

## 발효과정이 솔잎 착즙액의 항산화, $\alpha$ -Glucosidase 및 Angiotensin Converting Enzyme 저해 활성에 미치는 영향

김소윤<sup>1</sup> · 이현정<sup>1</sup> · 박재희<sup>1</sup> · 김래영<sup>2</sup> · 정현숙<sup>3</sup> · 박은주<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경남대학교 식품영양학과

<sup>2</sup>창신대학 호텔조리제빵과

<sup>3</sup>조선대학교 생명공학과

## Effects of Fermentation on the Metabolic Activities of Pine Needle Juice

So-Yun Kim<sup>1</sup>, Hyun-Jung Lee<sup>1</sup>, Jae-Hee Park<sup>1</sup>, Rae-Young Kim<sup>2</sup>,  
Hyeonsook Cheong<sup>3</sup>, and Eunju Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food and Nutrition, Kyungnam University, Gyeongnam 631-701, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Hotel Culinary and Bakery, Chang-Shin College, Gyeongnam 630-764, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Biotechnology, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

### Abstract

The objective of this study was to compare the content and metabolic activities between fresh pine needle juice (PNJ) and fermented pine needle juice (FPNJ). A variety of factors were measured, including total phenolic content (TPC), antioxidant activity [DPPH radical scavenging activity (RSA), total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), cellular antioxidant capacity (CAC)], anti-genotoxic activity,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity. The TPC was  $17.3 \pm 0.2$  and  $4.6 \pm 0.0$  mg GAE/g in PNJ and FPNJ, respectively. The DPPH RSA, TRAP, and ORAC values increased in a dose-dependent manner for both PNJ and FPNJ, with significantly higher activities in PNJ than FPNJ. The CAC against AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cells was protected by both PNJ and FPNJ. Pretreatment with PNJ and FPNJ in human leukocytes produced significant reductions in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage at a concentration of 50  $\mu$ g/mL.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity was significantly higher in FPNJ than PNJ. The ACE inhibitory activity was about 87.1% and 60.0% in 1:1 diluted PNJ and FPNJ, respectively. This study suggests that the fermentation of PNJ could enhance the regulation of blood glucose metabolism and both PNJ and FPNJ might be a new potential source of natural antioxidant, anti-diabetic, and anti-hypertensive agents applicable to food.

**Key words:** *Pinus densiflora*, antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase, angiotensin converting enzyme, fermentation

### 서 론

국민경제가 발전하고 생활수준이 향상됨에 따라 평균수명이 증가하는 반면, 식생활의 변화에 따른 고지혈증, 고혈압, 당뇨병, 심혈관질환 등과 암으로 인한 사망률은 증가되고 있다. 특히 각종질병과 노화의 원인이 되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 흡연, 음주, 약물, 식습관 등의 외부요인이나 호기 호흡을 하는 모든 생명체의 에너지 대사과정에서 생성되며 이러한 ROS에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress)는 세포내 단백질, 지질 및 DNA의 기능적 손상을 유도한다(1,2). 따라서 증가하는 성인병과 암, 노화 등을 예방하기 위해 유리라디칼의 생성을 지연시키거나 활성을 저해하는 기능성식품 개발에 대한 관심이 높아지고

있는 추세이며, 특히 합성물질이 첨가된 식품보다 야생 식품 자원에 기원한 안전성이 확보된 기능성식품의 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(3,4).

이 중 우리나라 삼림의 대표적인 수종이면서도 목재로서의 활용성이 떨어지는 소나무(*Pinus densiflora* Siebold et Zuccarini)를 의약 및 식품과 관련한 생물자원으로 개발하고자 하는 연구들이 시도되고 있다. 침엽수의 대표적인 소나무는 소나무과(Pinaceae)에 속하는 상록 교목으로 전국의 산지에 자생하며, 예로부터 잎, 솔방울, 꽃가루, 송진, 껍질 등 모든 부위가 구황식물로 이용되어 왔다. 솔잎은 방부, 살균, 및 향기를 돋우는 효과뿐만 아니라 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병, 신경통 등의 노화 관련 질환 예방과 같은 약리적 효능을 가진 식품으로 이용되어 왔다(5). 솔잎은 114 kcal/100 g의

\*Corresponding author. E-mail: pej@kyungnam.ac.kr  
Phone: 82-55-249-2218, Fax: 82-0505-99-2139

에너지와 58.1% 수분, 4.5% 단백질, 32.9% 탄수화물, 3.9% 지방으로 구성되었으며(6), 솔잎의 성분으로는 식이섬유소, chlorophyll, carotene, terpenoids, quercetin, kaempferol 등의 flavonoid류, tannin, alkaloids 화합물,  $\alpha$ -onene,  $\beta$ -pinene 및 camphene 등의 정유성분과 다량의 phenolic compounds가 보고되었다(7,8). 솔잎의 생리활성에 관한 연구로는 솔잎 추출물의 항산화활성(9,10), 면역활성(11,12), 항비만(13), 지질대사관련 효과(14), 솔잎으로부터 프리라디칼 소거작용이 뛰어난 항산화 성분인 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone을 분리한 연구 등이 수행되었다(15). 대부분의 솔잎에 대한 연구는 솔잎을 용매추출하거나 건조하여 그 활성을 분석하는 연구들이 주를 이루고 있으며, 솔잎을 착즙하여 생리활성을 분석한 연구는 부족한 실정이다.

한편 식물추출물은 발효과정을 통해 많은 효소작용으로 생성된 성분들에 의해 새로운 생리조절기능을 나타낼 수 있을 뿐만 아니라(16), 풍미 및 저장성 증가, 독성 감소 등의 장점으로 인하여 발효 공정에 의한 기능성 가공품의 개발과 그 유용성이 기대되고 있다. 그러나 발효에 의한 생리활성 변화는 다양하게 나타날 수 있는데 Cha 등(17)은 40종의 한방생약재추출물의 항산화활성이 발효에 의해 증가하거나 혹은 감소하는 상반된 효과를 나타내는 것으로 보고하였으며, 이는 식물의 특성에 따라 발효가 생리활성에 미치는 영향에 차이가 있음을 보여주는 결과이다. 몇몇의 연구에서 식물추출물 발효액의 활성을 보고하고 있으나(18-20) 솔잎추출물(16,21)의 발효가 생리활성 변화에 미치는 영향에 대한 연구는 부족한 실정이므로, 이에 본 연구에서는 솔잎착즙액의 다양한 생리활성을 분석하기 위하여 항산화활성, 항유전독성, 항당뇨활성 및 항고혈압활성 등을 조사하고, 솔잎착즙액의 발효가 이러한 활성의 변화에 미치는 영향을 분석하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

항산화 활성 분석에 사용된 Folin-Ciocalteu's phenol, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)에서 구입하였고, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), hydrogen peroxide, Histopaque 1077, gallic acid, pyrogallol, fluorescein은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, RPMI 1640, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 항당뇨 효과를 확인하기 위해  $\alpha$ -glucosidase 효소로 사용한 rat intestinal acetone powder와 항고혈압 활성 분석에 사용된 N-hippuryl-L-histidyl-L-leucine hydrate, rabbit lung acetone powder는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였고, glucose kit는 Bioclinical system(Anyang, Ko-

rea)에서 구입하였다. Trizma hydrochloride(Tris-HCl), dimethyl sulfoxide(DMSO) 등을 비롯한 기타 시약 및 용매는 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

