선제와 이를 위한 자연 식품의 개발이 절실한 실정이다.

본 연구에서는 미나리의 자연 발효 공정에 의해 제조된 발효 추출물의 발효 및 숙성 기간에 따른 미나리 발효 추출액의 품질 특성과 기능성 평가를 위하여 간암세포의 성장 억제 효과에 대하여 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에 사용된 미나리 발효 추출액은 비슬청록농장(Daegu, Korea)으로부터 제공받았으며, 프락토올리고당은 CJ 제일제당(CJ Cheiljedang Co, Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 플라보노이드 측정에 필요한 Folin-phenol reagent는 (Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)로부터 구입하였으며, 세포 배양에 사용된 Eagle's Minimum Essential Medium(MEM) 배지와 antibiotics, FBS(fetal bovine serum)은 Gibco BRL(Rockville, MD, USA)로부터 구입하였다. 세포 생존을 측정에 사용한 MTT(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 Amresco(Solon, OH, USA)로부터 구입하였다.

미나리 발효 추출액 조제

미나리를 깨끗이 수세한 후 세척 및 살균된 용기에 넣어 침출제로서 프락토올리고당을 사용하여 세척 미나리 원료와 당의 비율을 1:1(w/w)로 혼합하였다. 당에 절여진 미나리를 상온에서 1년간 방치하면서 원료 중의 유용성분이 삼투압에 의하여 용출과 동시에 자연 발효가 일어나도록 하였다(미나리 발효 추출액 1년). 미나리의 추출이 완전히 이루어지면 발효 추출액을 저장용기에 옮겨 4°C 냉장실에서 냉장보관하면서 1년(미나리 발효 추출액 2년) 또는 2년간(미나리 발효 추출액 3년) 발효시킨 시료를 본 실험에 사용하였다.

유효 발효 균주 동정

발효기간에 따른 미나리 발효 추출액에 존재하는 유효 발효 균주를 분리하기 위하여 MRS agar에 적절히 희석한 희석액을 도말하여 30°C에서 2일간 배양한 후 출현한 colony를 계수하였다. 이 colony를 다시 MRS agar에서 2회 순수 분리하였다.

발효기간에 따른 미나리 발효 추출액에 존재하는 유효 발효 균주의 동정은 순수 분리된 균주를 이용하여 identification kit(API 50CHB, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하여 동정하였다(18).

pH, 산도 및 당도 측정

pH는 pH meter(Digital pH meter model 110, Thermo Orion, Beverly, MA, USA)를 이용하여 측정하였으며, 산도는 시료 10 mL에 증류수 20 mL을 첨가하여 pH meter로 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH로 적정한 소비량을 lactic acid 함량(% , v/v)으로 환산하였다. 당도는 디지털당도계(Pocket refractometer, ATAGO, Tokyo, Japan)를 이용하여 °Bx로 측정하였다.

생균수 측정

발효기간에 따른 미나리 발효 추출액에 존재하는 생균수 측정

은 시료를 단계별로 희석하여 MRS agar 배지에 도말하여 30°C 항온배양기에서 24시간 배양한 후 측정하였다(19).

색도 측정

색도는 시료 1 mL을 screw cap test tube의 cap(Diameter 13 mm, PYREX, Acton, MA, USA)에 담아 colorimeter(Color Reader, CR-10, MINOLTA, Osaka, Japan)를 이용하여 L(lightness), a(redness), b(yellowness)값을 측정하였으며, 이때 표준 백색 판은 L=92.68, a=-0.81, b=0.86의 값을 가진 것을 사용하였다.

환원당 측정

발효기간에 따른 미나리 발효 추출액의 환원당 측정은 환원당에 의하여 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)가 환원되어 생성된 3-amino-5-nitrosalicylic acid의 흡광도를 측정하여 당을 정량분석 하였다(20). 10배 희석한 희석액 1 mL에 DNS 시약 3 mL을 넣고 끓는 물에 5분간 반응시킨 다음 상온으로 냉각시킨 후, spectrophotometer(UVICON 922, Kontron instruments, Milan, Italy)를 이용하여 0.1% glucose(w/v, Duksan pure chemical Co., LTD, Ansan, Korea)로부터 작성한 표준 곡선에 의해 550 nm에서 측정 한 흡광도 값을 %로 나타내었다.

