

## 양파(*Allium cepa* L.) 음료의 콜린성 활성 증가 및 뇌신경세포 보호로 인한 Amyloid $\beta$ Peptide 유도에 대한 인지장애 개선 효과

박선경<sup>1</sup> · 김종민<sup>1</sup> · 강진용<sup>1</sup> · 하정수<sup>1</sup> · 이두상<sup>1</sup> · 김아나<sup>1</sup> · 최성길<sup>1</sup> · 이 옥<sup>2</sup> · 허호진<sup>1</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 응용생명과학부(BK21 Plus), 농업생명과학연구원

<sup>2</sup>국립산림과학원 특용자원연구과

### Onion Beverages Improve Amyloid $\beta$ Peptide-Induced Cognitive Defects via Up-Regulation of Cholinergic Activity and Neuroprotection

Seon Kyeong Park<sup>1</sup>, Jong Min Kim<sup>1</sup>, Jin Yong Kang<sup>1</sup>, Jeong Su Ha<sup>1</sup>, Du Sang Lee<sup>1</sup>, Ah-Na Kim<sup>1</sup>, Sung-Gil Choi<sup>1</sup>, Uk Lee<sup>2</sup>, and Ho Jin Heo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University

<sup>2</sup>Division of Special Purpose Trees, National Institute of Forest Science

**ABSTRACT** To examine the cognitive function of onion (*Allium cepa* L.) beverages (odourless and fortified), we analyzed *in vitro* neuronal cell protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity and performed *in vivo* tests on amyloid beta (A $\beta$ )-induced cognitive dysfunction. Cellular oxidative stress and cell viability were evaluated by DCF-DA assay and MTT assay. These results show that fortified beverage resulted in better neuronal cell protection than odourless beverage at lower concentration (0~100  $\mu$ g/mL). Fortified beverage also showed more excellent acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity (IC<sub>50</sub>: 4.20 mg/mL) than odourless beverage. The cognitive functions of odourless beverage and fortified beverage in A $\beta$ -induced neurotoxicity were assessed by Y-maze, passive avoidance, and Morris water maze tests. The results show improved cognitive function in both groups treated with beverages. After *in vivo* tests, cholinergic activities were determined based on AChE inhibition and acetylcholine levels, and antioxidant activities were measured as SOD, oxidized glutathione (GSH)/total GSH ratio, and MDA levels in mouse brain tissue. In a Q-TOF UPLC/MS system, main compounds were analyzed as follows: odourless beverage (five types of sugars and three types of phenolics) and fortified beverages (six types of phenolics and two types of steroidal saponins).

**Key words:** onion beverage, amyloid beta peptide, cognitive dysfunction, neuronal cell protection

## 서 론

Alzheimer's disease(AD)와 같은 퇴행성 뇌 신경질환은 amyloid beta(A $\beta$ )의 과도한 축적으로 인한 plaque의 생성이 주된 원인으로 알려져 있다(1). A $\beta$ 는 40~42개의 아미노산으로 이루어진 단백질로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 포함하는 활성산소종의 세포 내 증가로 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있다. 특히 뇌의 경우 구조 특성상 불포화 지방산과 구성 지방산의 함량이 높은 기관으로, 산화적 스트레스에 매우 취약한 구조로 되어 있다. 이러한 산화적 스트레스는 DNA, 지질과산화 및 단백질의 산화를 유도하여 신경세포의 기능 장애 및 사멸을 유발하여 인지기능 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다(2,3). 또한, acetylcholine(ACh)은 대표적인

신경전달물질로 신경세포의 말단에서 시냅스 틈으로 분비되어 수용체에 결합함으로써 신호를 전달하게 된다. 신호 전달 후, acetylcholinesterase(AChE)에 의해 acetate와 choline으로 분해되어 신경전달이 멈추게 된다. 이러한 과정을 cholinergic system이라 하며, AD 환자의 경우 일반적으로 ACh의 함량은 적게 존재하는 반면 AChE의 작용은 지속적으로 촉진되어 신경전달에 이상이 생기게 되며, 이는 최종적으로 인지 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다(4).

이러한 인지기능 장애를 개선하기 위해 많은 소재들이 개발되고 있으며, 소비자의 소비 경향이 변함에 따라 최근의 연구들은 기존에 알려진 합성항산화제가 아닌 안전성이 확보된 식품 소재에서의 다양한 생리활성물질들에 의한 연구들이 이루어지고 있다(5). 특히 건강기능식품의 선택에 있어 소비자들은 간편성, 기호성 및 기능성을 바탕으로 생리활성을 가지는 영양성분을 중요한 선택요소로 활용하고 있어, 주원료가 되는 재료는 페놀성 화합물이나 플라보노이드계 화합물, 식이섬유, 항산화성 비타민(C, E)류 등이 풍부한 과채류 소재들이 주로 이용되고 있다(6,7).

Received 11 July 2016; Accepted 2 September 2016

Corresponding author: Ho Jin Heo, Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea  
E-mail: hjher@gnu.ac.kr, Phone: +82-55-772-1907

양파(*Allium cepa* L.)는 백합목(*Liliales*) 부추과(*Alliaceae*) 부추속(*Allium*)에 속하는 다년생 식물로 식생활에서 널리 사용되는 조미재료 중 하나이다(8). 양파의 경우 항산화 효과, 심혈관계 질환 예방, 항비만 및 항당뇨에 대한 효과가 있는 것으로 알려져 있다(9). 그뿐만 아니라 이전의 연구에서는 양파 분획물의 라디칼 소거능, 지질과산화 억제 활성과 같은 *in vitro* 항산화 효과와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호 효과를 확인할 수 있었다(10). 또한, trimethyltin으로 유도한 인지 장애 마우스 모델에서 양파 과피와 과육 분획물에서 뛰어난 인지기능 개선 효과를 확인하였으며, 이러한 효과를 나타내는 주요물질은 페놀성 화합물인 quercetin, quercetin 배당체 및 isorhamnetin과 같은 물질들로 나타났다(11). *Allium* 종의 향기 성분 중 일부 함황 물질들은 항산화, 항암, 항혈전 및 항생작용 등의 생리활성 효능을 가지는 것으로 알려져 있다(12). 이들 함황 화합물의 생성 경로는 무취의 비휘발성 cysteine 유도체인 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides가 세포액 내 존재하는 alliinase에 의하여 가수분해되면서 pyruvate, ammonia 및 휘발성 함황 화합물이 생성된다(12,13). 이 중 allyl기를 가진 함황 화합물은 암을 예방하는 데 매우 효과적인 것으로 알려져 있음에도 불구하고, dimethyl disulfide, ammonia, thiosulfinate 등의 물질들이 나타내는 불쾌취로 인한 소비자의 기호도가 떨어지는 것으로 보고되고 있다(13). 이러한 불쾌취를 제거하거나 양파 유래 생리활성물질을 강화하면서 더불어 기호도를 증진할 수 있다면 양파 가공품을 통해 생리활성 효과 등을 기대할 수 있을 것이다. 결국 양파 가공품으로서의 불쾌취 제거 음료(무취음료)와 양파에 포함되어 있는 flavonol과 같은 생리활성물질을 추출하여 항산화능 등을 강화시킨 음료 개발에 대한 산업화 연구로서, 본 연구는 수행되었다. 따라서 본 연구에서는 불쾌취를 없앤 양파 무취음료와 생리활성 강화음료가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 산화적 스트레스에서의 뇌신경세포 보호 효과 및 Aβ로 유도된 인지 장애에 대한 개선 효과를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용된 시료는 경상남도 창원군에서 2015년 6월에 수확된 양파를 구입하여 사용하였으며, 이를 과육과 과피로 분리하여 동결건조기(IIShin Lab Co., Ltd., Yangju, Korea)를 이용하여 건조한 후 분쇄하여 냉동보관(-20°C)하면서 사용하였다. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay kit은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 제품을 구입하였다. 인체 뇌 조직 유래 MC-IXC 신경세포(American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, VA, USA) 배양을 위해 필요한 MEM 배지와 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco

BRL Co.(Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였으며, penicillin, streptomycin 및 나머지 시약은 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 실험에 사용하였다.

### 양파 무취음료 및 강화음료의 제조방법

양파 무취음료는 원물을 과육과 과피로 분리하여 염수로 1차 세척 후, 정제수로 2차 세척을 해준다. 세척된 양파를 4~8등분으로 슬라이스 한 후 과열 증기 처리(내분 온도 130°C, 스팀온도 350°C, 스팀량 7.8, 처리시간 1분) 하여 4°C 냉수로 냉각하여 준다. 냉각 처리 후 air spray를 이용하여 표면의 물기를 처리하여 갈아준다. 이렇게 만들어진 무취 양파퓨레에 정제수 3:6.5의 비율로 첨가하고, 80°C에서 1차 열처리하여 부재료(정제수 : 무취퓨레 : 구연산 : 소금 : 꿀 : 천연결정과당 = 65:30:0.05:0.2:1:3.75)를 첨가한 후 혼합하여 2차 열처리를 통하여 살균하였다.

