

미나리 발효액과 미나리 발효액을 이용한 식초의 특성 분석 및 glioma C6 세포에서 산화적 손상에 대한 보호 효과

김민주^{1,3} · 이삼빈^{1,2} · 최준혁¹ · 권승혁⁴ · 김형대³ · 방편호⁵ · 양선아^{2*}
¹계명대학교 식품가공학과, ²계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터,
³비슬청록농장, ⁴(주)생생초, ⁵경희대학교 피부생명공학센터

Characteristics of Fermented Dropwort Extract and Vinegar Using Fermented Dropwort Extract and Its Protective Effects on Oxidative Damage in Rat Glioma C6 Cells

Min-Ju Kim^{1,3}, Jun-Hyeok Choi¹, Seung-Hyuk Kwon⁴, Hyung-Dae Kim³, Myun-Ho Bang⁵, and Seun-Ah Yang^{2*}

¹Department of Food and Technology, Keimyung University

²The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University

³Bissell Chunglog Farm

⁴Sang Sang Cho Co., Ltd.

⁵Skin Biotechnology Center, Kyung Hee University

Abstract The quality of fermented dropwort extract (FDE) and fermented dropwort vinegar (FDV) was assessed for free sugar, organic acid and free and total amino acid content. Major organic acids were lactic acid in FDE and acetic acid in FDV. Free sugars in FDE were fructose and glucose, and those in FDV were fructose, sucrose, and maltose. Aspartic acid was the major free amino acid in both FDE and FDV. Additionally, the main free amino acids in FDE were alanine and γ -amino-n-butyric acid (GABA), while those in FDV were arginine and valine. Moreover, to investigate the protective effects of FDE and FDV against oxidative stress induced by t-BHP and H₂O₂, C6 cells were treated with FDE or FDV prior to inducing the oxidative damage. FDE and FDV inhibited cell death significantly in a dose-dependent manner. These data imply that FDE and FDV may be effective in neuronal cell protection against oxidative damage.

Keywords: dropwort, *Oenanthe javanica*, fermentation, vinegar, C6 cells

서 론

최근 경제성장과 더불어 생활수준의 향상으로 인한 웰빙 식품화로 소비자들의 건강에 대한 관심이 높아지면서, 질병예방, 노화방지 등의 각종 생리활성을 가진 기능성 제품의 수요가 점차적으로 증가하고 있다. 체내 신진대사와 산화된 식품의 섭취로 인해 기인되는 reactive oxygen species (ROS) 및 reactive nitrogen species (RNS)는 지질, 단백질, 그리고 핵산과 같은 체내 주요 물질의 비가역적 손상을 야기하며 인간의 노화 및 만성질환을 유발한다(1-3). 활성산소에 의한 산화를 억제하는 항산화 물질은 질병예방 및 완화에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 항산화 능력을 갖는 물질의 검색 및 연구가 활발히 진행되고 있다(4-6). 이와 관련하여 식초의 항산화 효과는 외국의 경우, 포도를 원

료로 만든 발사믹 식초(Balsamic vinegar)의 항산화활성이 높다고 보고되었다(7,8).

식초는 동서양을 막론하고 예로부터 이용되어 온 발효식품으로 식품에 첨가되는 기초산미료로 쓰이는 것은 물론 짠맛, 단맛 등의 음식 맛을 부드럽게 하고 특유의 향미를 더해 줄 뿐만 아니라, 소스, 마요네즈, 드레싱, 케첩의 원료, 향미 재료로 이용되며 의약품 및 미용재료로도 널리 사용되고 있다. 이러한 식초는 미생물을 이용하여 당류나 전분질을 함유하고 있는 여러 원료들을 알코올 및 초산 발효시켜 제조되며, 신맛을 내는 초산성분을 비롯하여 유기산과 아미노산, ester 및 각종 영양물질이 함유되어 있다(9-11). 위와 같은 식초성분들은 콜레스테롤 저하 및 체지방을 감소시켜 성인병 예방에 효과적이며, 젖산 분해에 따른 피로 회복 및 식품성분 내의 비타민 C 보호 작용 등의 효능이 있는 것으로 보고되어 있다(12,13). 식초의 여러 가지 효능이 과학적으로 규명되면서 식초 소비량은 점차 증가되고 고급화되어 단순한 조미 용도에서 식초음료 등 다양한 기능성 소재로 뿐만 아니라 건강식품으로도 관심이 높아지고 있다(14). 식초는 제조방법에 따라 발효과정을 거치는 양조식초와 빙초산을 희석해서 제조하는 합성식초로 구분되며(15,16), 건강식품의 하나로 천연 과실을 원료로 발효시킨 기능성 제품으로 다양한 건강용 천연 식초가 생산되고 있다. 특히 천연 식초는 유기산, 향기성분, 아미노산 조