유리 당 함량 측정

발효기간에 따른 미나리 발효 추출액의 유리 당 함량 측정은 HPLC(Waters, Milford, DE, USA)를 이용하여 정량하였다. 컬럼은 carbohydrate column(4.6 mm×250 mm, Waters)을, 이동상은 acetonitrile:water(v/v, 75:25) 용액을 2.0 mL/min의 속도로 30°C에서 Refractive Index Detector(RID)를 사용하여 분석하였다. 시료 2 mL에 에탄올을 18 mL을 가하여 상온에서 30분간 교반 추출하여 원심분리(10,000 rpm, 15 min)한 후 상등액을 여과지(Advantec 5A)를 이용하여 여과하고 감압 농축하여 최종 부피를 10 mL로 정용한 후 이를 분석용 시료로 사용하였다.

플라보노이드 함량 측정

발효기간에 따른 미나리 발효 추출액의 플라보노이드 함량은 Nieva 등(21)의 방법에 따라 측정하였다. 시료를 10배 희석한 희석액 0.1 mL를 80% 에탄올 0.9 mL에 희석한 후 0.1 mL를 취하여 10% aluminium nitrate와 1 M potassium acetate를 함유하는 80% 에탄올 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분 방치한 뒤 spectrophotometer(UVICON 922, Kontron Instruments)를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

세포주 배양

본 실험에 사용한 인간 유래 정상 간 세포주 Chang cell과 간암 세포주 HepG2 cell은 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양 받았으며, 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37°C incubator에서 2-3회 계대 배양한 후 사용하였다.

세포 성장 억제율 측정

인간 유래 정상 간 세포주 Chang cell과 간암 세포주 HepG2 cell에 대한 세포 생존율을 알아보기 위하여 MTT assay(22)를 실시하였다. MTT 시약은 세포내로 흡수된 후, 미토콘드리아 내 효소인 succinate-dehydrogenase에 의해 formazan으로 변하여 세포의

성장을 멈추게 하며, 세포가 죽을수록 formazan의 생성이 줄어들게 되는 것을 이용한 것이다.

배양된 간 세포주와 간암 세포주를 96-well plate에 1×10^5 cells/well이 되게 분주하여 5% CO₂ incubator에서 16-24시간 동안 예비 배양 한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 세포에 PBS에 녹인 MTT(5 mg/mL) 용액 10 μ L를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 반응시킨다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고, 각 well에 100 μ L의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 생성된 formazan crystal을 용해시켜 550 nm 파장에서 ELISA reader(SPECTRA max 340PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

HepG2 세포의 형태 변화 관찰

발효기간에 따른 미나리 발효 농축액을 HepG2 세포에 농도별로 처리하였을 때 세포 형태와 세포의 수에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 Kim 등과 Yun 등의 방법(23,24)을 이용하였다.

배양된 HepG2 세포를 6-well plate(2×10^6 cells/well)에 24시간 배양한 후 시료를 농도별로 12시간 처리하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 도립현미경(DM IRE2, Leica, Wetzlar, Germany)으로 100, 200 및 400배의 배율 하에서 세포 형태와 세포 수에 대한 영향을 관찰하였다. 시료 처리하지 않은 군과 시료를 0.1과 1 mg/mL로 처리한 군에 대해 3회 실험으로 재현성을 확인하였다.

결과 및 고찰

유효 발효 균주 동정

발효기간에 따른 미나리 발효액에 존재하는 발효 미생물을 확인하기 위해서 NB배지 및 젖산균 배양 배지를 이용하였다. NB 배지를 사용하는 경우 미나리 발효액의 고초균이 과도하게 생육하여 젖산균 등의 다른 유용 균주의 분리가 어려웠다. 반면에 젖산균 배양 배지에서는 고초균의 생육이 지연되면서 유용미생물을 동정할 수 있었다(19). 미나리 발효 추출액 유래 유용미생물은 발효액의 품질 특성과 기능성에 영향을 줄 것으로 사료되며, 또한 이 균주를 이용하여 미나리 발효 추출액의 품질향상 및 제품의 표준화를 위해 활용 될 것으로 기대한다.