강화음료는 무취음료의 생리활성 효능 보안을 위하여 양파 껍질을 발효주정 : 식초(9:1)로 5시간 추출 후 여과하여 전체 부피의 5%(v/v)의 함량이 되도록 첨가하였다. 제조된 음료들은 각각 여과하여 동결 건조했으며, -20°C에 보관하면서 실험에 이용하였다.

### 신경세포 배양 및 신경세포 보호 효과

본 실험에서 사용한 MC-IXC 세포는 뇌신경세포의 특성을 가지는 세포로 인체 뇌 조직에서 유래된 것을 이용하여 실험을 하였다. MC-IXC 세포를 10% FBS, 50 units/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin을 포함하는 MEM 배지에 접종하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

세포 내에서 생성되는 산화적 스트레스의 양을 측정하는 방법으로 DCF-DA를 이용하여 실험을 진행하였다. 세포 내에 생성된 산화적 스트레스는 DCF-DA를 산화시켜 형광을 내는 DCF로 전환하는데, 이처럼 생성된 형광 물질의 양을 측정함으로써 세포 내에서 생성된 산화적 스트레스를 측정할 수 있는 방법이다(14). 실험 방법은 세포 8×10<sup>3</sup> cell/mL에 시료 40 µL를 48시간 동안 pre-incubation 한 뒤, 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 3시간 동안 처리하였으며, 10 µM DCF-DA를 넣어 50분 동안 추가 배양하였다. 50분 후 모든 용액을 제거한 뒤 PBS 100 µL를 넣고 fluorescence microplate reader(Infinite 200, Tecan Co., San Jose, CA, USA)를 사용하여 485 nm(excitation wave)와 535 nm(emission wave)에서 형광 정도를 측정하였다(11). Positive control은 비타민 C(200 µM)를 사용하였고, 세포 내 산화적 스트레스 함량은 control에 대한 백분율 단위로 변환시켜 나타났다(14).

MC-IXC 세포에 대한 신경세포의 생존율은 MTT를 이용하였다. MTT reduction assay는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 황색의 수용성 기질을 청자색을 띠는 불용성의 MTT formazan으로 환원시키는 mitochondria의 활성을 이용하여 실험을 진행하였다(15). 실험 방법은 96 well plate에 시료 30 µL를 48시간 동안 pre-incubation 한 후

200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 3시간 동안 처리하였다. 3시간 후 MTT 시약(5 mg/mL)을 처리하여 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 모든 용액을 제거하였고 DMSO 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 20 분 동안 formazan을 녹였다. Microplate reader(680, Bio-Rad, Tokyo, Japan)를 이용하여 570 nm(determination)와 690 nm(reference wave)에서 측정하였다. Positive control은 비타민 C(200  $\mu\text{M}$ )를 사용하였고, 세포 생존율은 control에 대한 백분율 단위로 변환하여 나타내었다(14).

### AChE 저해 활성

AChE 저해 활성 측정은 acetylthiocholine iodide를 기질로 사용하여, Ellmans 등(16)의 방법에 의하여 측정하였다. 효소는 PC12 세포배양액 1 mL에 buffer[1 M NaCl, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1% Triton X-100 및 10 mM Tris-HCl(pH 7.2)] 5 mL를 첨가하여 Glass-Col homogenizer(D-500, Wigger Hauser, Berlin, Germany)로 균질화한 후 균질액을 10,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 그 상정액을 효소실험을 위하여 사용하였고, 모든 추출공정은 4°C에서 수행하였다. 실험 방법은 96 well plate에 50 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0) 50  $\mu\text{L}$ , 상등액 10  $\mu\text{L}$ 에 시료 10  $\mu\text{L}$ 를 넣어 37°C에서 15분간 pre-incubation 시킨 후, 반응 혼합물에 Ellman's reaction mixture[0.5 mM acetylthiocholine, 1 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)] 70  $\mu\text{L}$ 를 첨가한 뒤 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 실험동물 사육

본 실험에 사용된 동물은 ICR 마우스(4주령, male)(Samtako, Osan, Korea)이며, 3마리씩 한 개의 사육케이지에서 항온( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), 항습( $50 \pm 5\%$ )이 유지되며, 12시간 간격으로 낮과 밤을 교대시키는 일정한 환경 내에서 사육하였다. 일주일간의 환경적응 기간을 거친 후 정상 대조군 그룹, A $\beta$  그룹, 양과 무취음료 및 강화음료 그룹으로 분류하여 군마다 9마리씩 4그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. 양과 무취음료 그룹과 강화음료 그룹은 3주간 각각 20 mg/kg of body weight의 농도로 100  $\mu\text{L}$ 씩 매일 경구 투여하였다. 3주간의식이 후 정상 대조군을 제외한 모든 그룹에 0.85% 식염수에 녹인 A $\beta$ (410 pmole)를 10  $\mu\text{L}$ 씩 마취 없이 bregma에 주사하여 인지 장애를 유도하였다. A $\beta$  주사 3일 후 공간 및 기억력 실험(Y-maze, passive avoidance 및 Morris water maze tests)을 진행하였다. 모든 실험은 경상대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: GNU-131105-M0067)하에 수행되었다.

### Y-maze test

Y-maze 실험은 공간인지능력을 실험하기 위하여 실시하였고, 실험에 사용되는 Y-maze는 검은색 플라스틱으로 이루어진 3개의 arm으로 구성되었으며, 각 arm의 길이, 높이, 너비는 33 cm, 15 cm, 10 cm이다. 각 arm을 각각 A와

B, C로 정한 후 지정된 arm에 마우스를 놓고 8분 동안 마우스가 들어간 이동 경로를 smart 3.0 video tracking system(Panlab, Barcelona, Spain)으로 기록하여 실험을 진행하였다. 3개의 서로 다른 arm으로 들어갔을 경우 1점(실제 변경, actual alternation)을 부여하고, 변경 행동력(alternation behavior)은 총 통과횟수(total arm entry)와 점수를 통해 다음 식을 이용하여 나타내었다(11).

$$\text{Alternation behavior (\%)} = \frac{\text{Actual alternation}}{\text{Maximum alternation}} \times 100$$

$$\text{Maximum alternation} = \text{total number of arm entry} - 2$$

### Passive avoidance test

Passive avoidance는 단기 학습 및 기억능력을 평가하기 위한 실험으로 실험에 사용된 장치는 2개의 구역(밝은 챔버 및 어두운 챔버)으로 나누어져 있으며, 바닥은 철망으로 이루어져 있다. 실험 방법은 학습시험으로 각 마우스를 밝은 챔버에서 조명을 켜지 않은 채 1분간 적응시킨 뒤 조명을 켜고 2분 동안 환경을 인지시킨 다음 마우스가 어두운 챔버로 들어가게 되면 전기충격(0.5 mA, 3초)을 가하였다. 학습 시험을 마친 24시간 후 각각의 마우스를 대상으로 기억 시험(test trial)을 시행하였고, 밝은 챔버에 마우스를 놓고 어두운 챔버로 마우스의 네 발이 모두 들어가는 데 걸리는 시간(latency time: 머무름 시간)을 300초까지 측정하였다(11).

### Morris water maze test

실험은 Morris(17) 방법을 변형하여 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 장치는 원형으로 된 수조(지름 150 cm, 높이 60 cm)에 깨끗한 물을 30 cm 높이로 채운 뒤( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ), 수조 사분면의 한 구역에 escape platform을 설치하고 식용 오징어 먹물(Cebesa, Valencia, Spain)을 녹였다. 실험이 시작된 첫 번째 날은 수조에서 마우스가 platform 없이 60 초간 자유롭게 두어 적응훈련을 시킨 후, 4일 동안은 platform을 수면 아래로 1 cm로 놓고 보이지 않도록 설정한 원형 수조에서 입수하는 위치(N, S, E, W zone)를 다르게 하고 하루 4번씩 반복하여 진행하였으며 smart 3.0 video tracking system을 이용하여 기록하였다(hidden trial). 마우스가 60초 안에 platform에 도달하는 경우에는 10초간 platform 위에 머물게 하였으며, platform을 찾지 못할 경우에는 손으로 위치를 안내해주어 platform에 위치하도록 하고 20초간 위치를 인지하도록 하였다. 실험 5일째(probe trial)에는 platform을 제거하고 working memory를 측정하기 위해 60초간 platform이 있었던 구역에 머무르는 시간을 기록하는 probe test를 진행하였다.

### 마우스 뇌 조직 중의 cholinergic system 활성 측정

마우스의 뇌를 적출하여 10 volume의 PBS buffer를 넣고 bullet blander(Next Advance Inc., Averill Park, NY,

USA)로 균질화한 후 30분 동안 원심분리 하였으며(12,000 rpm), 그 상등액을 효소실험에 사용하였다. 전 추출 과정은 4°C에서 진행하였으며, 추출한 효소액의 단백질 함량을 측정하기 위하여 Quant-iT™ Protein Assay kit(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 측정하였다.