*Corresponding author: Seun-Ah Yang, The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Tel: 82-53-580-6449

Fax: 82-53-580-6447

E-mail: seunahy@kmu.ac.kr

Received December 20, 2012; revised March 2, 2013;

accepted April 1, 2013

성, 관능적인 맛과 품질이 우수하여 생산과 소비가 증가하는 추세이다(17,18). 일본의 경우 과실초에 의한 피로회복효과, 면역력 증강효과 등의 생리활성에 대한 연구가 보고되었으며(18), 음료 시장의 약 80%를 천연 식초 시장이 자리매김을 하고 있어 블루베리, 망고, 와인식초 등 다양한 종류가 시장에 출시되고 있다(19). 또한 대부분이 발효식초로 특히 마시는 식초시장의 고급화 및 다양성으로 소비자의 관심을 이끌어 내고 있다(20). 국내에서는 최근 감식초 및 감식초 함유 음료가 지방 대사를 활성화하여 체지방 감소에 도움을 준다고 보고되었다(21). 식초의 제조공정과 관련하여 비휘발성유기성분의 변화(22)와 발효과정에서의 아미노산의 변화(23) 및 식초의 발효방식에 따른 향기성분의 변화 등에 대한 연구(24,25), 1단계 발효 또는 2단계 발효 등에 따른 식초의 변화(26,27), 고산도 식초의 제조에 따른 성분변화(28), 연속발효방법에 따른 식초의 변화에 대한 연구 등의 보고가 있다(29). 하지만, 식초의 다양한 생리활성을 입증하기 위한 *in vitro* 자료는 전무한 상태이다.

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 식욕을 되찾는 식품으로 이용되고 있다(30). 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(31). 한방에서는 수근(水芹)이라 하여, 미나리의 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, 식욕을 촉진시켜 대장 활동을 도와 변비를 예방한다(32,33). 또한, 음주 후에는 숙독을 제거하는데 사용하기도 하며, 민간요법에서는 이질을 치료하는데 효과가 있는 것으로 알려져 있다(34,35). 미나리의 독특한 향내의 원인인 정유의 주성분은 isoramentin, α -pinene, myrcene 등으로 알려져 있다(36). 미나리의 주요 성분으로는 수분 94.9%, 단백질 2.1%, 탄수화물 1.5%, 비타민 A와 B₁를 비롯하여 비타민 B₂와 C도 풍부하고, 칼슘, 인 및 철 등과 같은 무기성분도 고르게 함유되어 있다(30).

본 연구에서는 전보의 미나리 발효액의 간세포 보호 효과에 대한 연구(37)에 이어서 미나리 발효액을 이용하여 제조한 미나리식초의 기본적인 품질 특성 및 발효액 및 식초의 뇌신경세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과에 대하여 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에 사용된 미나리는 비슬청록농장(Daegu, Korea)으로부터 제공받았으며, 흑설탕은 CJ 제일제당(CJ Cheiljedang Co., Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 세포 배양에 사용된 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) 배지와 antibiotics, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Rockville, TN, USA)로부터 구입하였다. 세포 생존율 측정에 사용한 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT)는 Amresco (Solon, OH, USA)로부터, tert-butylhydroperoxide (t-BHP)와 hydrogen peroxide (H₂O₂)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

미나리발효초의 조제

미나리를 깨끗이 수세한 후 세척 및 살균된 용기에 넣고 흑설탕을 이용하여 상온에서 1년간 방치하면서 자연발효가 일어나도록 하여 미나리발효액을 준비한 후, 이 발효액만을 저장용기에 옮겨 4°C 냉장실에서 냉장보관하면서 2년간 더 숙성시켜 미나리 발효액을 제조하였다. 미나리 발효액과 (주)생생초에서 제공 받은 효모(*S. cerevisiae*, KCTC 18224P)와 초산균(*Gluconobacter* sp. KSH-B1, KCTC 18223P)을 이용하여 미나리 발효식초를 제조하였다. 즉, 상기 미나리 발효액(52°Bx)을 정제수를 이용하여 실온에서 12°Bx로 희석한 후, 효모를 접종하여 알코올 발효를 수행하고, 초산균을 접종하여 초산발효를 수행하였다. 이때, 총산은 초산으로서 5 내지 6 중량%가 되도록 하였다. 그 후 상기 발효 혼합물로부터 침전물을 제거하는 1차 여과를 통해 상등액을 취한 후, 다시 규조도여과를 통해 2차 여과를 수행하였다. 2회의 여과 후 얻어진 상등액을 90°C에서 40초 동안 순간살균한 후 냉각시키며, 1.0 μ m 필터를 이용하여 3차 여과를 수행하여 미나리 발효초를 제조하였다. 미나리 발효초(1 kg)의 효능 평가를 위하여 동결건조하여 분말(22.70 g)을 제조하여 -20°C에서 보관하면서 생리활성을 측정하였다.