### 솔잎착즙액과 솔잎발효액 제조

본 실험에서 사용된 솔잎착즙액과 솔잎발효액은 2012년 2월에 조선대학교에서 제공받아 사용하였다(21). Park 등(21)은 솔잎착즙액의 발효기간(1, 4, 7년)에 따른 superoxide anion radical 소거능력을 측정된 결과 모든 발효기간에서 높은 항산화력을 나타내었으며, 발효기간에 따른 유의적인 차이는 없었음을 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 솔잎발효기간의 효율성과 식물추출물 발효액의 활성 변화에 대한 연구결과들(16,18-20)을 바탕으로 2년간 발효시킨 솔잎발효액을 분석에 사용하였다. 솔잎은 아황산가스의 오염을 최소화하기 위해 해발 350 m 이상에서 자란 청정지역의 건강한 소나무를 선택하여 영양상태가 좋은 가지부분을 채취한 후 싱싱하고 푸른 잎만을 선별하였다. 솔잎의 불순물이 녹아 나오도록 흐르는 물에 담근 후, 맑은 물이 나올 때까지 3~4회 세척하고 다시 솥을 우려낸 물로 1회 세척하였다. 솔잎 표면의 수분을 완전히 탈수한 뒤 착즙기로 분쇄하여 착즙하였으며, 착즙된 솔잎액을 4°C에서 섬유소 층과 상정액을 저온 분리하여, 상정액만을 모은 솔잎착즙액과 상정액을 상온에서 2년간 발효시킨 솔잎발효액을 분리하였다.

### 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 분석방법으로 널리 사용되고 있는 Folin-Denis 방법(22)으로 측정하였다. 즉 시료 1 mL를 취하여 증류수 1 mL를 가하여 희석하고 1 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent 2 mL를 가하여 실온에서 3분간 방치한 후, 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 용액 2 mL를 가하여 이 혼합액을 1시간 동안 상온에서 방치하였다. 1시간 후 혼합액을  $13,400 \times g$ 에서 5분간 원심 분리 하고 상층액 200  $\mu\text{L}$ 를 취하여 ELISA reader(Sunrise, Tecan Co. Ltd., Grödig, Austria)를 사용하여 690 nm에서 흡광도를 측정하였다. 일반적으로 식물성분의 항산화 활성은 페놀성 화합물이 원인물질로 관련되어 있는 것으로 알려져 있어 gallic acid를 표준물질로 사용하여 검량선을 작성하였으며, 총 페놀 함량은 mg gallic acid equivalents(GAE)/g 단위로 나타내었다.

### 솔잎착즙액과 솔잎발효액의 항산화활성 측정

**DPPH 라디칼 소거능:** DPPH 라디칼 소거능은 Mensor 등(23)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 0.2 mM DPPH 에탄올 용액 80  $\mu\text{L}$ 를 농도별(10, 100, 250, 500, 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 시료 20  $\mu\text{L}$ 에 가한 후 10초 동안 혼합하고 상온에서 10분간 반응시켜 ELISA reader(Sunrise, Tecan Co. Ltd.)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 무처리구에는 DMSO 20  $\mu\text{L}$ 를 처리하여 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 DPPH radical 소거능은 아래의 식에 의해 계산하였으며, 시료를 첨가하지 않은 무처리구와 흡광도 차를 비교하여 free radi-

cal의 제거 활성을 백분율로 나타내었다. 각 용매별로 DPPH radical을 50% 저해하는 농도인 IC<sub>50</sub>(inhibitory concentration)을 구하였다.

Radical scavenging activity (RSA, %)=(1 - A/B)×100

A: 시료첨가구의 흡광도

B: 무처리구의 흡광도

**총 항산화능(total radical trapping antioxidant potential; TRAP):** 총 항산화능은 Rice-Evans와 Miller의 inhibition assay 방법에 따라 분석하였다(24). 이 방법은 150 μM ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)와 2.5 μM metmyoglobin을 75 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 활성화 시킴으로써 생성된 ferryl myoglobin 라디칼종의 상호작용에 의해 형성된 ABTS radical cation의 흡광도를 측정하는데 기초를 두고 있으며 그 흡광도의 억제 정도는 시료의 항산화능에 비례한다. 시료를 6분 동안 30°C에서 배양한 후 UV/VIS spectrophotometer(UV 1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 740 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 TRAP 농도는 Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)의 검정곡선(calibration curve)을 이용하여 계산하였으며 TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity, mM)로 표현하였다.

**ORAC(oxygen radical absorbance capacity) assay:** Peroxyl radical 소거능은 총 항산화능을 양적으로 측정하여 항산화 활성을 평가하는 Kurihara 등(25)의 peroxyl radical scavenging capacity(ORAC<sub>ROO·</sub>) 분석법을 이용하였다. 술잎착즙액과 술잎발효액(2, 5, 10, 50, 100 μg/mL)에 peroxyl radical 생성을 위한 AAPH를 최종 반응 농도가 20 nM이 되도록 처리하고 형광표준 용액 fluorescein을 최종 반응 농도가 40 nM이 되도록 처리하였으며(26), 최종 반응 농도 1 μM의 Trolox를 control standard로 사용하였다. Peroxyl radical의 감소를 나타내는 형광감소율은 GENios fluorescence plate reader(Tecan Trading AG, Salzburg, Austria)를 이용하여 excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 매 2분마다 2시간 동안 측정하였다. 술잎착즙액과 술잎발효액의 ORAC value는 각 시료의 형광이 감소하는 곡선 아래 부분의 총 면적(net area under the curve)을 산출하여 vitamin E 수용성 유도체인 1 μM Trolox에 의해 보호된 curve area와 비교하여 trolox equivalents(TE)로 나타내었다.

**Cellular antioxidant capacity(CAC) assay:** HepG2 세포를 이용한 살아 있는 세포 내에서 술잎착즙액과 술잎발효액의 항산화 활성 측정을 위한 CAC assay는 DCFH-DA 분석법(27)을 변형하여 측정하였다. 즉 96-well plate에서 HepG2 5×10<sup>4</sup> cells/mL를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 함유하는 DMEM으로 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 형광에 안정한 HBSS(Hank's balanced salt solution)를 각 well에 200 μL 분주한

후 최종 농도가 100 μg/mL가 되도록 각 시료를 처리하여 30분 동안 배양하였다. 배양 후에 HBSS로 세척하고, HBSS 200 μL에 peroxyl radical 발생을 위해 80 mM AAPH 2 μL를 가하여 30분 동안 배양하였다. 형광 probe로 40 mM DCFH-DA 2 μL를 가하고 빛을 차단하여 30분 동안 배양한 후 GENios fluorescence plate reader(Tecan Trading AG)를 이용하여 excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 형광의 발생 정도를 측정하였다. 음성대조군(negative control)은 DCFH-DA만을 처리하였으며, 양성대조군(positive control)에는 AAPH와 DCFH-DA를 처리하였다. 대조군의 형광값을 100%로 하여 각 시료와 AAPH의 상대적인 형광값을 비교하였다.