AChE 활성은 상등액 5 µL와 50 mM sodium phosphate buffer 65 µL를 혼합하고 37°C에서 15분간 pre-incubation 한 뒤, 혼합물에 Ellman's reaction mixture 70 µL를 첨가하여 405 nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정하였다. 마우스 뇌 조직의 AChE 활성은 정상군을 100%로 하여 비교한 % 활성으로 나타내었다(11).

ACh 함량은 Vincent와 Newsom-Davis(18)의 방법을 변형하여 측정하였다. 효소에 alkaline hydroxylamine reagent[3.5 N sodium hydroxide and 2 M hydroxylamine in HCl]를 첨가하고 1분 동안 상온에서 반응시킨 후, 0.5 N HCl(pH 1.2)과 0.37 M FeCl<sub>3</sub> in 0.1 N HCl을 첨가하고 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

#### 마우스 뇌 조직 중의 항산화 활성 측정

Superoxide dismutase(SOD) 함량 측정은 적출한 마우스의 뇌를 10 volume의 PBS를 넣고 bullet blander(Next Advance Inc.)로 균질화한 후 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상등액을 버리고 pellet을 취한다. 1× Cell Extraction Buffer[10× SOD buffer 1 mL, 20% triton X-100 0.2 mL, 증류수 8.8 mL, 200 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF) 10 µL]를 혼합하여 30분 동안 5분 단위로 vortexing 해준 후 1,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 뒤 상등액을 실험에 이용하였다. 전 실험 과정은 4°C에서 진행하였으며 상등액의 단백질 함량을 측정하기 위하여 Quant-iT™ protein assay kit(Invitrogen Co.)을 이용하였다. SOD 함량을 측정하기 위해 SOD determination kit(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였고, 측정된 흡광도 값을 표준곡선에 대입하여 SOD 함량(U/mg protein)으로 표시하였다.

Oxidized glutathione(GSH)/total GSH 함량은 일정량의 마우스 뇌에 10 volume의 cold 5% metaphosphoric acid를 넣고 균질화한 후 15분간 원심분리(14,000×g) 하여 상등액을 얻어 실험에 사용하였으며, 2 M 4-vinylpyridine 10 µL를 더하여 oxidized GSH 측정에 사용하였다. 모든 공정은 4°C를 유지하였으며 추출한 상등액의 단백질 함량을 측정하기 위하여 Quant-iT™ protein assay kit(Invitrogen Co.)을 이용하였다. Glutathione의 함량을 측정하기 위하여 glutathione(GSSG/GSH) detection kit(Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY, USA)을 이용하여 측정하였으며, 측정된 total GSH와 oxidized GSH의 흡광도 값을 각 표준곡선에 대입하여 oxidized GSH/total GSH ratio로 나타내었다.

Malondialdehyde(MDA) 함량은 일정량의 마우스 뇌에

PBS 10 volume을 넣고 균질화한 후 원심분리(5,000 rpm, 10분, 4°C) 하여 상등액을 취해 실험에 사용한다. 추출한 마우스 뇌 조직 균질액 160 µL에 1% phosphoric acid 960 µL를 혼합한 후 0.67% thiobarbituric acid 320 µL를 넣고 95°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 해당 반응액은 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, MDA 함량은 mg protein 당 µmole의 농도로 표시하였다(11).

#### Q-TOF UPLC/MS system을 이용한 주요 화합물 분석

Q-TOF UPLC/MS(Waters Corp., Milford, MA USA)는 electrospray source로서 negative ion을 활용하여 MS 및 MS<sup>2</sup> data를 얻는다. ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> column (2.1×100 mm, 1.7 µm particle size)을 통해 compound들의 분리를 전개하였다. 이때 유속은 0.3 mL/min으로 진행하였으며 온도는 40°C를 유지하였다. Binary mobile phase (solvent A, 0.1% formic acid in distilled water; solvent B, 0.1% formic acid in acetonitrile)를 유지하고 이의 조성은 다음과 같다: 100% A/0% B at 0.5 min, 0% A/100% B at 5 min, 0% A/100% B at 6.5 min, 100% A/0% B at 6.8 min, and 100% A/0% B at 9 min. MS data 분석을 위해 다음 조건을 활용하여 분석하였다: drying gas(N<sub>2</sub>), temperature at 350°C, drying gas flow at 10 L/min, nebulizer pressure at 45 psi, fragmentor voltage at 175 V, and capillary voltage at 4,000 V. Mass range 100~1,200 m/z.

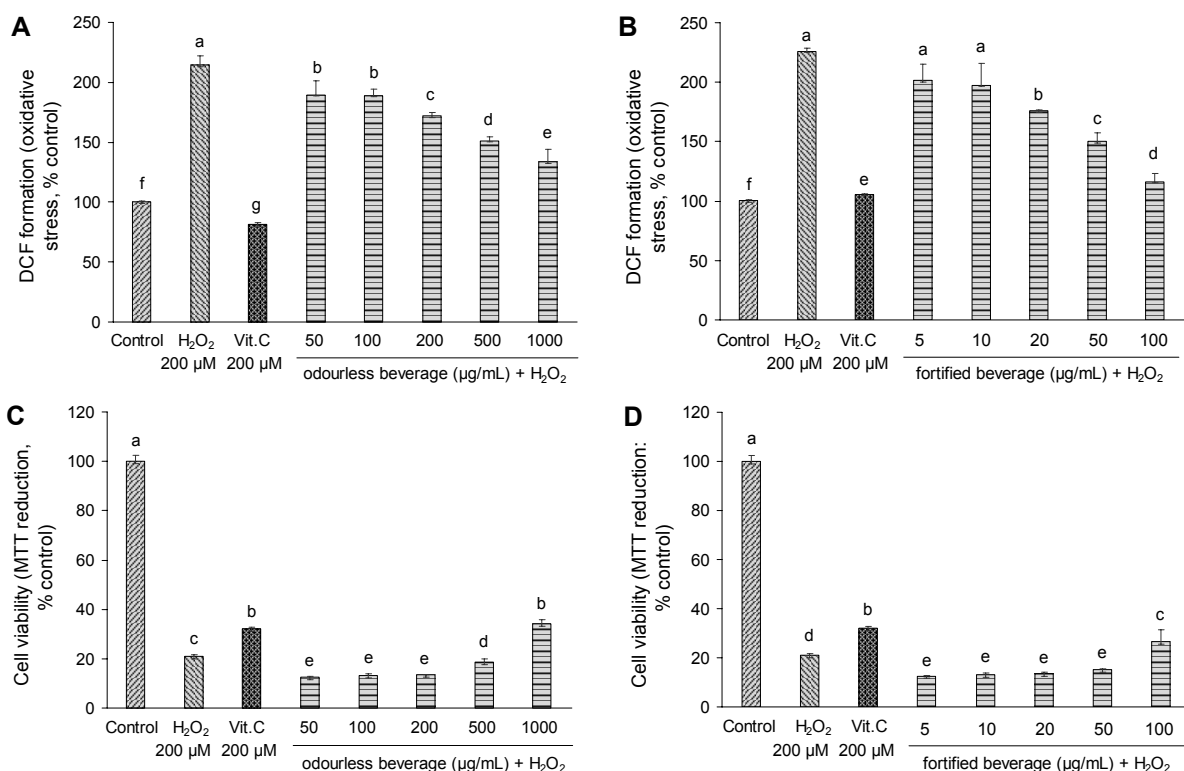
#### 통계처리

모든 실험은 각각 3회씩 반복하여 실시하였고 이를 mean±SD로 나타내었다. 각 평균에 대한 검증 방법은 SAS version 9.1 software(SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 하였고, Duncan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)으로 시료 간의 유의적인 차이를 5% 수준에서 검증하였다.

### 결과 및 고찰

#### 뇌신경세포에서의 산화적 스트레스 감소 및 세포 보호 효과

산화적 스트레스로 유도된 뇌신경세포의 사멸은 인지능의 장애를 유발할 수 있으며, 천연 항산화제인 flavonoids와 같은 phenolic 화합물에 의한 신경세포 보호 효과가 보고되고 있다(14). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 유도한 MC-IXC 세포에서 세포 내 산화적 스트레스 함량을 측정한 결과는 Fig. 1(A, B)과 같다. DCF formation은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 처리구(214%)에서는 control구(100%) 대비 약 110%의 세포 내 산화적 스트레스 함량 증가를 나타내었고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 비타민 C 처리구에서는 81%로 약 133% 정도의 산화적 스트레스 감소 효과를 보였다. 무취음료(oudeurless)와 강화음료(fortified) 모두 pos-



**Fig. 1.** Neuronal cell protective effect of onion odourless and fortified beverages on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in MC-IXC cell system. Intracellular oxidative stress of onion odourless beverage (A) and fortified beverage (B), and cell viability of onion odourless beverage (C) and fortified beverage (D) were examined. Results are presented as mean±SD (n=3). Data were statistically considered at  $P<0.05$ , and different small letters represent statistical differences.

itive control인 비타민 C에 비교하였을 때 비교적 낮은 감소 효과를 나타내었다. 강화음료는 뇌신경세포에 처리되는 농도가 증가할수록 무취음료 대비 상대적인 산화적 스트레스 저해 효과를 보여주었다.