미나리발효액 및 식초의 유기산 측정

시료 1 g을 100 mL 증류수로 교반 후, 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 상층액을 여과하여 HPLC (Waters 1695, Waters Co., Milford, MA, USA)로 정량분석하였다. 이때 사용한 컬럼은 Capcellpak C18 (UG120) (150×4.6, 5 μ m), 검출기는 UV detector (Waters series 2487, 210 nm)를 사용하였고, 이동상은 용매 A (50 mM sodium hexasulfonate, 20 mM H₃PO₄)와 용매 B (distilled H₂O)를 gradient법으로 용매 이동속도 1.0 mL/min, 시료 주입량 10 μ L, 컬럼 온도 25°C의 조건으로 측정하였다.

미나리발효액 및 식초의 유리당 측정

시료 5 g을 25 mL 증류수와 아세트니트릴 50 mL로 정용한 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 여과하여 HPLC (Waters 1695)로 정량분석 하였다. 이때 사용한 컬럼은 Sugar-pakTM1 (6.5×300 nm), 검출기는 RI detector를 사용하였고, 이동상은 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 0.05%)로 용매 이동속도 0.55 mL/min, 시료 주입량 5 μ L, 컬럼 온도 90의 조건으로 측정하였다.

미나리발효액 및 식초의 유리 아미노산 측정

일정량의 시료를 취하여 완전히 건조시킨 후 phenylisothiocyanate (PITC)로 유도체를 만들고 용매 A (140 mM NaHAc, 0.1% triethanolamine (TEA), 6% CH₃CN, pH 6.1)에 용해, 원심분리한 후 시료로 사용하였다. 이때 사용한 컬럼은 Waters Nova-Pak C18 4 μ m (3.9×300mm), 검출기는 UV detector (HP Agilent 1100 HPLC, GMI, MN, USA)를 사용하여 254 nm에서 측정하였고, 이동상은 용매 A와 용매 B (60% CH₃CN)를 gradient법으로 용매 이동속도 1.0 mL/min, 시료 주입량 10 μ L, 컬럼 온도 46°C의 조건으로 측정하였다.

미나리발효액 및 식초의 총 아미노산 측정

일정량의 시료를 취하여 완전히 건조시킨 후 110°C에서 24시간 HCl hydrolysis한다. Phenylisothiocyanate (PITC)로 유도체를 만들고 시료를 완전히 건조한 후 200 μ L의 용매 A (140 mM

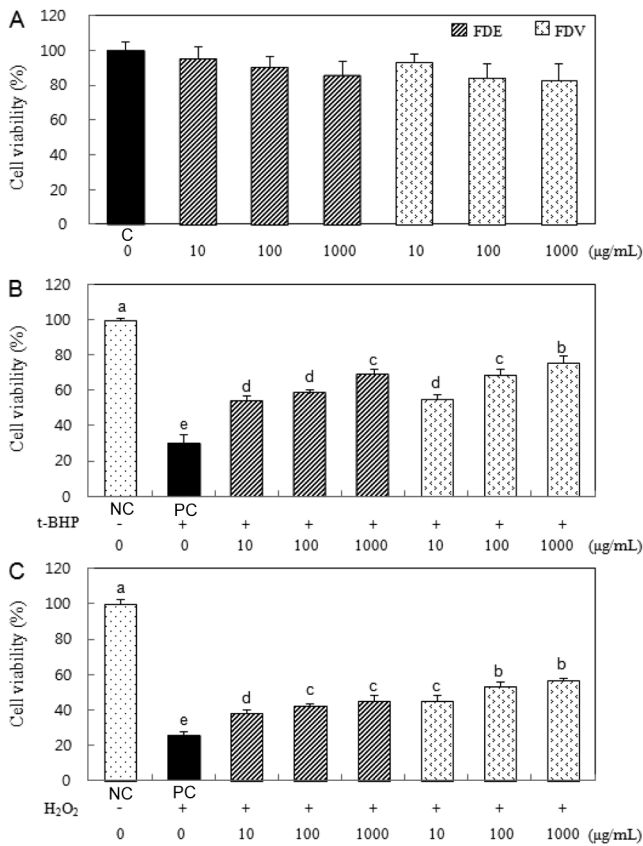


Fig. 1. Protective effects of FDE and FDV on cell viability (A) against t-BHP- (B) and H₂O₂- (C) induced oxidative damage in C6 glial cells. Cell viability was measured by MTT assay. Cells were incubated for 15 h before the addition of t-BHP or H₂O₂. Oxidative damage was induced with 1 mM t-BHP for 2 h or 2 mM H₂O₂ for 30 min. The data are given as means with bars representing SEM, n=3. Values with different superscripts are significantly different (p<0.05).