#### 술잎착즙액과 술잎발효액의 항유전독성 측정

**혈액 내 백혈구 세포 분리:** 건강한 성인남성 2명으로부터 채혈한 신선한 전혈에서 Histopaque 1077(Sigma)을 이용해 백혈구를 분리한 후 본 실험에 사용하였다. 본 연구는 인간을 대상으로 하는 의학연구의 윤리원칙을 제시한 세계의사협회 총회(World Medical Association)의 헬싱키 선언(Declaration of Helsinki)의 윤리적 가이드라인에 따라 수행하였다(28).

**시료의 처리 및 산화적 스트레스 유발:** 단세포전기영동법(single cell electrophoresis assay)이라고도 불리는 comet assay는 세포수준에서의 DNA 손상을 민감하게 감지해 낼 수 있는 방법으로 다양한 phytochemical의 DNA 손상 억제 효과를 분석하는데 이용되어 온 방법으로 손상된 DNA의 핵을 전기영동 하여 그 이동거리를 분석하는 기법이다(29). Singh 등(29)의 alkaline comet assay 방법에 따라 분리해 놓은 백혈구에 PBS로 희석한 술잎착즙액과 술잎발효액을 1, 5, 50 μg/mL의 농도로 처리하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 백혈구를 PBS로 세척한 후 인위적으로 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 200 μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 백혈구에 처리하여 4°C에 5분간 반응시킨 다음 다시 PBS로 세척하였다. 양성대조구에는 시료 대신 PBS를 처리한 후 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하였고, 음성대조구에는 PBS만을 처리하였다.

**DNA 손상 측정(Comet assay):** 반응을 끝낸 백혈구를 100 μL의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 후, 1.0% normal melting agarose(NMA)가 precoating된 normal slide 위로 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C에 방치하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μL로 중층하여 4°C에 방치하였다. Gel이 굳으면 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM tris, 1% sodium lauryl sarcosine, 1% Triton X-100, 10% DMSO)에 slide를 담가 암실에 1시간 동안 침지시켜 DNA 이중가닥을 풀어주었다. Lysis가 끝난 후, slide를 전기영동조에 배열하고 4°C의 차가운 전기영동 buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH>13)를 채워 20분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali

labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300±3 mA의 전압으로 20분간 전기영동을 실시하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 암실조건에서 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 차가운 중성용액(0.4 M tris buffer, pH 7.4)에 5분간 3회, 에탄올에 5분간 세척한 후 slide를 건조시켰다. Slide를 ethidium bromide(20 µg/mL)로 염색하여 형광현미경(LEICA DMLB, Wetzlar, Germany)의 CCD camera(Nikon, Tokyo, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image를 comet image analyzing system(Komet version 5.0, Kinetic Imaging, Liverpool, UK)을 통해 분석하였다. 백혈구의 hydrogen peroxide에 의한 DNA 손상 및 각 추출물에 의한 손상억제 정도는 핵으로부터 이동해서 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분 내 DNA 함량(tail intensity)을 측정하여 나타내었다.

#### α-Glucosidase 억제활성 측정

Rat intestinal acetone powder(1.86 unit/mg) 5 mg을 차가운 maleate buffer 1 mL와 혼합하여 녹인 후 4°C, 11,000 rpm에서 30분 동안 원심분리한 후 중간층을 α-glucosidase의 효소액으로 사용하였다. 솔잎착즙액 및 솔잎발효액 50 µL, 효소액 50 µL, 0.1 M maleate buffer 100 µL를 혼합하여 37°C에서 10분 동안 가온시킨 후, 이당류인 0.4% maltose 기질용액 50 µL를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 ice bath에 15분간 방치한 뒤 반응액 10 µL을 glucose 측정 kit 1 mL에 첨가하여 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후 흡광도 405 nm에서 측정하였다. 이때 양성대조구에는 시료 대신 acarbose를 1 mg/mL의 농도로 처리하였다.

#### ACE(angiotensin-converting enzyme) 저해활성 측정

ACE 저해활성은 기질인 Hip-His-Leu(N-hippuryl-L-histidyl-L-leucine hydrate)에 ACE가 작용하여 생성된 hippuric acid를 측정하는 원리를 통해 분석하였다. 분석을 위하여 0.4 M borate-NaCl buffer 10 mL에 rabbit lung acetone powder 1 g을 녹인 후 분리한 상층액을 ACE 효소액으로 사용하였으며, ACE inhibitor를 표준물질로 사용하였다. 100 mg/mL 솔잎착즙액 및 솔잎발효액 50 µL과 0.4 M borate-NaCl buffer에 용해시킨 12.5 mM Hip-His-Leu 기질용액 100 µL를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 100 mU/mL ACE 효소액 150 µL를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.5 M HCl 250 µL를 가하여 반응을 정지시키고, hippuric acid를 추출하기 위해 ethyl acetate 1.5 mL를 혼합하여 800×g에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액 500 µL를 dry oven에서 완전히 건조시킨 후 1 M NaCl 1.5 mL를 첨가하여 용해시키고 228 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ACE inhibition activity (%) = {1 - (SA - SB)/C} × 100

SA: 시료 첨가구의 흡광도

SB: 무처리구의 흡광도

C: 표준물질의 흡광도

#### 통계처리

모든 데이터의 통계처리는 SPSS/Windows 14.0(IBM, Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였고 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 신뢰수준 95%(p<0.05)에서 평균값들에 대해 유의성을 검증하였다. 각 항목은 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고, Duncan's multiple range test를 이용하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 또한 각 항목에 대하여 Pearson 상관분석을 실시하였으며, 솔잎착즙액과 솔잎발효액 간의 유의적인 차이는 Student t-test를 통해 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 솔잎착즙액과 솔잎발효액의 총 페놀 함량

솔잎착즙액과 솔잎발효액의 총 페놀 함량은 솔잎착즙액이 17.3 mg GAE/g, 솔잎발효액이 4.6 mg GAE/g으로 솔잎발효액보다 솔잎착즙액이 유의적으로(p<0.01) 3.7배 더 높은 총 페놀 함량을 나타내었다(Table 1). Kim 등(16)은 솔순(*Pinus densiflora* Siebold)의 총 폴리페놀 함량이 발효기간에 따라 증가하였으나 4개월 이후에는 감소한 것으로 보고하였으며, Kim 등(19)은 미나리 발효 추출액의 플라보노이드 함량이 발효 1년 경과 후 288.36 µg/mL의 최대함량을 나타내었으나, 발효 및 숙성기간이 2년, 3년 경과한 시료에서 각각 167.76, 89.58 µg/mL로 급격한 감소를 나타낸 것으로 보고하였다. 마찬가지로 마늘 발효액은 숙성기간이 경과함에 따라 1~12개월까지 총 폴리페놀 함량이 증가하였으나, 12, 24, 36개월 사이에는 유의적인 차이가 없었으며, 이에 따라 발효기간에 따른 전자공여능과 SOD 유사활성도 총 폴리페놀의 변화 양상과 유사한 결과를 나타내었음을 보고하였다(18). 따라서 발효의 원재료가 나타내는 각 식물 조직의 특성에 따라 발효에 의한 생리활성물질의 추출속도에 차이가 있는 것으로 보인다. 또한 다양한 생물학적 효과를 나타내며 일반적으로 항산화작용이 강한 것으로 알려진(30) 페놀 성분은 단백질, 철분, 알칼로이드, 피리딘 등의 성분과 결합하여 침전을 형성하는 것으로 알려져 있는데(31,32), 발효기간이 경과할수록 페놀 함량이 감소하는 경향은 발효액의 페놀성분이 다른 성분과 결합함으로써 침전을 형성하므로, 본 연구에서 2년간 발효한 솔잎발효액의 페놀성분이 침

Table 1. Total phenol contents of pine needle juice and fermented pine needle juice

	PNJ	FPNJ
TPC (mg GAE <sup>1)</sup> /g)	17.3±0.2**	4.6±0.0

All measurements were done triplicate, and values are average of three replication.