양파 무취음료와 강화음료의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 oxidative stress에 대한 MC-IXC 세포의 생존율을 측정 한 결과는 Fig. 1(C, D)과 같다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리구(21%)에서는 control 구 대비 약 78%의 감소한 cell viability를 나타냈고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 비타민 C를 동시에 처리한 그룹에서는 약 31%로 10% 정도의 뇌신경세포 보호 효과를 보였다. 양파 무취음료(Fig. 1C)의 경우 1,000 μg/mL 농도에서 positive control로 사용된 200 μM 비타민 C 처리구와 유의한 생존율을 나타내었다. 양파 강화음료(Fig. 1D)의 경우 무취음료 처리구와 비교 시 약 10배 낮은 농도에서 유의적인 결과를 나타내었으며 이러한 결과는 강화음료에서 더욱 높은 뇌신경세포 생존율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

#### AChE 저해 효과

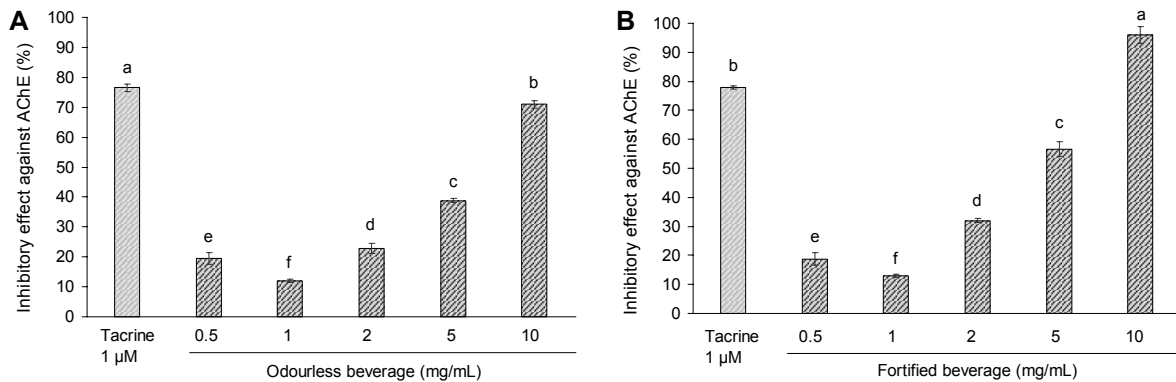
인지 장애는 주로 대뇌 기저부의 ACh성 뇌신경세포의 손상으로부터 ACh 기질 농도 약화 때문에 신경전달이 감소된다는 가설을 바탕(4)으로 ACh 농도 저하를 억제해줄 수 있는 AChE 저해제가 일반적으로 많은 의약품으로 사용되고 있으나, 개발 신약에서의 조직 독성 등의 부작용에 따른 천

연물 유래의 AChE 저해제 개발 필요성이 높아지고 있다 (14).

본 연구에서는 양파 무취음료와 강화음료의 인지 장애에 대한 예방 효과 소재를 탐색하기 위하여 AChE 저해 활성을 조사하였으며, 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. Positive control로 사용한 tacrine 처리구는 약 80% 정도의 AChE 저해 활성을 나타내었다. 50% 저해하는 농도(IC<sub>50</sub>)는 양파 무취음료 처리구(Fig. 2A)에서 6.76 mg/mL로 나타났고 강화음료 처리구(Fig. 2B)에서 4.20 mg/mL로 나타났으며, 강화음료 처리구에서 상대적으로 우수한 *in vitro* AChE 저해 효과를 나타내었다. Park 등(11)의 연구에 따르면 양파 과육 ethyl acetate 분획물의 IC<sub>50</sub> 값은 0.43 mg/mL로 나타났으며, 양파 껍질 ethyl acetate 분획물의 경우는 0.037 mg/mL의 함량으로 나타남을 보고하였다. 이러한 결과를 참고하여 볼 때 양파 과육을 이용한 무취음료에서 상대적으로 감소된 *in vitro* AChE 저해 활성을 나타내었으며, 강화음료에서 껍질 추출물 첨가에 의한 저해 효과가 상승하는 결과를 나타내었다.

#### Y-maze test

인체 뇌신경세포에 독성을 유발하여 알츠하이머성 치매를 유발하는 대표적 원인물질(11)로 알려진 Aβ로 유도된 인지 장애 마우스 모델을 대상으로 양파 무취음료와 강화음료의 공간인지능력을 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. 전체



**Fig. 2.** Inhibitory effect of onion odourless (A) and fortified beverages (B) against AChE. The inhibition was expressed as a percentage of enzyme activity inhibited compared with the control value. Results are presented as mean±SD (n=3). Data were statistically considered at  $P<0.05$ , and different small letters represent statistical differences.

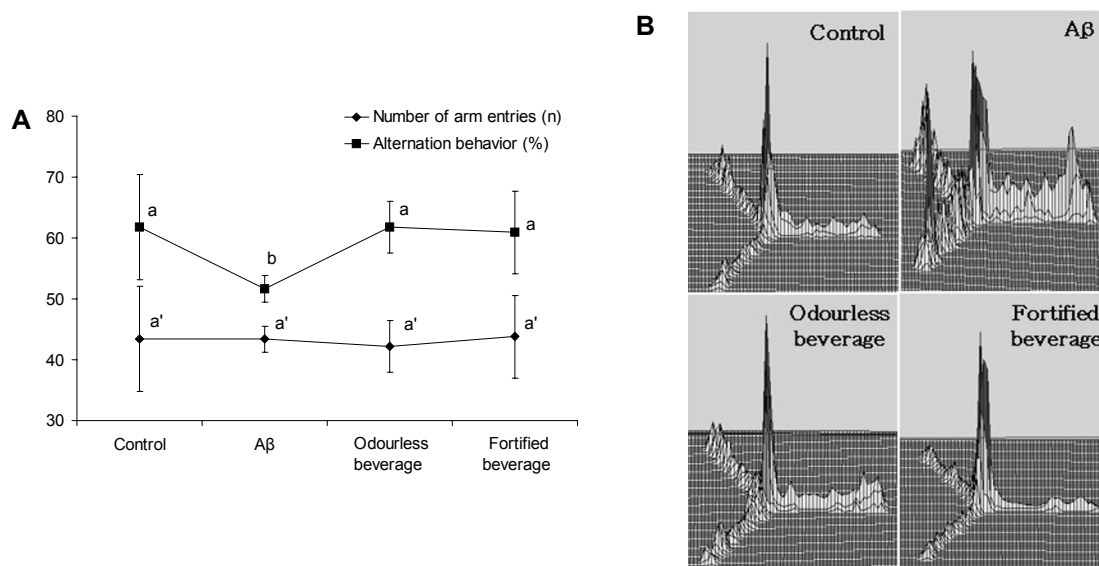
8분 동안 Y-maze에서 마우스의 행동을 관찰한 결과, 모든 그룹에서 arm을 통과한 총 횟수는 유의적인 차이를 나타내지 않음에 따라 기본적인 운동능력에 큰 차이를 나타내지 않았다. 하지만 Aβ 그룹은 control 그룹(61.82%) 대비 51.65%로 공간인지력 저하를 나타내었으며(Fig. 3A), 이에 반해 양파 무취음료 그룹과 강화음료 그룹은 각각 61.84%, 60.89%로 뛰어난 공간 인지력 개선 효과를 나타내었다. 또한, 실험 시간 동안 실제 마우스의 움직임을 관찰한 결과(Fig. 3B)에서 Aβ 그룹은 각 arm에서 일정하지 못한 움직임을 나타냈지만, 양파 무취음료와 강화음료 그룹에서는 대조군(control)과 유사하게 상대적으로 일정한 움직임을 나타내었다.

### Passive avoidance test

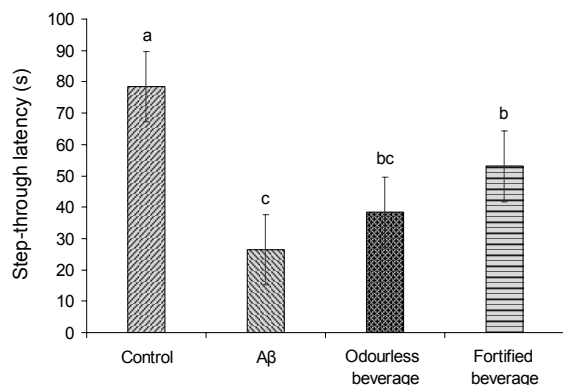
양파 무취음료와 강화음료를 섭취한 마우스의 인지 기능 및 단기 기억력 측정을 위해 passive avoidance test를 실시한 결과는 Fig. 4와 같다. Aβ 그룹은 control 그룹(78.50 s) 대비 26.50 s로 현저한 단기 기억력 저하(67% 감소)를 나타냈다. 이에 반해 양파 무취음료 그룹과 강화음료 그룹은 각각 38.50 s, 53.00 s로 Aβ 그룹과 비교하였을 때 유의적으로 단기 기억력 개선 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 상대적으로 강화음료에서 단기 학습 및 기억력에서 높은 개선 효과를 보여주는 것으로 나타났다.