발효기간에 따른 미나리 발효 추출액에 존재하는 발효 균주의 동정한 결과 *Pediococcus pentosaceus* 균주와 99.9% 유사성을 나타내었다.

pH, 산도 및 당도 측정

발효기간에 따른 미나리 발효 추출액의 pH, 산도 및 당도를 측정된 결과는 Table 1과 같았다. pH는 숙성기간이 경과함에 따라 3.74에서 3.60으로 떨어지는 경향을 보이는데, 발효 추출액이 pH 4.0 이하의 경향을 보이는 것은 발효 및 숙성 과정이 진행되면서 유기산이 생성되었기 때문이라고 생각된다(19). 산도의 경우 2.25%에서 2.02%, 1.13%로 감소하는 경향을 보아, 당의 종류에 따라 pH 변화에는 영향을 끼치지 않는 것으로 생각되어진다.

당도(°Bx)의 경우 발효 및 숙성기간에 따라 40.0-41.2로 거의 유사한 값을 보였으며, 이는 미나리 원료와 당의 비율을 1:1로 첨가하는 경우에 삼투압에 의하여 식물체 중의 수분이 발효액으로 유입되면서 전형적인 야채 발효조건을 나타내는 것으로 사료된다(25).

Table 1. Quality characteristics of dropwort extracts fermented with oligosaccharide

Fermentation period (years)	pH	Acidity (%)	Saccharinity (°Bx)	Viable cell counts (CFU/mL)
1	3.74	2.25	41.1	4.6×10^4
2	3.43	2.02	40.0	2.4×10^4
3	3.60	1.13	41.2	1.6×10^3

Table 2. Hunter's color values of fermented dropwort extracts

Fermentation period (years)	Hunter's color ¹⁾		
	L	a	b
1	38.32±0.06	23.72±0.24	12.62±0.19
2	50.68±0.13	7.11±0.03	11.28±0.06
3	53.22±0.04	4.79±0.11	7.65±0.08

¹⁾Hunter color (standard plate): L, Lightness (96.92); a, Redness (0.02); b, Yellowness (1.31)

생균수 측정

발효기간에 따른 미나리 발효 추출액의 생균수를 측정된 결과 Table 1과 같았다. 발효 및 숙성기간이 1, 2 및 3년 경과한 시료에서 각각 4.6×10^4 , 2.4×10^4 , 1.6×10^3 CFU/mL의 생균이 검출되었으며, 생균수가 감소하는 경향을 확인하였다. 이는 발효가 진행됨에 따라 발효 중 삼투압 작용에 의하여 미생물의 생육이 억제되었거나, 미나리가 항균기능을 가질 수 있는 다양한 flavonoid류 및 정유 성분을 함유하며, 발효 기간이 길어질수록 이러한 성분들이 발효 추출액으로 용출되어 균의 생육이 저해된 것으로 보인다(26,27).

색도 측정

발효기간에 따른 미나리 발효 추출액의 Hunter's color values 측정 결과는 Table 2와 같다. 외관상으로 보았을 때, 프락토올리고당 미나리 발효 추출액의 경우 1년의 경우 진한 적색을 띠다가 2년, 3년의 숙성이 진행되면서 옅은 적색으로 변화하였다. 발효기간에 따른 미나리 발효 추출액의 색도 측정 결과, L 값은 38.32에서 53.22로 크게 증가하는 반면, a 값은 23.72에서 4.79, b 값은 12.629에서 7.65로 크게 감소하는 경향을 나타내었다. 미나리 발효추출물의 적색은 미나리에 함유된 flavonoid 성분이 추출 용해되어 고유한 적색을 나타내는 것으로 판단되며, 저장 중에 일부 색소의 퇴색으로 적색이 감소하는 것으로 사료된다.