NaHAc, 0.1% TEA, 6% CH₃CN, pH 6.1)에 용해, 원심분리한 후 시료로 사용하였다. 분석조건은 상기의 유리 아미노산 분석조건과 같다.

세포주 배양

본 실험에 사용한 C6 흰쥐 신경아교세포(astrogloma cells)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 10% FBS, 1% penicillin 및 streptomycin이 포함된 dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco-BRL, Rockville, MD, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

세포 생존율 측정

C6 세포에 대한 시료 자체의 독성 및 t-BHP와 H₂O₂에 의해 유도된 세포독성을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. C6 세포를 96 well plate에 5×10⁴/well로 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 시료를 다양한 농도로 C6 cell에 2-16시간 동안 전처리하였고, 그 후 t-BHP는 1mM의 농도로 증류수에 녹여 첨가한 후 2시간, H₂O₂는 2mM의 농도로 첨가하여 30분간 배양하였다. 이 상태의 C6 cell에 MTT stock solution (10 µL/well)을 처리하여 37°C에서 4시간 배양한 후, dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 µL를 활용하여 반응을 종결시켰

Table 1. Changes in the contents of organic acids of fermented dropwort extracts and fermented dropwort vinegar
(Unit: µg/mL)

Organic acids	FDE	FDV
Acetic acid	5718.95±189.47 ¹⁾	47727.15±905.05
Citric acid	526.57±93.73	ND ²⁾
Lactic acid	14459.48±2151.42	ND
Malic acid	2015.69±285.90	796.29±166.71
Oxalic acid	1745.37±434.19	74.60±11.65
Succinic acid	ND	ND
Total	24467.06±1820.79	48598.18±624.93

*FDE: fermented dropwort extract, FDV: fermented dropwort vinegar, ¹⁾Data represent mean±SD of three independent experiment. ²⁾ND: Not detected

다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 µL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

통계처리

실험결과 Fig. 1의 통계분석은 SAS program을 이용한 일원분산분석법을 실시하여 Duncan's multiple range test에 의해 시료간의 유의적 차이(p<0.05)를 검정하였다.

결과 및 고찰

미나리발효액 및 식초의 유기산 함량

미나리 천연 식초를 제조하여 조미용 또는 음료 베이스로 활용하기 위하여 3년 숙성된 미나리 발효액을 효모와 초산균을 이용하여 식초를 제조하였다. 제조한 식초의 기본적인 품질 특성을 검토하기 위하여 유기산 함량을 3회 측정된 결과, 미나리발효액 및 식초의 산도는 2.45%, 4.86%로 나타났으며, 주요 유기산은 미나리발효액은 lactic acid가 1.45%로 가장 높았으며 acetic acid (0.57%), malic acid (0.2%), oxalic acid (0.18%), citric acid (0.05%)의 순으로 나타났다. 또한 미나리 식초는 acetic acid 4.8%로 총 유기산의 대부분을 차지하였으며, 그 외에 소량의 malic acid (0.08%)와 oxalic acid (0.01%)를 함유하고 있는 것을 알 수 있다 (Table 1). 이 결과로 미나리 발효액을 이용하여 초산 발효가 잘 진행되어 고품질의 식초가 제조된 것을 알 수 있다.

식초의 주요 유기산인 acetic acid를 제외하고 매실 식초(38)에서는 succinic acid가, 감식초(39)에서는 galacturonic acid가, 포도 식초(40)에서는 tartaric acid가 높게 나타나 과일의 종류에 따라 식초의 유기산의 구성 및 함량에 차이가 있음을 확인할 수 있다.

Joo 등(41)은 acetic acid를 비롯한 유기산들이 식초의 산미와 지미를 형성하며, TCA 회로를 활성화하여 젖산분해를 촉진하는 가능성이 있다고 보고한 바 있고, Seo 등(18)은 초산균의 종류에 따라 malic acid 및 succinic acid의 함량에 차이를 나타낸다고 하였다. 따라서 여러 과일 식초의 유기산 구성 및 함량의 차이는 각각의 미각적 특성이나 생리활성에 영향을 미치며, 유기산 함량 변화의 차이는 초산균의 종류 및 발효방법, 원료의 종류에 기인한 것으로 알려져 있다.