### Morris water maze test

양파 무취음료와 강화음료를 섭취한 마우스의 장기 기억



**Fig. 3.** Effect of onion odourless and fortified beverages on spontaneous alteration behavior, number of arm entries (A) and path tracing of each groups (B) in Aβ-induced amnesic mice. The Y-maze test was performed 3 days after the Aβ injection (410 pmole (10 µL)). Sample group were ICV injection after feeding 3 weeks with 20 mg/kg of body weight per day (odourless beverage and fortified beverage, respectively). The spontaneous alteration behavior and number of arm entries were measured over 8 min. Results are presented as mean±SD (n=8). Data were statistically considered at  $P<0.05$ , and different small letters represent statistical differences.

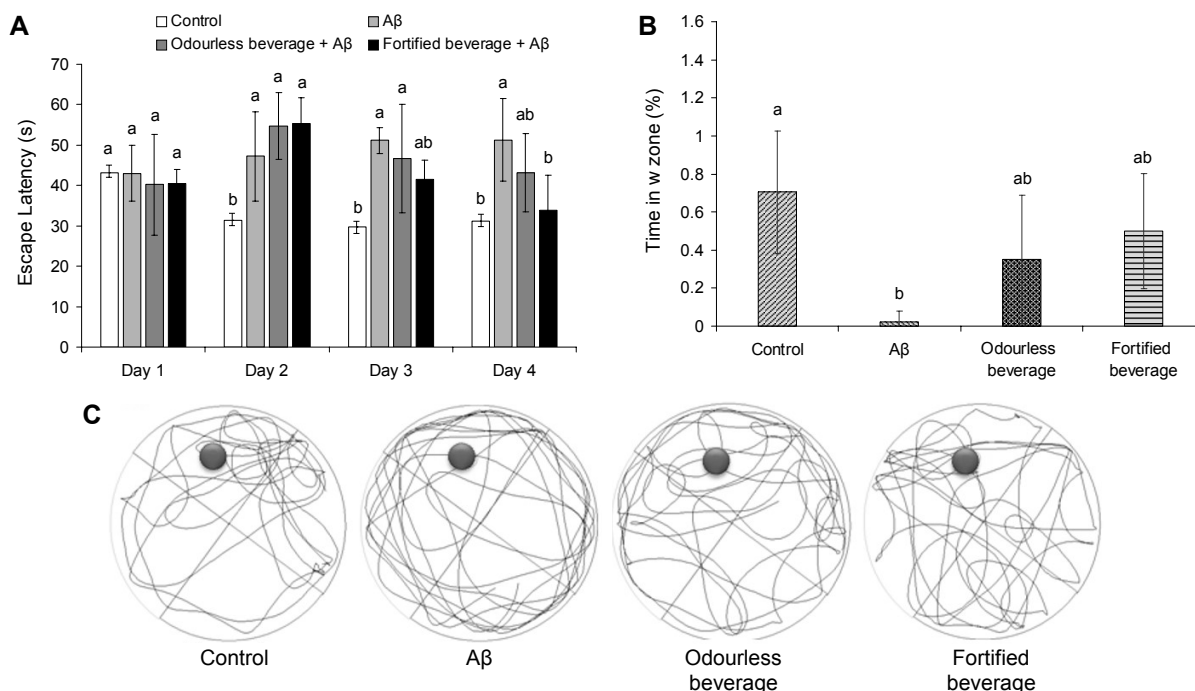


**Fig. 4.** Effect of onion odourless and fortified beverages on Aβ-induced learning and memory impairment in mice. Step-through latency (300 s) in the retention trial test was measured. Results are presented as mean±SD (n=8). Data were statistically considered at  $P<0.05$ , and different small letters represent statistical differences.

및 학습능력 측정을 위하여 Morris water maze test를 실시하였고, 결과는 Fig. 5와 같다. Hidden trial(4 day)에서 Aβ 그룹을 제외한 모든 그룹의 마우스들은 platform을 찾아가는 시간이 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 마지막 4일차에서 Aβ 그룹은 control 그룹(31.20 s) 대비 51.27 s로 현저한 장기 기억 및 학습능력의 저하를 나타냈다(Fig. 5A). 반면 양파 무취음료와 강화음료는 각각 43.14 s, 33.77 s로 Aβ 그룹과 비교 시 유의적인 기억력 개선을

나타내었다. Fig. 5B와 5C는 probe trial의 대표적인 마우스의 움직임을 나타내는 것으로, Aβ 그룹에서는 platform이 존재하였던 구역에서의 움직임이 적고 전체 구역을 이동하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5C). 이러한 움직임의 결과(Fig. 5B)에서는 Aβ 그룹(0.02%)과 비교 시 양파 무취음료 그룹(0.35%)과 강화음료 그룹(0.50%) 모두 장기 기억 및 학습능력 개선 효과를 나타내었다. 하지만 passive avoidance test 결과와 유사하게 강화음료 그룹에서 상대적으로 뛰어난 기억 및 학습능력 개선 효과를 나타내었다.

Yan 등(19)의 보고에 따르면 Aβ를 주사한 그룹에서는 control 그룹과 비교 시 공간인지능력을 평가한 Y-maze test에서 약 19% 인지저하를 나타내었으며, 기억 및 학습능력을 평가한 passive avoidance 및 Morris water maze test의 경우 각각 약 35%, 32% 감소율을 나타내었다. 이러한 결과를 참고하여 볼 때 본 실험에서의 Aβ에 의한 인지 장애가 유발되었다고 판단되며, 이러한 인지 장애에 대한 개선 효과는 무취음료보다 강화음료 그룹에서 상대적으로 우수한 효과를 나타내었다. 최근 본 연구 그룹의 결과(11)에서는 동물실험에서 양파의 과피 분획물뿐만 아니라 과육의 분획물에서도 모두 우수한 인지기능 개선 효과를 나타냈고, 이는 생리활성물질의 존재량보다는 물질의 구조에서 기인하는 소화·흡수율의 차이에 의한 효과로 보고하였다. 반면 본 실험에서는 양파의 가공형태에 따른 생리활성 효과를 검증한 것으로, 무취음료 그룹에서는 상대적으로 낮은 인지기능 개선 효과를 나타내었지만, 과피 분획물을 첨가한 강화음



**Fig. 5.** Effect of onion odourless and fortified beverages on long-term learning and memory in Morris water maze (MWM) test. Escape latency in the training trial (A), probe trial session (B), and path tracing in the probe trial (C) were examined. Results are presented as mean±SD (n=8). Data were statistically considered at  $P<0.05$ , versus control group, and different small letters represent statistical differences.

료 그룹에서는 A $\beta$  그룹과 비교 시 학습 및 기억력이 더욱 우수한 수준에서 나타남을 확인하였다. 결국 가공형태가 다른 두 가지 양파 가공 음료(무취 및 강화음료)에서는 강화음료가 상대적으로 우수한 개선 효과를 나타냈으며, 이는 해당 음료의 형태가 인지기능 예방에 도움을 줄 수 있는 산업제품으로 개발될 수 있음을 보여주는 것으로 판단된다.

#### 마우스 뇌 조직 중의 cholinergic system 활성 측정

전뇌 기저부에 위치하는 것으로 알려진 cholinergic 체계는 다양한 뇌 영역에 축삭을 분포시켜 신경전달물질인 ACh를 분비한다. A $\beta$ 로 유도된 산화적 스트레스에 의한 cholinergic 신경세포의 사멸은 대뇌 피질과 해마에서의 신경전달물질인 ACh의 감소로 AD와 같은 신경퇴행성질환을 유발하는 것으로 보고되고 있다(4).

A $\beta$ 를 주사한 마우스 뇌에서의 cholinergic system marker로서 AChE 활성과 ACh 함량을 측정한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. A $\beta$  그룹에서의 AChE 활성은 control 그룹(100%) 대비 113%로 나타났으며, A $\beta$ 의 주사가 마우스 뇌 조직에 존재하는 cholinergic system의 장애를 유발할 수 있을 것으로 판단된다. 반면 양파 무취음료와 강화음료 그룹에서는 각각 103.81%, 96.53%로, A $\beta$ 그룹 대비 AChE 활성 억제제를 유도하는 것으로 나타났다(Fig. 6A).