\*\*p<0.01, Significantly different between PNJ and FPNJ by Student t-test.

<sup>1)</sup>GAE: gallic acid equivalents.

전물로 제거됨으로써 솔잎착즙액보다 솔잎발효액의 페놀 함량이 감소한 것으로 사료된다.

또한 Lee 등(33)은 솔잎(*Pinus densiflora*) 80% 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량이 8.1±0.9 mg GAE/g인 것으로 보고하였으며, 본 연구의 솔잎착즙액은 이보다 약 2배 높은 총 페놀 함량(17.3 mg GAE/g)을 나타내었다. 또한 Kwak 등(34)은 75% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량이 57.71 mg tannic acid/g인 것으로 보고하였는데, 이는 껌잎, 쑥, 시금치, 브로콜리, 피망 및 파슬리보다 높은 함량임을 보고하였다. Maritime pine bark에 함유된 축합형 tannin인 proanthocyanidin(35)은 레드와인 및 포도씨의 주요한 폴리페놀 화합물(36,37)로 강한 항산화작용을 나타내는 것으로 보고되었으며, Kim 등(38)과 Park 등(39)은 솔잎에 함유된 proanthocyanidin과 catechin이 높은 항산화활성을 유도한다고 보고하였다. 따라서 솔잎착즙액과 솔잎발효액에 함유된 폴리페놀은 항산화활성을 향상시키는데 기여할 것으로 사료된다.

**솔잎착즙액과 솔잎발효액의 항산화활성**

DPPH radical 소거능은 비교적 안정한 DPPH radical이 수소공여체의 수소기와 결합하여 환원됨으로써 짙은 자색의 시약이 노란색으로 탈색되는 원리를 이용하여 항산화물질의 수소공여능 정도를 알아보는 측정법으로(40), 주로 phenolic 구조와 tocopherol, ascorbic acid, polyhydroxy 등 방향족 화합물에 많이 이용되는 방법이다(41). 솔잎착즙액과 솔잎발효액의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 솔잎착즙액과 솔잎발효액 모두 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며, 1 mg/mL 수준에서 솔잎착즙액과 솔잎발효액의 유리라디칼 소거능은 각각 33.3%, 21.4%로 솔잎착즙액이 솔잎발효액보다 유의적으로(p<0.01) 높은 활성을 나타내었다. IC<sub>50</sub>은 vitamin C가 28.0±0.3 µg/mL인데 비해 솔잎착즙액은 2,183.3±123.1 µg/mL, 솔잎발효액은 6,427.1±796.7 µg/mL로 솔잎착즙액이 솔잎발효액보다 유의적으로(p<0.01) 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다(Table 2). Cha 등(17)은 40종의 한방생약재 추출물의 발효에 의한 DPPH 라디칼 소거능 변화를 분석한 결과 다수의 한방생약재에서 발효에 의해 DPPH 라디칼 소거능이 감소하여 식물에 따라 각기 다른 활성 변화를 나타내는 것으로 보고하였는데, 본 연구에서도 솔잎착즙액의 발효는 DPPH 라디칼 소거능을 감소시키는 특성을 나타내었다. 또한 솔잎착즙액의 총 페놀 함량이 솔잎발효액보다 높은 것과 마찬가지로 DPPH 라디칼 소거능 또한 솔잎착즙액에서 더 높은 것은 일반적으로 페놀화합물의 양과 항산화능은 양의 상관관계를 나타내는 것과 일치한다(42). Choi 등(43)은 솔잎의 메탄올 추출물의 강한 항산화활성(DPPH 라디칼 소거능)이 catechol phenolic acid의 안정성에 의해 높은 라디칼 소거활성을 나타내는(44) 솔잎에 함유된 (+)-catechin의 우수한 DPPH 라디칼 소거활성에 기인한 것으로 보고하였으며, Jung 등(45)은 솔

**Table 2. DPPH radical scavenging activity (RSA) of pine needle juice and fermented pine needle juice**

	Conc. (µg/mL)	PNJ	FPNJ
DPPH RSA <sup>1)</sup> (%)	10	10.9±0.3 <sup>a</sup>	12.9±1.8 <sup>a</sup>
	100	10.5±1.1 <sup>a</sup>	12.6±2.1 <sup>b</sup>
	250	17.8±1.7 <sup>b</sup>	17.4±1.9 <sup>c</sup>
	500	22.1±3.5 <sup>c</sup>	16.6±1.3 <sup>d</sup>
	1,000	33.3±1.0 <sup>d**</sup>	21.4±2.4 <sup>c</sup>
IC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>2)</sup>		2,183.3±123.1 <sup>**</sup>	6,427.1±796.7

<sup>1)</sup>RSA: radical scavenging activity.

<sup>2)</sup>IC<sub>50</sub> (µg/mL): Concentration for scavenging 50% of DPPH radicals.

All measurements were done triplicate, and values are average of three replication.

<sup>a-c</sup>Means in the same column bearing different superscripts are significantly different (p<0.05).

\*\*p<0.01, Significantly different between PNJ and FPNJ by Student *t*-test.

잎의 flavonoids인 kaempferol 3-*O*-β-D-galactopyranoside, kaempferol 3-*O*-β-D-galactopyranoside 6''-acetate 및 lignan isolariciresinol xyloside가 강력한 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내는 것으로 보고하였다.

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) 양이온(ABTS<sup>•+</sup>)에 대한 항산화제의 복합된 활성을 측정하여 특정 물질의 총 유리기 포집 항산화능을 나타내는 TRAP assay에 대한 결과는 Table 3에 제시하였다. 솔잎착즙액과 솔잎발효액 모두 농도가 증가할수록 유의적으로 총 항산화능이 증가하였으며, 30~530 µg/mL 농도에서 솔잎착즙액이 솔잎발효액보다 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 또한 IC<sub>50</sub>은 솔잎착즙액(223.9±35.2 µg/mL)이 솔잎발효액(545.3±23.4 µg/mL)보다 유의적으로(p<0.01) 높은 활성을 나타내었다.

ORAC assay를 통해 솔잎착즙액과 솔잎발효액의 항산화 활성을 항산화 성분의 자유라디칼 소거 능력, 즉 radical chain breaking antioxidant capacity를 측정한 결과 솔잎착즙액과 솔잎발효액 모두 농도 의존적으로 ORAC<sub>ROO•</sub> 활성

**Table 3. Total antioxidant activity (TRAP) of pine needle juice and fermented pine needle juice**

	Conc. (µg/mL)	PNJ	FPNJ
TRAP (mM) TEAC <sup>1)</sup>	30	-0.01±0.06 <sup>a</sup>	-0.03±0.01 <sup>a</sup>
	60	0.31±0.04 <sup>b*</sup>	0.04±0.01 <sup>b</sup>
	130	0.99±0.01 <sup>c**</sup>	0.03±0.03 <sup>b</sup>
	260	1.28±0.02 <sup>d**</sup>	0.49±0.04 <sup>c</sup>
	530	1.47±0.01 <sup>e**</sup>	0.94±0.03 <sup>d</sup>
IC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>2)</sup>		223.9±35.2 <sup>**</sup>	545.3±23.4

<sup>1)</sup>TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity.