미나리발효액 및 식초의 유리당 함량

미나리 식초의 유리당 함량을 3회 측정하여 Table 2에 나타내

Table 2. Changes in the contents of free sugars of fermented dropwort extracts and fermented dropwort vinegar
(Unit: g/100g)

Free sugars	FDE	FDV
Fructose	20.40±2.55 ¹⁾	0.20±0.04
Sucrose	ND ²⁾	0.31±0.04
Glucose	20.20±3.28	ND
Maltose	ND	0.34±0.04
Total	40.60±2.91	0.85±0.11

*FDE: fermented dropwort extract, FDV: fermented dropwort vinegar, ¹⁾Data represent mean±SD of three independent experiment. ²⁾ND: Not detected

Table 3. Changes in the contents of free amino acids of fermented dropwort extracts and fermented dropwort vinegar
(Unit: µg/mL)

Free amino acids	FDE	FDV
Cysteine	0	0
Aspartic acid	162.96	4.01
Glutamic acid	36.78	0.42
Asparagine	0	0.08
Serine	31.11	0.09
Glutamine	11.61	0.08
Glycine	24.47	0.23
Histidine	15.37	0.32
Arginine	36.79	1.77
Threonine	31.85	0.40
Alanine	68.92	0.25
γ-Amino-n-butyric Acid	57.92	0.18
Proline	28.99	0.24
Tyrosine	42.48	0.60
Valine	50.41	0.94
Methionine	8.98	1.11
Isoleucine	36.33	0.30
Leucine	51.16	0.24
Phenylalanine	34.52	0.37
Tryptophan	13.03	0
Lysine	24.96	0
Total	768.63	11.63

*FDE: fermented dropwort extract, FDV: fermented dropwort vinegar

었다. 미나리 발효액에는 fructose (20.4%)와 glucose (20.2%)의 함량이 높았으며 sucrose는 검출되지 않았다. 이를 이용한 발효초의 경우 유리당의 함량은 감소하여 fructose 0.20%, sucrose 0.31%, maltose 0.34%로 나타났으며 glucose는 검출되지 않았다. 이는 식초의 원료 중 당분은 발효과정 중 초산균의 대사 작용으로 대부분 산으로 변화되고 일부는 에너지원으로 이용되어 초산발효 후 당 함량은 미량으로 나타난다는 보고(42)와 유사한 결과이다.

미나리발효액 및 식초의 유리 아미노산 함량

미나리 발효액과 식초의 유리 아미노산 조성을 1회 분석한 결과(Table 3), 유리 아미노산 함유량은 발효액 768.63 µg/mL, 식초 11.63 µg/mL로 식초에서 크게 감소하였으며, 그 중 가장 많이 함유된 아미노산은 미나리 발효액(162.96 µg/mL)과 식초(4.01 µg/mL)에서 모두 aspartic acid로 나타났다. 그 외에 발효액에서는

Table 4. Changes in the contents of total amino acids of fermented dropwort extracts and fermented dropwort vinegar
(Unit: µg/mL)

Total amino acids	FDE	FDV
Aspartic acid + asparagine	20.20	17.05
Glutamic acid + glutamine	12.84	38.27
Serine	7.23	9.41
Glycine	15.91	13.75
Histidine	3.91	3.75
Arginine	2.21	3.70
Threonine	6.57	8.83
Alanine	14.35	25.70
γ-Amino-n-butyric Acid	10.54	7.80
Proline	15.50	19.63
Tyrosine	0.0	1.90
Valine	9.94	12.36
Methionine	3.02	2.84
Isoleucine	5.47	7.72
Leucine	7.20	10.57
Phenylalanine	5.85	4.80
Lysine	3.84	4.77
Total	144.58	192.85

*FDE: fermented dropwort extract, FDV: fermented dropwort vinegar

alanine (68.92 µg/mL)과 GABA (57.92 µg/mL)가 주요 유리 아미노산으로 나타났다. 미나리 발효액과 식초에서 주요 아미노산으로 나타난 aspartic acid는 숙취해소와 피로회복 효과를 나타내는 것으로 잘 알려져 있으며, 전보의 미나리 발효액의 간암 세포 성장 억제 효과와도 일치하는 결과이다(37).