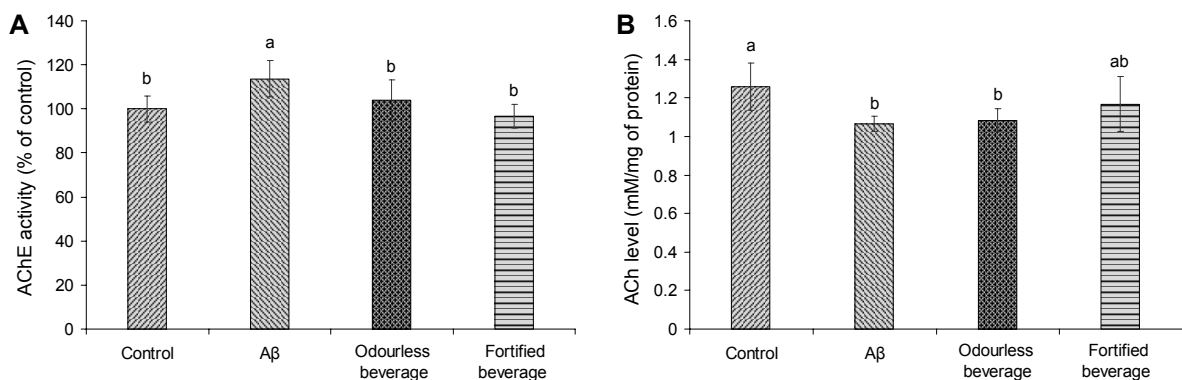
A $\beta$  그룹에서의 ACh 함량은 1.07 mM/mg of protein으로 control 그룹(1.26 mM/mg of protein) 대비 약 16% 감소한 함량을 나타내었으며, A $\beta$ 에 의해 활성화된 AChE가 신경전달물질인 ACh의 함량을 감소시켰을 것으로 판단된다. 반면에 양파 무취음료와 강화음료는 각각 1.08, 1.17 mM/mg of protein의 함량을 나타내었으며, 강화음료 처리군의 뇌 조직에서 상대적으로 높은 ACh 함량을 나타내었다. 이러한 결과는 A $\beta$  유도에 의한 cholinergic 장애에 대하여 강화음료 섭취가 효과적으로 이를 개선해줄에 따라 인지기능 개선 효과를 나타냈을 것으로 판단된다.

#### 마우스 뇌 조직 중의 항산화 활성 측정

동물실험 후 적출된 마우스 뇌 조직 중의 SOD, oxidized GSH/total GSH 및 MDA의 함량을 측정하였고, 이를 Fig. 7에 나타내었다. SOD는 superoxide anions와 같은 free radical들을 hydrogen peroxide로 변화시키는 항산화 효소로 뇌 조직을 보호할 수 있는 것으로 알려져 있다(20). SOD 함량을 측정한 결과는 Fig. 7A와 같다. Control 그룹은 5.65 U/mg of protein이었으며, A $\beta$  그룹은 이보다 감소한 4.24 U/mg of protein으로 A $\beta$ 와 같은 산화적 스트레스 등에 의하여 뇌 조직에서의 SOD 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 양파 무취음료와 강화음료는 각각 4.93, 5.16 U/mg of protein 함량을 나타내었다. 양파음료 처리 그룹에서 A $\beta$  그룹 대비 SOD 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 무취음료와 강화음료 간의 통계적 유의성은 발견되지 않았다.

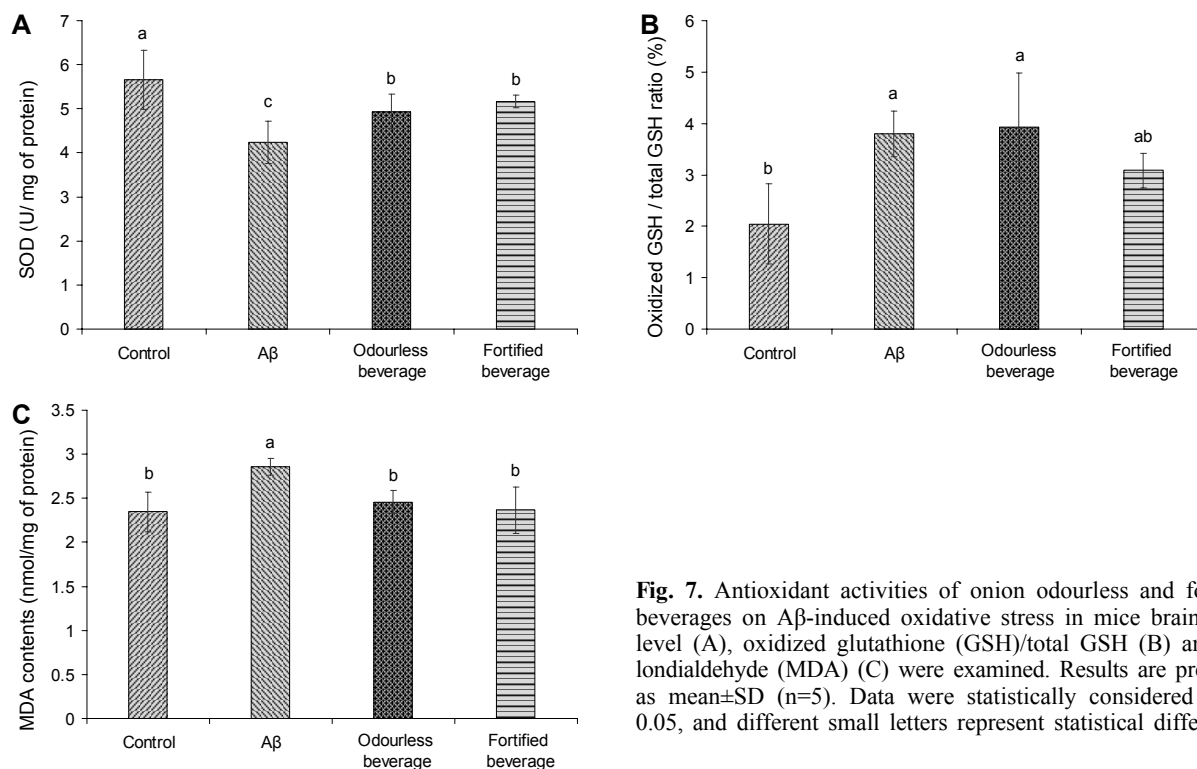
Oxidized GSH는 미토콘드리아 DNA의 산화와 연관되어 세포의 노화나 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다(21). 즉 뇌 조직의 oxidative stress에 대한 산화적 지표로서 oxidized GSH/total GSH 함량을 측정한 결과는 Fig. 7B와 같다. Control 그룹은 2.04%였으며, A $\beta$  그룹은 이보다 증가한 3.80%로, 상대적으로 oxidized GSH의 함량을 증가시키는 것으로 나타났다. 양파 무취음료와 강화음료 그룹에서는 각각 3.93%, 3.08%로, A $\beta$  그룹 대비 강화음료 그룹에서만 유의적으로 감소한 oxidized GSH 함량을 나타내었다.

뇌 조직에 존재하는 지질과산화 중간생성물인 MDA의 함량을 측정한 결과는 Fig. 7C와 같다. Control군은 2.34 nmole/mg of protein이었으며, A $\beta$ 군은 이보다 증가한 2.86 nmole/mg of protein으로 뇌 조직에서의 MDA 함량이 증가한 것으로 나타났다. 양파 무취음료군과 강화음료군은 각각 2.46과 2.36 nmole/mg of protein으로 A $\beta$ 군과 유의적인 결과를 나타냄에 따라 뛰어난 지질과산화 억제 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 동물실험 후 적출된 뇌 조직에서의 항산화 활성 결과들을 고려해볼 때 강화음료의 경우 실제 *in vivo* 상에서도 우수한 항산화 효과를 나타



**Fig. 6.** Effect of onion odourless and fortified beverages on A $\beta$ -induced cholinergic system dysfunction. AChE activity (A) and ACh level (B) were examined. Results are presented as mean $\pm$ SD (n=5). Data were statistically considered at  $P<0.05$ , and different small letters represent statistical differences.





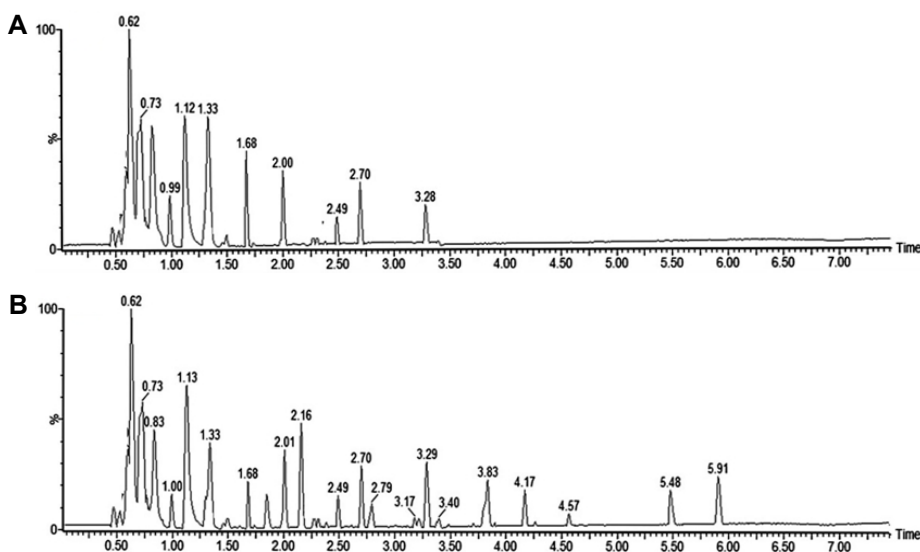
**Fig. 7.** Antioxidant activities of onion odourless and fortified beverages on A $\beta$ -induced oxidative stress in mice brain. SOD level (A), oxidized glutathione (GSH)/total GSH (B) and malondialdehyde (MDA) (C) were examined. Results are presented as mean $\pm$ SD (n=5). Data were statistically considered at  $P < 0.05$ , and different small letters represent statistical differences.