색도는 발효물의 품질 평가에 중요한 인자가 되며 냄새와 더불어 기호성에 상당한 영향을 미칠 수 있으므로 매우 중요하게 생각된다. 미나리를 흑설탕으로 절입한 후 자연 발효시키는 경우에 최종 발효 미나리 추출물의 색상이 어두운 갈색으로 제품화되었다. 따라서 미나리의 발효에 사용되는 당의 종류에 따라 색상의 변화를 줄 수 있으며, 장기간 동안 저온 숙성기간에 따른 색도의 변화가 관능적 품질에 영향을 줄 것으로 판단된다.

환원당 측정

발효기간에 따른 미나리 발효 추출액의 환원당 함량 측정 결과는 Table 3과 같이 대체적으로 발효 및 숙성이 진행됨에 따라 환원당이 증가하는 경향을 보였다. 1년의 경우 15.8%로 나타났다가 2년, 3년에서 31.5%와 33.0%로 각각 10.3%와 11.8%의 증

Table 3. Contents of reducing sugar, free sugar, and flavonoid of fermented dropwort extracts

(unit: %)

Fermentation period (years)	Reducing sugar content	Fructose	Glucose	Sucrose	Flavonoid contents (µg/mL)
1	15.8	4.60	4.80	ND	288.36±0.29
2	31.5	13.0	12.6	ND	167.76±0.17
3	33.0	15.2	16.6	ND	89.58±0.09

*ND: Not detected

가를 보였다. 이는 발효 및 숙성 중에 발효 미생물에 의해서 프락토올리고당의 가수분해가 진행되었음을 간접적으로 나타낸다.

식물소재의 자연발효의 한 예로, 민들레 김치의 환원당 함량은 발효 기간에 따라 발효 30일까지 함량이 증가하다가 그 이후부터 점차 낮아지는 것으로 알려져 있는데(28), 이는 발효가 진행되면서 미생물이 번식하여 생성된 당을 영양원으로 이용하기 때문에 당이 감소하는 것으로 판단되며, 본 실험의 결과와 상이한 것은 발효 소재인 식물 자원과 침출제의 차이에 의한 것이라 사료된다.

유리당 함량 측정

미나리 발효액에 존재하는 유리당은 침출제로 첨가된 프락토올리고당이 발효 및 숙성과정을 거치면서 발효 미생물이 분비하는 효소에 의해 가수분해 되면서 천연 과당으로 전환되면서 발효물의 단맛에 관여하는 성분이다.

발효기간에 따른 미나리 발효 추출액의 유리당 함량 측정 결과는 Table 3과 같다. 프락토올리고당 미나리 발효 추출액의 경우 검출된 유리당은 과당과 포도당 2가지로 나타났으며, 발효 및 숙성이 진행되면서 과당과 포도당이 4.6%, 4.8%에서 각각 15.2%와 16.6%로 크게 증가하여 총 유리당 함량이 발효기간 3년 경과한 시료에서 31.8%로 최대 함량을 나타내었다. 이와 같은 결과는 발효 및 숙성 중 발효 미생물의 효소 작용에 의한 당의 성분 변화에 기인한 것이라 생각된다.

Kim 등(25)에 따르면 산야채 추출물 발효액의 발효에 의한 당 함량 변화를 조사한 결과, 발효기간 0, 3, 6개월에 따라 큰 변화가 없었으나 과당은 약간 감소하고 포도당은 증가하였다. 또한 실험에 사용한 흑설탕의 당 함량을 측정한 결과, 설탕은 검출되지 않았으며 과당 44.4%, 포도당 50.1%가 함유되어 있는 것으로 보고되었다. 따라서 발효되기 전부터 설탕이 분해되었으며, 흑설탕 자체의 이러한 특성 때문에 발효 중 효소 작용에 의한 당의 변화가 거의 없는 것으로 보고하였다. 반면에 본 연구에서 프락토올리고당으로 절입하여 발효 숙성시킨 미나리 발효액에서는 첨가한 프락토올리고당에 존재하는 설탕과 포도당이 1년 발효 숙성하는 과정에서 발효미생물에 의해서 이용되어 설탕은 완전히 소비되었으며, 포도당과 과당이 4% 수준을 나타냈다. 숙성기간이 증가하면서 미나리 발효액이 과당과 포도당이 증가하는 경향을 보이면서 설탕으로 절입한 산야채 발효물과 상이한 결과를 나타내었다. 이는 미나리 당 절입에 첨가된 올리고당이 포도당과 과당이 결합된 성분으로 미나리 발효액의 장기간 숙성과정에서 발효미생물에 의한 가수분해 작용으로 포도당과 과당성분이 증가하는 것으로 사료된다.