<sup>2)</sup>IC<sub>50</sub> (µg/mL): Concentration for scavenging 50% of ABTS radicals.

All measurements were done triplicate, and values are average of three replication.

<sup>a-c</sup>Means in the same column bearing different superscripts are significantly different (p<0.05).

\*p<0.05, \*\*p<0.01, Significantly different between PNJ and FPNJ by Student *t*-test.

Table 4. ORAC activity (ORAC<sub>ROO·</sub>) of pine needle juice and fermented pine needle juice

	Conc. (µg/mL)	PNJ	FPNJ
ORAC <sub>ROO·</sub> (TE <sup>1)</sup> )	2	0.7±0.2 <sup>a**</sup>	0.1±0.1 <sup>ab</sup>
	5	1.5±0.1 <sup>b**</sup>	0.4±0.0 <sup>b</sup>
	10	2.6±0.0 <sup>c**</sup>	0.9±0.2 <sup>c</sup>
	50	6.9±0.1 <sup>d**</sup>	3.8±0.4 <sup>d</sup>
	100	10.5±0.5 <sup>e**</sup>	5.7±0.2 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>TE: Trolox equivalent.

All measurements were done triplicate, and values are average of three replication.

<sup>a-c</sup>Means in the same column bearing different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , Significantly different between PNJ and FPNJ by Student *t*-test.

이 증가하였다(46). 동일농도에서 솔잎차즙액이 솔잎발효액보다 유의적으로( $p < 0.01$ ) 높은 ORAC<sub>ROO·</sub> 활성을 나타내었고, 100 µg/mL 농도에서 솔잎차즙액의 ORAC<sub>ROO·</sub> 활성이 10.5 µM TE로 유의적으로 가장 높았다(Table 4). Jung 등(47)이 솔잎에서 분리한 flavonoid glucosides인 kaempferol 3-*O*-β-D-glucoside와 6-C-methyl kaempferol 3-*O*-β-D-glucoside의 강한 peroxyxynitrite(ONOO<sup>-</sup>) 소거활성을 보고하였으며, 본 연구결과에서도 솔잎차즙액과 솔잎발효액이 우수한 peroxy radical 소거능을 나타내어 솔잎에 함유된 생리활성성분이 우수한 활성산소 방어기전을 가지고 있는 것으로 사료된다.

2,7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) probe를 이용하여 항산화제의 세포막 침투 정도와 세포 내에서 AAPH로 유도된 peroxy radical을 소거하는 항산화제 활성 정도를 측정하는 CAC assay를 수행하였다(48). HepG2 세포내 항산화능을 통해 솔잎차즙액과 솔잎발효액의 항산화 활성을 분석하기 위하여 AAPH로 산화적 스트레스를 유도하고 AAPH를 처리하지 않은 무처리군을 100%로 하였을 때, AAPH 처리군보다 솔잎차즙액 및 솔잎발효액 처리군의 CAC 활성이 농도 의존적으로 증가하였다. 또한 1~10 µg/mL의 저농도에서는 AAPH 처리군에 대한 ROS 억제율이 솔잎발효액보다 솔잎차즙액에서 2.0~2.6배 높은 경향을 나타냈으나, 100 µg/mL 고농도에서는 솔잎차즙액과 솔잎발효액 모두 30% 이상의 높은 활성을 나타내었으며 그룹간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Table 5). Takamatsu 등(49)은 세포내 항산화능은 시료에 포함된 항산화물질의 활성에 의존적이라고 보고하였다. 본 연구에서 솔잎차즙액과 솔잎발효액의 총 페놀 함량, DPPH 라디칼 소거능, 총 항산화 활성 및 ORAC 활성은 솔잎차즙액이 솔잎발효액보다 높았으며, DPPH 라디칼 소거능, TRAP assay 및 ORAC assay간의 상관관계를 분석해 본 결과 TRAP assay와 DPPH 라디칼 소거능( $r = 0.836$ ,  $p = 0.000$ ), TRAP assay와 ORAC assay( $r = 0.918$ ,  $p = 0.000$ ) 및 DPPH 라디칼 소거능과 ORAC assay( $r = 0.909$ ,  $p = 0.000$ )에서 매우 높은 양의 상관관계를 나타내었다. 즉 이러한 항산화 활성을 나타내는 솔잎차즙액에

Table 5. Cellular antioxidant capacity of pine needle juice and fermented pine needle juice

	Conc. (µg/mL)	PNJ	FPNJ
DCF Fluorescence Intensity (% of control)	NC	100.0±2.2 <sup>a</sup>	100.0±2.2 <sup>a</sup>
	PC	148.8±1.9 <sup>c</sup>	148.8±1.9 <sup>d</sup>
	1	126.7±9.0 <sup>b</sup>	137.8±9.3 <sup>c</sup>
	10	110.7±17.2 <sup>a</sup>	134.1±9.4 <sup>c</sup>
	50	107.5±0.8 <sup>a**</sup>	112.4±0.8 <sup>b</sup>
	100	103.3±1.4 <sup>a</sup>	99.2±3.7 <sup>a</sup>

All measurements were done triplicate, and values are average of three replication.

<sup>a-d</sup>Means in the same column bearing different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , Significantly different between PNJ and FPNJ by Student *t*-test.

포함된 항산화물질이 CAC 활성 증가에 영향을 미친 것으로 사료된다.

#### 솔잎차즙액과 솔잎발효액의 DNA 손상 억제능

솔잎차즙액과 솔잎발효액의 산화적 스트레스에 대한 DNA 손상 보호능을 Comet assay 기법(50,51)으로 수행한 결과 두 시료 모두 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 산화적 스트레스에 대해 농도 의존적으로 DNA 손상을 보호하였으며, 두 그룹간의 유의적인 차이는 없었으나 50 µg/mL 농도에서 솔잎발효액이 솔잎차즙액보다 높은 경향의 항유전독성효과를 나타내었다(Fig. 1). 식품 중에 포함된 암을 예방하는 대표적인 성분은 flavonoid, carotenoid, triterpene, lignin 등으로, 최근 다양한 약용 식물 내 함유되어 있는 폴리페놀 성분이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 백혈구 DNA 손상을 억제한다는 결과가 보고되었다(52). 또한 Jeong 등(53)은 솔잎 에탄올 추출물이 hydroxyl radical에 의해 유도되는 plasmid DNA의 cleavage를 보호하는 것을 보고하였으며, Lee 등(33)은 솔잎