낼 수 있을 것으로 판단되며 이에 따라 인지기능 개선 효과에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각한다.

#### Q-TOF UPLC/MS system을 이용한 주요화합물 분석

뇌신경세포 보호 효과와 *in vivo* 인지기능 개선을 유도하는 양파 무취음료와 강화음료의 주요화합물을 분석한 결과는 Fig. 8과 같다. 무취음료의 화합물들(Fig. 8A)와 강화음료의 화합물들(Fig. 8B)을 분석한 결과는 각각 Table 1, 2에 나타내었다. 무취음료에는 약 5종(glucopyranosyl-fructose, kestose, raffinose, nistose, fructosylnistose)의 당

류와 phenolic 화합물 3종(caffeic hexose, quercetin-di-glucoside, quercetin-monoglucoside) 등이 분석되었다(22-27). 또한, 상대적으로 우수한 뇌신경세포 보호 효과 및 인지기능 개선 효과를 나타내었던 강화음료의 주요화합물을 분석한 결과는 무취음료에서 분석된 물질 이외의 화합물로 phenolic 화합물 6종(protocatechuic acid, myricetin, quercetin-triglucoside, rhamnetin hexoside, quercetin, scolymoside)과 steroidal saponin 2종(atropuroside A, spirost-5-ene-3,17,diol) 등이 검출되었다(28-35).



**Fig. 8.** Q-TOF UPLC MS scan data of base peak chromatogram mode in the onion odourless (A) and fortified beverages (B).

**Table 1.** MS<sup>2</sup> data of the identified compounds in odourless beverage

No.	RT <sup>1)</sup> (min)	[M-H] <sup>+</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> fragment	Assigned identification
1	0.62	377.08	341.10, 221.06, 179.05	Glucopyranosyl- $\alpha$ -1,6-fructose (21)
2	0.73	341.10	179.05, 113.02, 101.02, 71.01	Caffeic hexose (22)
3	0.83	503.15	323.09, 179.05, 161.04, 113.02, 101.02	Kestose (23)
4	0.99	503.16	221.06, 179.05	Raffinose (24)
5	1.12	191.01	161.91, 111.01, 87.01	Al-citrate (25)
6	1.33	665.21	485.13, 323.09, 179.05	Nistose (23)
7	1.68	827.27	647.18, 485.13, 323.09, 179.05	Fructosylinistose (23)
8	2.00	392.11	143.04, 128.03	ND <sup>2)</sup>
9	2.49	186.12		ND
10	2.70	625.14	463.07, 301.03	Quercetin-di-glucoside (26)
11	3.28	463.08	301.03, 178.99, 150.99	Quercetin-mono-glucoside (26)

<sup>1)</sup>Retention time. <sup>2)</sup>Not detected.

**Table 2.** MS<sup>2</sup> data of the identified compounds in fortified beverage without odourless beverage compounds

No.	RT <sup>1)</sup> (min)	ESI-MS <sup>+</sup> ions (m/z)	Main MS <sup>2</sup> peak	Assigned identification
1	1.85	359.06	153.03	Dihydroxy-DHA (27)
2	2.16	359.95	271.97, 163.96	ND <sup>2)</sup>
3	2.16	153.02	109.04	Protocatechuic acid (28)
4	2.79	317.03	178.99, 163.00, 151.00, 109.03	Myricetin (29)
5	3.17	917.42	771.41	Quercetin-3-O-glucosyl-rhamnosyl-(p-coumaroyl)hexoside (30)
6	3.40	477.10	314.04, 299.01, 271.02, 151.00	Rhamnetin hexoside (31)
7	3.83	301.03	178.99, 151.00, 121.02, 107.01	Quercetin (11)
8	4.17	723.39	557.33	Atropuroside A (32)
9	4.57	257.08	213.09, 144.92, 107.05	ND
10	5.48	737.40	591.35	Spirost-5-ene-3,17,diol (33)
11	5.91	707.40	561.34	Scolymoside (34)

<sup>1)</sup>Retention time. <sup>2)</sup>Not detected.

식물성 식품의 주요화합물 중 phenolic 화합물은 일반적으로 hydroxyl 그룹에 의하여 단백질이나 지질과 같은 거대 분자들과 결합하거나 2가 금속이온과 결합하여 높은 항산화 효과를 가지는 것으로 알려져 있다(36). 특히 강화음료의 주요화합물로서 일반적으로 양과의 대표적 페놀성 화합물로 알려진 protocatechuic acid, quercetin 및 quercetin 배당체가 분석되었으며(11,37), 과육을 활용한 무취음료에 부족한 이들 성분이 과피 추출물 첨가로 강화되었다고 판단된다. *Dendropanax moribifera* 추출물은 고지방 식이로 인한 혈당 증가 및 이로 인한 인지 장애 유발 마우스모델에서 cholinergic system 활성화, mitochondria 활성화 증가 그리고 세포 사멸에 관련된 신호전달 체계로서 c-Jun N-terminal protein kinase(JNK) 신호전달 체계에 대한 억제 효과를 통해 인지기능 개선 효과가 있음을 보고하였다(38). 더불어 이는 quercetin 구조를 기반으로 한 rutin(quercetin-3-O-rutinoside)과 같은 phenolic 화합물에 의한 결과라고 역시 보고하였다(38). 양과의 대표성분으로 알려진 quercetin의 경우 APPswe/PS1dE9 transgenic 마우스에 16주간 섭취시킨 결과, AMP-activated protein kinase(AMPK)의 활성을 유도함으로써 뇌 조직 내의 해마 mitochondrial membrane potential 및 ATP 함량의 증가와 미토콘드리아 내부

의 ROS 감소와 같은 mitochondria 기능을 활성화함으로써 인지기능의 개선 효과를 나타낸다고 보고하였다(39). 또한, 본 실험에서의 양과 강화음료에서 나타나는 대표적인 phenolic 화합물인 protocatechuic acid는 anthocyanin 계열 및 flavonoid 계열 등의 대사산물로서 임상적으로 생체이용률이 높다고 보고되어 있으며, A $\beta$ PP/PS1 double transgenic AD 마우스 모델의 뇌 조직에서 A $\beta$  축적 억제 효과, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8과 같은 신경염증 인자들의 억제 효과 및 해마와 대뇌 피질에서의 brain derived neurotrophic factor(BDNF)의 발현을 증가시킴으로써 인지기능을 개선할 수 있다고 보고하였다(40,41). 그뿐만 아니라 atropuroside A, spirost-5-ene-3,17,diol과 같은 steroidal saponin 계열의 경우 백합과에 속하는 맥문동(*Liriope platyphylla*)에서 주로 발견되는 saponin 계열로(33,42), 항산화, 항암, 항당뇨, 항염증 등의 효능이 보고되고 있다(34,42, 43). 양과 phenolics를 포함한 음료 중의 이들 물질은 일반적인 양과 과육이나 과피의 성분으로 알려지지는 않지만, 본 연구에 활용된 강화음료에서 구성 화합물로 분석되었고 이는 인지기능 개선 효과에도 일정 수준에서 작용하였을 것으로 판단된다.