플라보노이드 함량 측정

대부분의 천연 식물에는 특수한 색깔과 고유한 맛을 주는 페놀성 화합물이 존재하며(29), 천연식물의 페놀성 화합물들은 단순한 phenol류, phenolic acid, phenylpropanoid류 및 flavonoid류 등이 대부분으로 항균, 항알러지, 항바이러스성, 항염성, 항암, 항

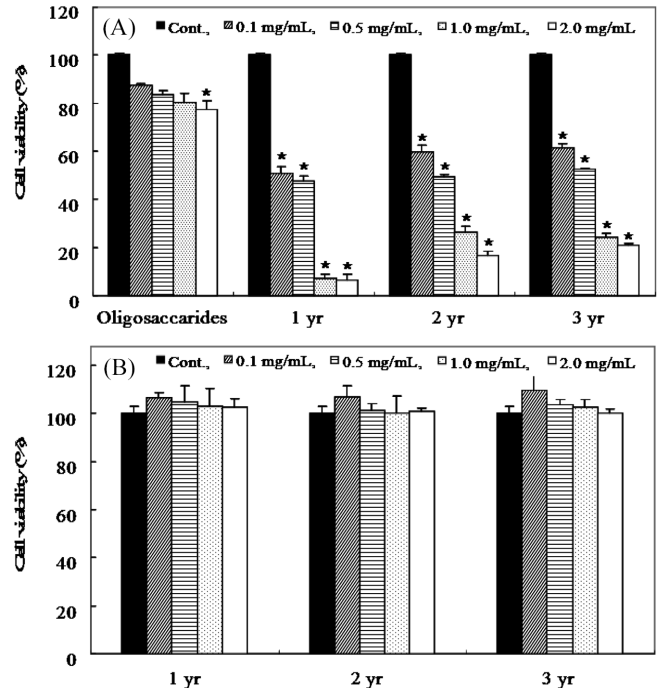


Fig. 1. Effects of the fermented dropwort extracts on cell proliferation during fermentation period. (A) Human hepatoblastoma HepG2 cells; (B) normal liver Chang cells; Control (oligosaccharide); 1, 2, 3 yr are the fermented extracts as described in ‘Materials and Methods’. **p*<0.001 represents the significance of the difference from the control.

산화, 충치 예방, 심장 질환 및 당뇨병 예방 등 다양한 생리활성 기능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다(30,31).

발효기간에 따른 미나리 발효 추출액의 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 3과 같았다. 미나리 발효 추출액의 1년에서 288.36 µg/mL로 최대 함량을 나타냈으나, 발효 및 숙성기간이 2년과 3년 경과한 시료에서 167.76 µg/mL과 89.58 µg/mL로 급격히 감소하는 경향이 두드러졌다.

발효 및 숙성기간이 경과할수록 플라보노이드 함량이 감소하는 경향은 발효 및 숙성과정 중 불안정한 플라보노이드계 화합물이 변화하는 것에 기인하는 것으로 사료되며, 또한 페놀 화합물 성분은 단백질이나 철분, 알칼로이드, 피리딘 등의 성분과 결합하여 침전을 형성하는 것으로 알려져 있다(32,33). 발효가 진행됨에 따라 페놀 화합물 성분한 플라액 중으로 유출되어 플라액 중의 다른 성분과 결합하여 여과 및 원심분리 과정에서 침전물로 제거됨으로써 함량이 감소한 것으로 판단된다.