식초의 관능적인 맛과 품질에 영향을 주는 아미노산은 발효에 사용된 원료에서 분해되어 생성되기도 하며, 일부 아미노산은 미생물의 발효에 의하여 생합성, 또는 원료자체의 아미노산 성분이 최종 제품에 반영될 수도 있다(43). Kim 등(44)의 연구에서 야콘 분말의 아미노산 함량 분석결과 glutamic acid, aspartic acid 등의 아미노산이 비교적 많이 함유되어 있다고 보고하여 본 연구 결과와 유사함을 알 수 있다. 일반적으로 사과 식초는 tyrosine, aspartic acid, cystine 등(45)이, 현미 식초는 glutamic acid, alanine, valine 등(41)이, 감식초는 ornithine, γ-aminoisobutyric acid 등(46)이 주요 아미노산으로 나타나 식초마다 유리아미노산의 함량 및 구성성분에 차이가 있다. 이는 초산균의 종류, 원료, 발효 방법, 도정, 알코올 발효 조건, 재료 배합비의 차이 등(47,48)에 기인하는 것으로 알려져 있다.

미나리발효액 및 식초의 총 아미노산 함량

총 아미노산 함량(1회 분석)은 Table 4에 나타낸 것과 같이, 발효액 144.58 µg/mL, 식초 192.85 µg/mL로 나타났으며, 주요 아미노산은 발효액의 경우, aspartic acid와 asparagine (20.20 µg/mL), glycine (15.91 µg/mL), proline (15.50 µg/mL), alanine (14.35 µg/mL)의 순이며, 식초의 경우 glutamic acid와 glutamine (38.27 µg/mL), alanine (25.70 µg/mL), proline (19.63 µg/mL), aspartic acid와 asparagine (17.05 µg/mL)의 순으로 나타났다.

미나리발효액 및 식초의 C6 세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과

미나리 발효액 및 분말화한 미나리 식초의 뇌 신경세포의 산

화적 손상에 대한 보호 효과를 알아보기 위하여, 먼저 C6 세포 생존율에 미치는 시료의 영향, t-BHP 및 H₂O₂ 처리에 의한 손상 유발 효과와 시료 전처리의 세포 생존율에 대한 영향을 알아보았다. 발효액과 분말 식초의 농도가 증가함에 따라 세포 생존이 감소하는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다(Fig. 1A). t-BHP 처리 시 C6 세포 생존율이 약 30%로 감소하였으며, 발효액으로 세포를 15시간 정도 손상 유발 전에 처리한 결과 발효액 10, 100, 1,000 µg/mL에서 각각 53.5±3.9, 58.7±2.2, 68.5±3.5%와 식초 10, 100, 1,000 µg/mL에서 각각 55.3±2.4, 69.0±3.2, 76.5±4.0%로 세포 생존율이 시료 처리 시 농도 증가에 따라 유의적으로 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 1B). 또한, H₂O₂에 의해 C6 세포 생존율은 25.3±2.4%로 감소하였으며, 산화적 손상에 대한 보호 효과는 발효액 10, 100, 1,000 µg/mL에서 각각 38.1±2.1, 42.6±1.1, 45.1±3.0%와 식초 10, 100, 1,000 µg/mL에서 각각 44.9±3.3, 53.1±2.6, 56.8±1.3%로 시료 처리에 의해 유의적인 세포 손상 억제 효과를 갖는 것을 확인하였다(Fig. 1C).

본 연구에서 산화적 스트레스 유발 물질로 사용된 H₂O₂는 쉽게 원형질막을 통과하기 때문에 *in vitro* 또는 *in vivo* 실험의 다양한 생리학적 또는 병리학적 조건에 산화적 손상을 주는 독성 물질로 많이 이용되고 있다(49). Ma 등(50)은 미나리의 n-BuOH 분획에서 4가지 플라보노이드 성분(isorhamnetin, afzelin, hyperoside, persicarin) 중 persicarin이 glutamate에 의해 유도된 glutathione 환원효소와 glutathione peroxidase의 감소를 저해하여 glutamate에 의해 손상된 쥐의 대뇌 피질 세포의 신경 보호 작용에 효과를 나타낸다고 보고하였다. 미나리 식초의 뇌 세포 보호 관련 활성에 대한 연구 보고는 전무하여 식초의 효능을 과학적으로 증명하는 연구와 활성 성분 분석이 필요한 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 효모를 이용하여 제조한 미나리 천연 식초 및 원료로 사용된 미나리 발효액의 유리당, 유기산, 아미노산 함량을 측정하였으며, 미나리 식초의 뇌 기능 개선 관련 기능성을 확인하기 위하여 C6 흰쥐 신경아교세포를 이용하여 산화적 손상에 대한 보호 효과를 검토하였다. 미나리 식초는 약 5%의 초산을 함유하였으며 glucose는 검출되지 않아 초산발효가 잘 이루어진 것을 알 수 있다. 또한 유리 아미노산의 함량은 높지 않았으나 그 중 aspartic acid, arginine 그리고 valine이 주요 유리 아미노산으로 나타났으며, 발효액에서는 aspartic acid, alanine, GABA의 순으로 나타났다. 총 아미노산은 식초에서는 glutamic acid와 glutamine의 함량이 가장 높았으며, 발효액의 경우 aspartic acid와 asparagine이 주요 총 아미노산으로 나타났다. 미나리 식초의 효능을 평가하기 위하여 식초를 동결 건조하여 분말화한 식초의 산화적 손상에 대한 뇌 신경세포 보호 효과를 측정된 결과, 발효액과 식초 모두 C6 세포에 대한 독성은 없었으며 t-BHP 및 H₂O₂에 의한 세포 생존율 저하를 유의적으로 억제하는 효과를 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지역혁신센터사업(계명대학교 전통 미생물자원개발 및 산업화연구센터와 경희대학교 피부생명공학센터)의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