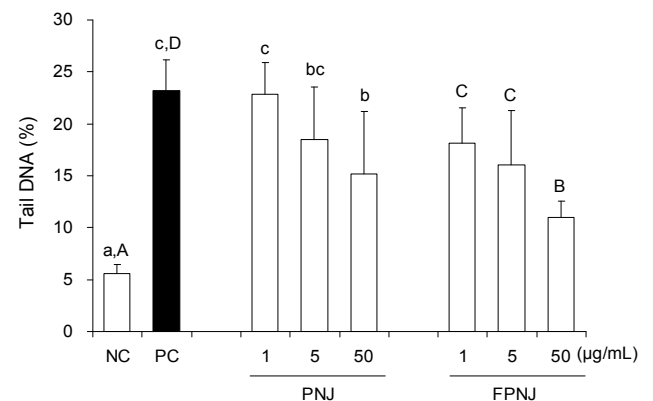
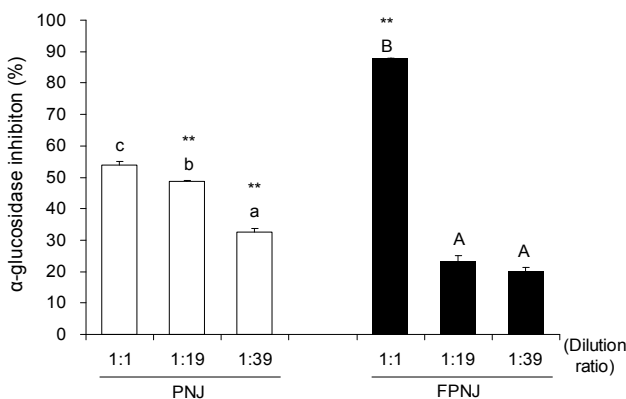


Fig. 1. The effect of pine needle juice and fermented pine needle juice (1, 5, 50 µg/mL) on 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced DNA damage in human leukocytes. NC, PBS-treated normal control (without oxidative stimulus); PC, 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated positive control. PNJ, pine needle juice; FPNJ, fermented pine needle juice. <sup>a-c</sup>Means with the same letter in between control (NC and PC) and PNJ are not significantly different ( $p < 0.05$ ). <sup>A-D</sup>Means with the same letter in between control (NC and PC) and FPNJ are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

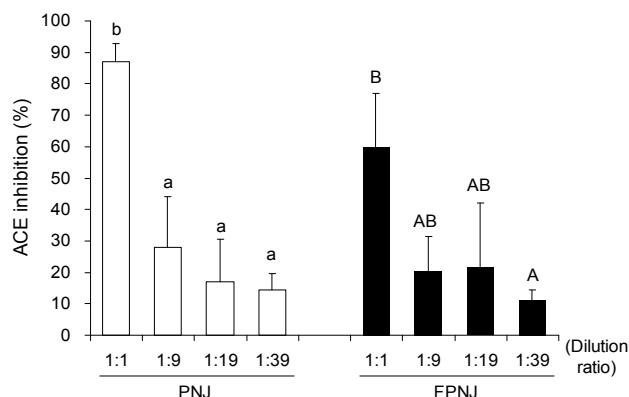
추출액과 솔잎추출액에서 분리한 페놀성 phytochemicals (EGCG, CG)이 인체유래 간암세포(SK-Hep-1)의 invasion 과 migration을 저해함으로써 솔잎의 화학적 암예방 효과를 나타내는 것으로 제안하였다. 따라서 솔잎착즙액과 솔잎발효액에 포함된 폴리페놀 성분이 산화적 스트레스로 유도되는 DNA 손상을 보호하였을 것으로 사료된다. 한편 솔잎에는 carotene, terpenoids, flavonoid류 및 phenol류뿐만 아니라 vitamin C가 풍부하게 함유되어 있다(7,8). Vitamin C는 vitamin E, uric acid, superoxide dismutase과 마찬가지로 지질과산화와 유도반응을 저해하거나 지질과산화의 증폭반응을 정지시켜 이미 생성된 free radical을 포착하여 제거하는 항산화제로서, 암의 발생을 예방하는 효과가 있음이 입증된 영양소이다(54). 따라서 솔잎에 함유된 vitamin C는 항산화 활성과 항암작용을 증가시킬 것으로 추측된다.

**솔잎착즙액과 솔잎발효액의 α-glucosidase 억제활성**

식품으로부터 섭취한 다당류는 α-amylase에 의해 이당류로 분해되고, 최종적으로 α-glucosidase가 이당류를 단당류로 분해함으로써 소장의 용털로 흡수된 후 혈관으로 이동되므로(55), 이당류 분해효소인 α-glucosidase의 활성 억제는 당질가수분해와 흡수를 지연시켜 식후 급격한 혈당농도의 증가를 조절할 수 있다. 본 연구에서 솔잎착즙액과 솔잎발효액의 α-glucosidase 저해활성은 Fig. 2에 제시하였다. 2배(1:1) 희석 시 솔잎추출액 53.9%, 솔잎발효액 87.8%으로 솔잎발효액이 솔잎착즙액보다 유의적으로 높은 α-glucosidase 억제능을 나타내었으나, 희석비율이 20배(1:19), 40배(1:39)로 증가함에 따라 솔잎발효액의 α-glucosidase 억제능은 각각 23.4%, 20.1%로 급격하게 감소하는 반면, 솔잎착즙액은 각각 48.7%, 32.7%로 솔잎발효액에 비해 비교적 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구결과는 솔잎추출액과 솔잎발효액이 탄수화물의 소화 과정에서 α-glucosidase에 의한 단당류 생성을 저해함으로써 식사 후 혈당이



**Fig. 2. Anti-diabetes activity of pine needle juice and fermented pine needle juice.** PNJ, pine needle juice; FPNJ, fermented pine needle juice. <sup>a-c,A-B</sup>Means in the same column bearing different superscripts are significantly different (p<0.05). <sup>\*\*</sup>p<0.01, Significantly different between PNJ and FPNJ by Student t-test.



**Fig. 3. Inhibition activity against angiotensin converting enzyme of pine needle juice and fermented pine needle juice.** PNJ, pine needle juice; FPNJ, fermented pine needle juice. <sup>a-b,A-B</sup>Means in the same column bearing different superscripts are significantly different (p<0.05).

급격히 상승하는 등의 증상을 제어할 수 있음을 간접적으로 시사하고 있다.

**솔잎착즙액과 솔잎발효액의 ACE 저해활성**

ACE는 renin에 의하여 생성된 angiotensin I 으로부터 C-말단 dipeptide(His-Leu)를 가수분해 시킴으로써 강력한 혈관수축작용을 나타내는 angiotensin II를 생성한다. Angiotensin II는 결과적으로 혈압을 상승시키므로, ACE 활성 저해를 통하여 혈관벽의 파괴나 뇌졸중 등의 질환 발생을 억제할 수 있다. 또한 녹차의 catechin, 메밀의 rutin과 같은 polyphenol 성분들은 ACE의 활성 저해인자로 알려져 있다(56). ACE 저해능을 통해 솔잎착즙액과 솔잎발효액의 항고혈압 활성을 분석한 결과 2배 희석 시 솔잎착즙액 87.1%, 솔잎발효액 60.0%로 솔잎착즙액의 ACE 저해활성이 높은 경향을 나타내었으며, 동일농도에서 솔잎착즙액과 솔잎발효액 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 3). Hong 등(57)은 솔잎 추출물 1 mg/mL에서 69.8%의 ACE 저해활성을 보고하였으며, Cho 등(58)은 솔잎 에탄올 추출물 100 µg/mL에서 60.8%의 저해활성을 보고하였다. 이러한 결과는 70% 이상의 높은 저해 효과를 보인 브로콜리, 돌미나리, 돌나물, 부추, 마늘 및 파슬리 열수추출물과 유사한 뛰어난 효능을 나타내고 있다(59). 따라서 솔잎추출물은 인체에 부작용이 적은 천연 항고혈압소재로서 이용가능성이 높은 것으로 사료된다.