미나리 발효농축액의 간암세포 성장 억제 효과

발효기간에 따른 미나리 발효농축액(고형분 함량 98%)의 간암세포 성장 억제율을 측정하기 위해 정상 간 세포주와 간암 세포

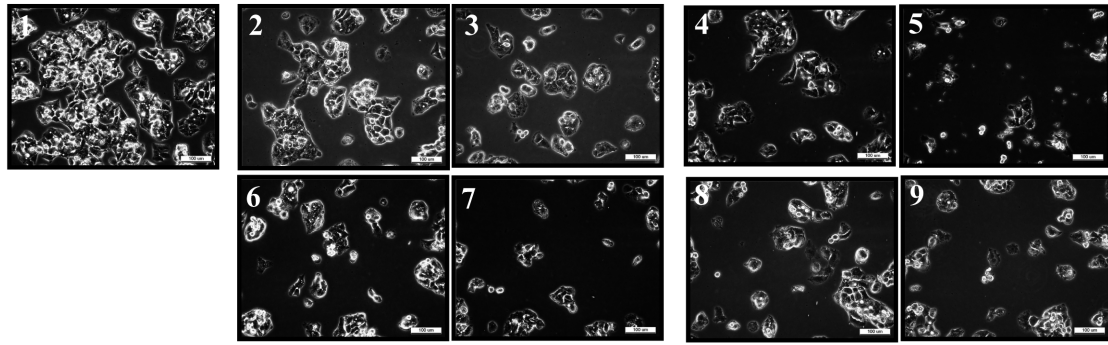


Fig. 2. Light microphotographs using inverted microscopy (magnification×400) of HepG2 cells treated with the fermented dropwort extracts. HepG2 cells were treated with the sample for 12 h (1: control; 2, 4, 6, 8 : 0.1 mg/mL; 3, 5, 7, 9 : 1.0 mg/mL).

주에 농도별로 시료 처리를 한 후 각 세포의 성장에 대한 효과를 알아보았다. 미나리 발효농축액의 경우 농도 의존적으로 억제 효과를 확인할 수 있었다. 동일 농도의 프락토올리고당으로 처리한 대조군의 cell viability를 100%로 보았을 때 특히 1년의 경우 1-2 mg/mL에서 10% 수준의 cell viability를 나타내면서 높은 간암 세포의 성장 억제 효과를 확인할 수 있었으며, 2년과 3년의 경우도 1 mg/mL에서 20% 수준의 cell viability를 보이면서 약간 감소된 억제율을 나타내었다(Fig. 1A). 한편, 동일 농도의 프락토올리고당으로 처리한 대조군의 정상 세포의 cell viability를 100%로 보았을 때 미나리 발효 농축액이 정상 간세포의 생존에는 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 1B). 미나리 발효액의 간암 세포에 대한 성장 억제효과는 시료에 존재하는 총 플라보노이드 함량과 상관관계가 있을 것으로 사료되며, 천년초선인장 열매의 물 추출물에 다량 함유된 플라보노이드 성분이 세포 성장을 억제하는데 관여한다는 연구 결과와 유사하다(34).

Yun 등(24)은 인진호탕(茵陳蒿湯)의 정상 간세포주와 간암세포주에 대한 성장 억제율이 HepG2세포의 경우 0.3, 0.5, 0.7 mg/mL의 농도에서 각각 72.3, 54.3, 42.2%까지 세포 생존율이 감소한 반면, Chang 세포의 경우에는 0.5 mg/mL의 농도까지 세포 생존율에 거의 영향을 미치지 않았고 1 mg/mL에서는 66.7%까지 감소되었다고 보고 한 바 있다. Kim과 Kwon(35)은 간암 세포주에 농도 구간 0.0001-1 mg/mL에서 알로에 베라 추출물을 처리하였을 때 1 mg/mL에서 유의적으로 세포 성장 억제 효과가 있다고 보고하였다.

따라서 발효 기간에 따른 미나리 발효농축액이 정상 간세포의 성장에는 영향을 미치지 않으면서 간암 세포주에 선택적으로 억제 효과를 나타내어 간 기능 개선 효과를 갖는 식물자원 발효소재라고 생각된다.

HepG2 세포의 형태 변화 관찰

발효 기간에 따른 미나리 발효농축액을 HepG2 세포에 농도별로 처리하였을 때 세포 형태와 세포의 수에 어떠한 영향을 미치는지 알아 본 결과는 Fig. 2와 같다. 대조군으로 사용된 프락토올리고당만 처리한 경우와 비교 하였을 때 미나리 발효농축액을 처리한 경우 농도 의존적으로 세포의 수가 감소되었으며, 세포의 크기도 줄어드는 변화를 확인할 수 있었다.