References

- Halliwell BH, Gutteridge JMC. Role of free radical and catalytic metalions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85 (1990)
- Gutteridge JMC, Halliwell B. *Antioxidants in Nutrition, Health and Disease*, Oxford University Press, UK. pp. 1-62 (1994)
- Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 199-212 (1998)
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165: 215-219 (1987)
- Moon JH, Park KH. Functional components and physiological activity of tea. *J. Korean Tea Soc.* 1: 175-191 (1995)
- Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci. Tech.* 6: 75-82 (1995)
- Elena V, Davide T, Angela C. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chem.* 105: 564-571 (2007)
- Masino F, Chinnicib F, Bendinic A, Montevicchia G, Antinellia A. A study on relationships among chemical, physical, and qualitative assessment in traditional balsamic vinegar. *Food Chem.* 106: 90-95 (2008)
- Hong SM, Kang MJ, Lee JH, Jeing JH, Kwon SH, Seo KI. Production of vinegar using *Rubus coreanus* and its antioxidant activities. *Korean J. Food Preserv.* 19: 594-603 (2012)
- Lee SW, Yoon SR, Kim GR, Kyung HK, Jeong YJ, Yeo SH, Kwon JH. Effect of nuruks and crude amylolytic enzyme on free amino acid and volatile components of brown rice vinegar prepared by static culture. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 570-576 (2011)
- Jeong Y, Lee MH. A view and prospect of vinegar. *Food Indus. Nutr.* 5: 7-12 (2000)
- Kim DH. Studies on the production of vinegar from fig. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 53-60 (1999)
- Jeong YJ, Seo JH, Jung SH, Shin SR, Kim KS. The quality comparison of uncleaned rice vinegar by two stages fermentation with commercial uncleaned rice vinegar. *Korean J. Food Preserv.* 5: 374-379 (1998)
- Kwon SH, Jeong EJ, Lee GD, Jeong YJ. Preparation method of fruit vinegars by two stage fermentation and beverages including vinegar. *Food Indus. Nutr.* 5: 18-24 (2000)
- Ha YD, Kim KS. Civilization history of vinegar. *Food Indus. Nutr.* 5: 1-6. (2000)
- Jeong YJ, Lee MH. A view and prospect of vinegar industry. *Korean J. Food Sci. Technol.* 5: 7-12 (2000)
- Shim GS. The metabolism and health of vinegar, *Korean J. Food Sci. Technol.* 17: 5-9 (1984)
- Yoon NH. Chemical characterization of commercial vinegars. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 1440-1446 (1999)
- Lim CW. Beverage industry market. *Marketing Issues & Trend.* 43: 19-23 (2005)
- Jeong YJ. Current trends and future prospects in the Korean vinegar industry. *Food Sci. Indus.* 42: 52-59 (2009)
- Kim KJ, Bae YS, Lee IK, Yoon YK, Yoo JS, Park HK, Ha WH. Effects of sport-drink with vinegar on the activation of lipid metabolism during exercise in obese men. *J. Korean Soc. Aero. Exerc.* 1: 48-58 (1997)
- Furukawa S, Ueda R. Studies on non-volatile organic acids in vinegars, Contents of non-volatile organic acid in commercial vinegars. *J. Ferment. Technol.* 41: 14-19 (1963)
- Masai H. Taste of the fermented beverage and food, Taste of vinegars. *J. Brew. Soc. Jpn.* 75: 888-891 (1980)
- Jones DD, Greenshields RN. Volatile constituents of vinegar. A survey of some commercially available malt vinegars. *J. I. Brewing* 75: 457-463 (1969)