**요 약**

솔잎착즙액과 솔잎발효액의 항산화활성을 분석하기 위하여 총 페놀함량, DPPH 라디칼 소거능, 총 항산화능, ORAC<sub>ROO·</sub> 활성, CAC 활성을 분석하였고, 항유전독성을 분석하기 위하여 DNA 손상 억제능을 분석하였으며, 항당뇨 효과와 항고혈압 효과를 분석하기 위하여 각각 α-glucosidase 및 ACE 저해활성을 분석하였다. 총 페놀 함량은 솔잎

착즙액(17.3 mg GAE/g)이 솔잎발효액(4.6 mg GAE/g)보다 유의적으로 3.7배 높았으며, 이는 발효가 진행됨에 따라 페놀 성분이 침전된 결과로 보인다. DPPH 라디칼 소거능, 총항산화능 및 ORAC<sub>ROO</sub>· 활성은 솔잎착즙액이 솔잎발효액보다 유의적으로 높았다. 즉 1 mg/mL 수준에서 솔잎착즙액과 솔잎발효액의 DPPH 라디칼 소거능은 각각 33.3%, 21.4%로 나타났고, 60~530 µg/mL 농도에서 솔잎착즙액이 솔잎발효액보다 유의적으로 높은 총 항산화능을 나타내었으며, 2~100 µg/mL 농도에서 솔잎착즙액이 솔잎발효액보다 유의적으로 높은 ORAC<sub>ROO</sub>· 활성을 나타내었다. 솔잎착즙액과 솔잎발효액의 CAC 활성은 AAPH 처리군보다 솔잎착즙액 및 솔잎발효액 처리군의 CAC 활성이 농도 의존적으로 증가하였으며, 50 µg/mL 농도를 제외하고 두 그룹 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 솔잎착즙액과 솔잎발효액의 항산화활성의 상관관계는 총 항산화능과 DPPH 라디칼 소거능( $r=0.836$ ,  $p=0.000$ ) 및 ORAC assay( $r=0.918$ ,  $p=0.000$ ) 간의 높은 양의 상관관계가 나타났을 뿐만 아니라 DPPH 라디칼 소거능과 ORAC assay( $r=0.909$ ,  $p=0.000$ ) 간에도 높은 양의 상관관계가 나타나 솔잎착즙액과 솔잎발효액의 높은 항산화활성을 추측할 수 있었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스에 대한 DNA 손상 억제능은 솔잎착즙액과 솔잎발효액에서 농도의존적으로 증가하였으며, 50 µg/mL 농도에서 솔잎발효액이 솔잎착즙액보다 더 높은 경향을 나타내었다. 솔잎착즙액과 솔잎발효액의 항당뇨 효과를 알아보기 위하여  $\alpha$ -glucosidase 억제능을 실험한 결과 회색배율이 증가할수록 솔잎발효액의  $\alpha$ -glucosidase 억제능은 급격히 감소하는 반면, 솔잎착즙액은 솔잎발효액보다 높은 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 항고혈압 효과 분석을 위한 ACE 저해활성은 2배 희석 시 솔잎착즙액 87.1%, 솔잎발효액 60.0%로 솔잎착즙액의 ACE 저해활성이 높은 경향을 나타내었다. 본 연구를 통해 솔잎착즙액의 다양한 생리활성을 평가하고자 하였으며, 발효가 이러한 생리활성에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. 본 연구에서 2년간 발효한 솔잎발효액만을 분석하였고, 발효기간에 따른 활성의 변화를 평가하지 못한 제한점이 있으나 본 연구의 결과는 지금까지 연구가 미흡했던 솔잎착즙액의 생리활성을 보고함으로써 솔잎을 활용한 기능성 소재개발에 유용한 자료로 제안될 수 있을 것이다. 또한 향후 연구에서 솔잎착즙액의 기능성을 증대시킬 수 있는 발효과정에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 기술사업화지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

- Poirer MC, Western A. 2002. DNA damage, DNA repair, and mutagenesis. In *Encyclopedia of Cancer*. Bertino JR, ed. Academic Press, Boston, MA, USA. p 79-87.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. 1994. *Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease*. Oxford University Press, Oxford, UK. p 1-62.
- Lee JM, Son ES, Oh SS, Han DS. 2001. Contents of total flavonoid and biological activities of edible plants. *Korean J Dietary Culture* 16: 504-514.
- Kim JH, Park JH, Park SD, Choi SY, Seong JH, Mon KD. 2002. Preparation and antioxidant activity of health drink with extract powders from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. *Korean J Food Sci Technol* 34: 617-624.
- Choi HY. 2009. Antioxidant activity and quality characteristics of pine needle cookies. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1414-1421.
- RDA. 2006. *Food Composition Table*. 7th ed. Rural Development Administration, National Institute of Agricultural Science and Technology, Rural Resources Development Institute, Suwon, Korea. p 402-403.
- Lim YS, Bae MJ, Lee SH. 2002. Antimicrobial effects of *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. ethanol extract on *Listeria monocytogenes*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 333-337.
- Lee OH, Kim KY, Jang MK, Yu KH, Kim SG, Kim MH, Lee SH. 2008. Evaluation of proanthocyanidin contents in total polyphenolic compounds of pine (*Pinus densiflora*) needle extracts and their antioxidative activities. *J Life Sci* 18: 213-219.
- Kim SM, Cho YS, Sung SK, Lee IG, Lee SH, Kim DG. 2002. Antioxidative and nitrite scavenging activity of pine needle and green tea extracts. *Korean J Food Sci Ani Resour* 22: 13-19.
- Yoo JH, Cha JY, Jeong YK, Chung KT, Cho YS. 2004. Antioxidative effects of pine (*Pinus densiflora*) needle extracts. *J Life Sci* 14: 863-867.
- Choi EM. 2007. Antinociceptive and antiinflammatory activity of pine (*Pinus densiflora*) pollen extract. *Phytother Res* 21: 471-475.
- Choi HD, Koh YJ, Choi IW, Kim YS, Park YK. 2007. Anticariogenic activity and glucosyltransferase inhibitory effects of extracts from pine needle and twig. *Korean J Food Sci Technol* 39: 336-341.
- Jeon JR, Kim JY, Lee KM, Cho DH. 2005. Anti-obese effects of mixture contained pine needle, black tea and green tea extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 375-381.
- Kang YH, Park YK, Ha TY, Moon KD. 1996. Effects of pine needle extracts on serum and liver lipid contents in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 367-373.
- Boo YC, Jeon CO, Oh JY. 1994. Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone from pine needles as an antioxidative principle. *Agric Chem Biotechnol* 37: 310-314.
- Kim NM, Lee JW, Do JH, Yang JW. 2003. Effects of the fermentation periods on the qualities and functionalities of the fermentation broth of wild vegetables. *Korean J Food Sci Technol* 35: 272-279.
- Cha JY, Yang HJ, Jeong JJ, Seo WS, Park JS, Ok M, Cho YS. 2010. Tyrosinase inhibition activity and antioxidant capacity by fermented products of some medicinal plants. *J Life Sci* 20: 940-947.
- Jung KH, Park CS. 2012. Physiological activities of fermented garlic broth during fermentation. *Korean J Food Preserv* 19: 406-412.