요 약

발효기간에 따른 미나리 발효추출액의 품질 특성을 검토하고 간암세포주에 대한 증식 억제 효과를 알아보았다. 발효 숙성 기

간 중에 총 플라보노이드 함량, 색도 및 생균수는 감소하였으며, 포도당과 과당과 같은 환원당 함량은 증가하였다. 정상 간세포주와 간암 세포주를 이용하여 농도별로 시료 처리를 한 후 각 세포의 증식에 대한 효과를 알아 본 결과, 미나리 발효액이 정상 간세포의 증식에 영향을 미치지 않았으며, 인간유래 간암 세포주인 HepG2의 증식을 농도 의존적으로 억제하였다. 특히 미나리 발효액 1년에서 현저한 억제 효과를 확인하였다. 본 연구 결과는 미나리 발효액의 발효 기간에 따른 품질의 변화 및 간암세포 성장 억제 효능을 확인함으로써, 천연의 미나리 발효 추출액을 다양한 식품 산업에 활용하기 위한 기초적 데이터를 처음으로 제시했다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 식품기술개발사업의 지원과 지식경제부 지정 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

1. Park SJ, Lee KS, An HL. Effects of dropwort powder on the quality of castella. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 17: 834-839 (2007)
2. Song GS, Kwon YJ. Analysis of the volatile constituents of *Oenanthe stolonifera* DC. *J. Korean Soc. Food. Nutr.* 19: 311-314 (1990)
3. Kim JK. *Illustrated Natural Drugs Encyclopedia*. Namsangdang, Seoul, Korea. p. 244 (1984)
4. Jo HW, Lee SH, Nam DH, Kim JY, Lim SK, Lee JS, Park JC. Antioxidant activity and phytochemical study on the aerial parts of *Oenanthe javanica*. *Korean J. Pharmacogn.* 39: 142-145 (2008)
5. Mun SI, Joh YG, Ryu HS. Protein and amino acid composition of watercress, *Oenanthe stolonifera* DC. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 19: 133-142 (1990)
6. Lee HY, Yoo MJ, Chung HJ. Antibacterial activities in watercress (*Oenanthe stolonifera* DC.) cultivated with different culture methods. *Korean J. Food Culture* 16: 243-249 (2001)
7. Fujita T, Kadoya Y, Aota H, Nakayama M. A new phenylpropanoid glucoside and other constituents of *Oenanthe javanica*. *Biosci. Biotech. Bioch.* 59: 526-528 (1995)
8. Park JC, Han SY, Yu YB, Lee JH. Isorhamnetin sulphate from the leaves and stems of *Oenanthe javanica* in Korea. *Planta Med.* 61: 377-378 (1995)
9. Rhee HJ, Koh MS, Choi OJ. A study on the volatile constituents of the water dropwort (*Oenanthe stolonifera* DC). *Korean J. Food. Sci.* 11: 386-395 (1995)
10. Lee KL, Park KY, Rhee SH. Antimutagenic effect of green-yel-