25. Kahn JH, Nickol GB, Conner HA. Vinegar compounds: Analysis of vinegar by gas-liquid chromatography. *J. Agr. Food Chem.* 14: 460-465 (1966)
26. Lee YC, Lee GY, Kim H, Park KB, Yoo YJ, Ahn PU, Choi CU, Son SH. Production of high acetic acid vinegar using two stage fermentation. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 663-667 (1992)
27. Lee YC, Park MS, Kim HC, Park KB, Yoo YJ, Ahn IK, Son SH. Production of high acetic acid vinegar by single stage fed-batch culture. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 511-512 (1993)
28. Saeki A. Continuous vinegar production using twin bioreactors made from ethanol and acetic acid fermentor. *J. Food Sci. Technol.* 38: 891-896 (1991)
29. Park JP, Kim SJ, Ryu JC, Pyo BS, Kim SW. Some properties of *Acetobacter* sp. isolated from traditional fermented vinegar. *Korean. J. Biotechnol. Bioeng.* 8: 397-404 (1993)
30. 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)
31. Song GS, Kwon YJ. Analysis of the volatile constituents of *Oenanthe stolonifera* DC. *J. Korean. Soc. Food. Nutr.* 19: 311-314 (1990)
32. Kim JK. Illustrated natural drugs encyclopedia. Namsangdang. Seoul, Korea. p. 244 (1984)
33. 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*. *Kor. J. Pharmacogn.* 39: 142-145 (2008)
34. 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)
35. 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)
36. 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)
37. Kim MJ, Yang SA, Park JH, Kim HI, Lee SP. Quality characteristics and anti-proliferative effects of dropwort extracts fermented with fructooligosaccharides on HepG2 cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 432-437 (2011)
38. Ko YJ, Jeong DY, Lee JO, Park MH, Kim EJ, Kim JW, Kim YS, Ryu CH. The establishment of optimum fermentation conditions for *Prunus mume* vinegar and its quality evaluation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 361-365 (2007)
39. Jeong YJ, Seo KI, Kim KS. Physicochemical properties of marketing and intensive persimmon vinegars. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 6: 355-363 (1996)
40. Jeong YJ, Lee MH, Seo KI, Kim JN, Lee YS. The quality comparison of grape vinegar by two stages fermentation with traditional grape vinegar. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 8: 462-468 (1998)
41. Joo KH, Cho MH, Park KJ, Jeong SW, Lim JH. Effects of fermentation method and brown rice content on quality characteristics of brown rice vinegar. *Korea J. Food Treserv.* 16: 33-39 (2009)
42. Moon SY, Chung HC, Yoon HN. Comparative analysis of commercial vinegars in physicochemical properties, minor components and organoleptic tastes. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 663-670 (1997)
43. Cho Y, Rhee HS. A study on flavorful taste components in kimchi on free amino acids. *Korean J. Food Sci. Technol.* 11: 26-31 (1979)
44. Kim AR, Lee JJ, Jung HO, Lee MY. Physicochemical composition and antioxidative effects of yacon (*Polymnia sonchifolia*). *J. Life Sci.* 20: 40-48 (2010)
45. Jeong YJ, Seo JH, Lee GD, Park NY, Choi TH. The quality comparison of apple vinegar by two stages fermentation with commercial apple vinegar. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 353-358 (1999)
46. Lee SW, Kwon JH, Yoon SR, Woo SM, Jang SY, Yeo SH, Choi JH, Jeong YJ. Quality characteristic of brown rice vinegar by different yeasts and fermentation condition. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 1366-1372 (2010)
47. Hong SM, Moon HS, Lee JH, Lee HI, Jeong JH, Lee MK, Seo KI. Development of functional vinegar by using cucumbers. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 927-935 (2012)
48. 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.* 32: 381-387 (2003)
49. Nakamura U, Iwase M, Uchizono Y, Sonoki K, Sasaki N, Imoto H, Goto D, Iida M. Rapid intracellular acidification and cell death by H₂O₂ and alloxan in pancreatic beta cells. *Free Radical Bio. Med.* 40: 2047-2055 (2006)
50. Ma CJ, Lee KY, Jeong EJ, Kim SH, Park J, Choi YH, Kim YC, Sung SH. Persicarin from water dropwort (*Oenanthe javanica*) protects primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity. *Phytother. Res.* 24: 913-918 (2010)