19. Kim MJ, Yang SA, Park JH, Kim HJ, Lee SP. 2011. Quality characteristics and anti-proliferative effects of dropwort extracts fermented with fructooligosaccharides on HepG2 cells. *Korean J Food Sci Technol* 43: 432-437.
20. Cho EK, Chol HE, Choi YJ. 2010. Antioxidant and anti-bacterial activities, and tyrosinase and elastase inhibitory effect of fermented Omija (*Schizandra chinensis* Baillon.) beverage. *J Appl Biol Chem* 53: 212-218.
21. Park GY, Li HX, Hwang ID, Cheong HS. 2006. The functional effects of fermented pine needle extract. *Korean J Biotechnol Bioeng* 21: 376-383.
22. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-243.
23. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, Leitão SG. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res* 15: 127-130.
24. Rice-Evans C, Miller NJ. 1994. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* 234: 279-293.
25. Kurihara H, Fukami H, Asami S, Toyoda Y, Nakai M, Shibata H, Yao XS. 2004. Effects of oolong tea on plasma antioxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *Biol Pharm Bull* 27: 1093-1098.
26. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619-4626.
27. Lautraite S, Bigot-Lasserre D, Bars R, Carmichael N. 2003. Optimisation of cell-based assays for medium throughput screening of oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 17: 207-220.
28. Shrestha BM. 2012. The Declaration of Helsinki in relation to medical research: historical and current perspectives. *J Nepal Health Res Counc* 10: 254-257.
29. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
30. Kim HY, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS. 2000. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1127-1132.
31. Van Buren JP, Robinson WB. 1969. Formation of complexes between protein and tannic acid. *J Agric Food Chem* 17: 772-777.
32. Oh HI, Hoff JE. 1987. pH dependence of complex formation between condensed tannins and proteins. *J Food Sci* 52: 1267-1269.
33. Lee SJ, Lee KW, Hur HJ, Chun JY, Kim SY, Lee HJ. 2007. Phenolic phytochemicals derived from red pine (*Pinus densiflora*) inhibit the invasion and migration of SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 1095: 536-544.
34. Kwak CS, Moon SC, Lee MS. 2006. Antioxidant, anti-mutagenic, and antitumor effects of pine needles (*Pinus densiflora*). *Nutr Cancer* 56: 162-171.
35. González-Castejón M, Rodríguez-Casado A. 2011. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: a review. *Pharmacol Res* 64: 438-455.
36. Ariga T, Hamano M. 1990. Radical scavenging action and its mode in procyanidins B-1, and B-3 from azuki beans to peroxyl radicals. *Agric Biol Chem* 54: 2499-2504.
37. Ricardo Da Silva JM, Darman N, Fernandez Y, Mitjavila S. 1991. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J Agric Food Chem* 39: 1549-1552.
38. Kim NY, Jang MK, Lee DG, Yu KH, Jang H, Kim M, Kim SG, Yoo BH, Lee SH. 2010. Comparison of methods for proanthocyanidin extraction from pine (*Pinus densiflora*) needles and biological activities of the extracts. *Nutr Res Pract* 4: 16-22.
39. Park YS, Jeon MH, Hwang HJ, Park MR, Lee SH, Kim SG, Kim M. 2011. Antioxidant activity and analysis of proanthocyanidins from pine (*Pinus densiflora*) needles. *Nutr Res Pract* 5: 281-287.
40. Kim KB, Yoo KH, Park HY, Jeong JM. 2006. Anti-oxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 328-333.
41. Cherdshewasart W, Sutjit W. 2008. Correlation of anti-oxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. *Phytomedicine* 15: 38-43.
42. Gheldof N, Engeseth NJ. 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem* 50: 3050-3055.
43. Choi JH, Kim HS, Jung MJ, Choi JS. 2001. (+)-Catechin, an antioxidant principle from the leaves of *Pinus densiflora* that acts on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Nat Prod Sci* 7: 1-4.
44. Ruiz-Larrea MB, Leal AM, Liza M, Lacort M, de Groot H. 1994. Antioxidant effects of estradiol and 2-hydroxyestradiol on iron-induced lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Steroids* 59: 383-388.
45. Jung MJ, Chung HY, Choi JH, Choi JS. 2003. Antioxidant principles from the needles of red pine, *Pinus densiflora*. *Phytother Res* 17: 1064-1068.
46. Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.
47. Jung MJ, Jung HA, Kang SS, Hwang GS, Choi JS. 2009. A new abietic acid-type diterpene glucoside from the needles of *Pinus densiflora*. *Arch Pharm Res* 32: 1699-1704.
48. Keston AS, Brandt R. 1965. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 11: 1-5.
49. Takamatsu S, Galal AM, Ross SA, Ferreira D, ElSohly MA, Ibrahim AR, El-Ferali FS. 2003. Antioxidant effect of flavonoids on DCF production in HL-60 cells. *Phytother Res* 17: 963-966.
50. Collins AR. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26: 249-261.
51. Poli P, Buschini A, Restivo FM, Ficarelli A, Cassoni F, Ferrero I, Rossi C. 1999. Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. *Mutagenesis* 14: 547-556.
52. Soltani F, Mosaffa F, Iranshahi M, Karimi G, Malekaneh M, Haghghi F, Behravan J. 2009. Evaluation of antigenotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress. *Cell Biol Toxicol* 25: 291-296.
53. Jeong JB, Seo EW, Jeong HJ. 2009. Effect of extracts from pine needle against oxidative DNA damage and apoptosis induced by hydroxyl radical via antioxidant activity. *Food Chem Toxicol* 47: 2135-2141.

54. Tappel AL. 1980. Vitamin E and selenium protection from in vivo lipid peroxidation. *Ann N Y Acad Sci* 355: 18-31.
55. van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, van de Lisdonk EH, Rutten GE, van Weel C. 2005.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: results from a Cochrane systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 28: 154-163.
56. Maruyama SK, Nakagomi N, Tomizuka N, Suzuki H. 1985. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric Biol Chem* 49: 1405-1410.
57. Hong TG, Lee YR, Yim MH, Hyun CN. 2004. Physiological functionality and nitrite scavenging ability of fermentation extracts from pine needles. *Korean J Food Preserv* 11: 94-99.
58. Cho EK, Song HJ, Cho HE, Kim MH, Choi IS, Choi YJ. 2009. Inhibitory effects of ethanol extracts from pine buds (*Pinus densiflora*) on angiotensin converting enzyme, xanthine oxidase and nitric oxide synthesis. *J Life Sci* 19: 1629-1636.
59. Bae IY, Shin HK, Yang CB. 1999. Studies on the inhibitory activity of angiotensin I converting enzyme of various vegetables. *The Journal of Korean Living Science Research* 17: 5-15.

(2012년 9월 18일 접수; 2013년 2월 27일 채택)