- low vegetables toward aflatoxin B1 and 4-nitroquinoline-1-oxide. J. Korean Soc. Food Nutr. 21: 143-148 (1992)
11. Park KY, Lee KI, Rhee SH. Inhibitory effect of green-yellow vegetables on mutagenicity in Salmonella assay system and on growth of AZ-521 human gastric cancer cells. J. Korean Soc. Food Nutr. 21: 149-153 (1992)
 12. Park JC, Yu YB, Lee JH, Kim NJ. Studies on the chemical components and biological activator of edible plants in Korea (VI)-antiinflammatory and analgesic effects of *Cedrela sinensis*, *Oenanthe javanica* and *Artemisia princeps* var. orientalis. J. Korean Soc. Food Nutr. 23: 116-119 (1994)
 13. Lee KA, Kim MS, Cho HB. Effect of extract of fermented dropwort on intestinal bacteria and enzymes *in vitro*. Korean J. Microbiol. 44: 358-361 (2008)
 14. Lee EG, Kim KB, Jeong JM. Hepatoprotective effects of poly herbal formulation (Hepa-1000) on t-BHP-induced toxicity in human hepatoma cells. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 35: 1121-1126 (2006)
 15. Whang TE, Lim HO, Lee JW. Effect of fermented (*Oenanthe stolonifera* DC) extract on the activity of enzymes related to liver function of alcohol-administered rats and mice. Korean J. Medicinal Crop Sci. 7: 107-114 (1999)
 16. Gabuzda GJ. Fatty liver in man and the role of lipotropic factors. Am. J. Clin. Nutr. 6: 280-297 (1958)
 17. Rubin E, Lieben CS. Hepatic microsomal enzymes in man and rats: Induction and inhibition by ethanol. Science 162: 690-691 (1968)
 18. Jeon EH. Isolation and characterization of aerobic spore-forming bacteria isolated from *cheonggukjang*. MS thesis, Chung-Ang University. Seoul, Korea (2003)
 19. Son MJ, Cha DG, Park JH, Kim CS, Lee SB. Manufacture of dropwort extract using brown sugar, fructose syrup, and oligosaccharides. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 34: 1485-1489 (2005)
 20. Luchsinger WW, Cornesky RA. Reducing power by the dinitrosalicylic acid method. Anal. Biochem. 4: 346-346 (1962)
 21. Nivea MM, Sanpietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol. 71: 109-114 (2000)
 22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Methods 65: 55-63 (1985)
 23. Kim PJ, Yun HJ, Lee YT, Seo KS, Park SD. The effects of Somok on apoptosis of human liver cancer HepG2 cell. Korean J. Oriental Medical Prescription 13: 111-123 (2005)
 24. Yun HJ, Kim BW, Lee CH, Jung JH, Heo SS, Park WH, Park SD. Herbal medicine In-un-Ho-Tang as a potential anti-cancer drug by induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. Korean J. Herbol. 22: 27-37 (2007)
 25. Kim NM, Lee JW, Do JH, Yang JW. Effects of fermentation periods on the qualities and functionalities of the fermentation broth of wild vegetables. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 272-279 (2003)
 26. Lee JH, Park JC, Yu YB. Isolation of steroids and flavonoids from the herb of *Oenanthe javanica* DC. Korean J. Pharmacogn. 24: 244-246 (1993)
 27. Seo WH, Baek HH. Identification of characteristic aroma-active compounds from water dropwort (*Oenanthe javanica* DC.). J. Agr. Food Chem. 53: 6766-6770 (2005)
 28. Kim MH, Kim SD, Kim KS. Effect of salting conditions on the fermentation and quality of dandelion (*Taraxacum Platycarpum* D.) kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 1142-1148 (2000)
 29. Kim IW, Shin DH, Choi U. Isolation of antioxidative components from the bark of *Rhus verniciflua* STOKES screened from some chinese medical plants. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 885-863 (1999)
 30. Azuma K, Nakayama M, Koshica M, Lppoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, Yamaguchi Y, Ito H, Higashio H. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. J. Agr. Food Chem. 47: 963-966 (1999)
 31. Eun JB, Jung YM, Woo GJ. Identification and determination of dietary fibers and flavonoids in pulp and peel of korean tangerine (*Citrus aurantium* va.). Korean J. Food Sci. Technol. 28: 371-377 (1996)
 32. Van BJ, Robinson WB. Formation of complex between protein and tannic acid. J. Agr. Food Chem. 17: 772-775 (1969)
 33. Oh HI, Hoff JE. pH dependence of complex formation between condensed tannins and proteins. J. Food Sci. 52: 1272-1276 (1987)
 34. Yoon JA, Hahm SW, Park JE, Son YS. Total polyphenol and flavonoid of fruit extract of opuntia humifusa and its inhibitory effect on the growth of MCF-7 human breast cancer cells. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 1679-1684 (2009)
 35. Kim IR, Kwon HJ. Induction of apoptosis by Aloe Vera extract in human hepato cellular carcinoma HepG2 cells. J. Toxicol. Pub. Health 22: 329-332 (2006)