## 요 약

본 연구는 양파의 볼캐치를 저감화시킨 무취음료와 양파 과피 추출물을 첨가한 생리활성 성분 강화음료의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스에 대한 뇌신경세포 보호 효과와 Aβ로 유도된 인지기능 장애 동물모델에서의 개선 효과를 검증하고자 수행되었다. 뇌신경세포 보호 효과에서는 상대적으로 강화음료에서 무취음료 대비 우수한 산화적 스트레스 억제 효과 및 생존율을 나타내었다. Aβ로 유도된 인지기능 장애 동물모델에 있어 Y-maze, passive avoidance 및 Morris water maze test에서 강화음료가 상대적으로 우수한 학습 및 기억력 개선 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 마우스의 뇌 조직에서 강화음료 그룹은 AChE 활성을 저해하고, 신경전달물질인 ACh의 함량을 증가시킴으로써 Aβ로 유도된 cholinergic system 장애에 있어 개선 효과를 나타내었다. 또한, 마우스 뇌에서 SOD 함량의 증가, oxidized GSH/total GSH와 MDA 함량을 감소시킴으로써 Aβ와 같은 산화적 스트레스 인자에 대한 뛰어난 항산화 효과를 나타내었다. 최종적으로 무취음료와 강화음료의 주요성분들을 Q-TOF UPLC/MS system을 통하여 분석한 결과, 강화음료의 경우 무취음료보다 생리활성을 가진 2개의 steroidal saponin과 6개의 phenolic 화합물 등이 추가 검출되었다. 이러한 결과들을 종합해볼 때 강화음료는 상대적으로 protocatechuic acid와 quercetin 같은 강력한 항산화 효과를 나타내는 phenolic 화합물과 steroidal saponin 계열에 의한 우수한 인지기능 개선 효과를 기반으로 한 고부가가치 식품으로 활용될 수 있는 산업적 가능성이 있다고 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 2013년 농림축산식품부 고부가가치식품 기술개발사업(113023-3) 및 농촌진흥청 지역특화작목기술개발과제(2015-PJ011345)의 지원을 받아 수행된 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Choi SJ, Kim MJ, Heo HJ, Hong B, Cho HY, Kim YJ, Kim HK, Lim ST, Jun WJ, Kim EK, Shin DH. 2007. Ameliorating effect of *Gardenia jasminoides* extract on amyloid beta peptide-induced neuronal cell deficit. *Mol Cells* 24: 113-118.
- Alkam T, Nitta A, Mizoguchi H, Saito K, Seshima M, Itoh A, Yamada K, Nabeshima T. 2008. Restraining tumor necrosis factor- $\alpha$  by thalidomide prevents the amyloid beta-induced impairment of recognition memory in mice. *Behav Brain Res* 189: 100-106.
- Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Zou L, Nagai T, Hiramatsu M, Ikejima T, Nabeshima T. 2009. Silibinin prevents amyloid  $\beta$  peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *Br J Pharmacol* 157: 1270-1277.
- Maeda-Yamamoto M, Saito T, Nesumi A, Tokuda Y, Ema K, Honma D, Ogino A, Monobe M, Murakami A, Murakami A, Tachibana H. 2012. Chemical analysis and acetylcholinesterase inhibitory effect of anthocyanin-rich red leaf tea (cv. Sunrouge). *J Sci Food Agric* 92: 2379-2386.
- Yoon MY, Lee BB, Kim JY, Kim Y, Park E, Lee SC, Park HR. 2007. Antioxidant activity and neuroprotective effect of *Psoralea corylifolia* Linne extracts. *Kor J Pharmacogn* 38: 84-89.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoon DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74: 418-425.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* 46: 4113-4117.
- Kwon JH, Lee GD, Byun MW. 1999. Quality changes based on storage temperature and humidity of onion. *Korean J Postharvest Sci Technol* 6: 143-147.
- Corzo-Martinez M, Corzo N, Villamiel M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci Technol* 18: 609-625.
- Park SK, Jin DE, Park CH, Seung TW, Guo TJ, Choi SG, Heo HJ. 2015. Antioxidant activity and PC12 cell protective effect of onion flesh and peel (*Allium cepa* L.) fraction on oxidative stress. *J Agric Life Sci* 49: 83-95.
- Park SK, Jin DE, Park CH, Seung TW, Guo TJ, Song JW, Kim JH, Kim DO, Heo HJ. 2015. Ameliorating effects of ethyl acetate fraction from onion (*Allium cepa* L.) flesh and peel in mice following trimethyltin-induced learning and memory impairment. *Food Res Int* 75: 53-60.
- Moisio T, Spare CG, Virtanen AI. 1962. Mass spectral studies of the chemical nature of the lachrymatory factor formed enzymically from S-(1-propenyl)-cysteine sulfoxide isolated from onion (*Allium cepa*). *Suom Kemistil B* 35: 29.
- Virtanen AI, Spare CG. 1961. Isolation of the precursor of the lachrymatory factor in onion (*Allium cepa*). *Suom Kemistil B* 34: 72-74.
- Heo HJ, Cho HY, Hong B, Kim HK, Kim EK, Kim BG, Shin DH. 2001. Protective effect of 4',5-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against A $\beta$ -induced oxidative stress in PC12 cells. *Amyloid* 8: 194-201.
- Kim SS, Park RY, Jeon HJ, Kwon YS, Chun W. 2005. Neuroprotective effects of 3,5-dicaffeoylquinic acid on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Phytother Res* 19: 243-245.
- Ellmans GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
- Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47-60.
- Vincent A, Newsom-Davis J. 1985. Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 48: 1246-1252.
- Yan JJ, Cho JY, Kim HS, Kim KL, Jung JS, Huh SO, Suh HW, Kim YH, Song DK. 2001. Protection against  $\beta$ -amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Br J Pharmacol* 133: 89-96.
- Furuta A, Price DL, Pardo CA, Troncoso JC, Xu ZS, Taniguchi N, Martin LJ. 1995. Localization of superoxide dismutases in Alzheimer's disease and Down's syndrome neocortex and hippocampus. *Am J Pathol* 146: 357-367.
- Vina J, Lloret A, Orti R, Alonso D. 2004. Molecular bases

- of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 25: 117-123.
22. Zhu J, Cole RB. 2001. Ranking of gas-phase acidities and chloride affinities of monosaccharides and linkage specificity in collision-induced decompositions of negative ion electrospray-generated chloride adducts of oligosaccharides. *J Am Soc Mass Spectrom* 12: 1193-1204.
23. Tulipani S, Huelamo MM, Ribalta MR, Estruch R, Ferrer EE, Andres-Lacueva C, Illan M, Lamuela-Raventós RM. 2012. Oil matrix effects on plasma exposure and urinary excretion of phenolic compounds from tomato sauces: Evidence from a human pilot study. *Food Chem* 130: 581-590.
24. Nagai A, Yamamoto T, Wariishi H. 2012. Identification of fructo- and malto-oligosaccharides in cured tobacco leaves (*Nicotiana tabacum*). *J Agric Food Chem* 60: 6606-6612.
25. Antonio C, Pinheiro C, Chaves MM, Ricardo CP, Ortuño MF, Thomas-Oates J. 2008. Analysis of carbohydrates in *Lupinus albus* stems on imposition of water deficit, using porous graphitic carbon liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1187: 111-118.
26. Bantan T, Milačič R, Mitrovic B, Pihlar B. 1999. Investigation of low molecular weight Al complexes in human serum by fast protein liquid chromatography (FPLC)-ETAAS and electrospray (ES)-MS-MS techniques. *J Anal At Spectrom* 14: 1743-1748.
27. Andlauer W, Martena MJ, Fürst P. 1999. Determination of selected phytochemicals by reversed-phase high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 849: 341-348.
28. Farias SE, Basselin M, Chang L, Heidenreich KA, Rapoport SI, Murphy RC. 2008. Formation of eicosanoids, E2/D2 isoprostanes, and docosanoids following decapitation-induced ischemia, measured in high-energy-microwaved rat brain. *J Lipid Res* 49: 1990-2000.
29. Liu AH, Guo H, Ye M, Lin YH, Sun JH, Xu M, Guo DA. 2007. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1161: 170-182.
30. Biesaga M, Pyrzyńska K. 2009. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. *J Chromatogr A* 1216: 6620-6626.
31. Dou J, Lee VS, Tzen JT, Lee MR. 2007. Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes. *J Agric Food Chem* 55: 7462-7468.
32. Schieber A, Berardini N, Carle R. 2003. Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. Cv. "Tommy Atkins") peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 51: 5006-5011.
33. Zhang Y, Li HZ, Zhang YJ, Jacob MR, Khan SI, Li XC, Yang CR. 2006. Atropurosides A-G, new steroidal saponins from *Smilacina atropurpurea*. *Steroids* 71: 712-719.
34. Xiaohui F, Yi W, Yiyu C. 2006. LC/MS fingerprinting of Shenmai injection: A novel approach to quality control of herbal medicines. *J Pharm Biomed Anal* 40: 591-597.
35. Häusler M, Ganzera M, Abel G, Popp M, Stuppner H. 2002. Determination of caffeoylquinic acids and flavonoids in *Cynara scolymus* L. by high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 56: 407-411.
36. Kwak JH, Choi GN, Park JH, Kim JH, Jeong HR, Jeong CH, Heo HJ. 2010. Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. *J Agric Life Sci* 44: 57-66.
37. Link KP, Angell HR, Walker JC. 1929. The isolation of protocatechuic acid from pigmented onion scales and its significance in relation to disease resistance in onions. *J Biol Chem* 81: 369-375.
38. Kim JM, Park SK, Guo TJ, Kang JY, Ha JS, Lee DS, Lee U, Heo HJ. 2016. Anti-amnesic effect of *Dendropanax moribifera* via JNK signaling pathway on cognitive dysfunction in high-fat diet-induced diabetic mice. *Behav Brain Res* 312: 39-54.
39. Wang DM, Li SQ, Wu WL, Zhu XY, Wang Y, Yuan HY. 2014. Effects of long-term treatment with quercetin on cognition and mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 39: 1533-1543.
40. Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, Galvano F, Gallo A, Scalfi L, Fogliano V. 2007. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr* 137: 2043-2048.
41. Song Y, Cui T, Xie N, Zhang X, Qian Z, Liu J. 2014. Protocatechuic acid improves cognitive deficits and attenuates amyloid deposits, inflammatory response in aged AβPP/PS1 double transgenic mice. *Int Immunopharmacol* 20: 276-281.
42. Back NI, Cho SJ, Bang MH, Lee L, Park C, Kim M, Kim K, Sung J. 1998. Cytotoxicity of steroid-saponins from the tuber of *Liriope platyphylla* W.T. *Agric Chem Biotechnol* 41: 390-384.
43. Rhee IJ. 1997. Effect of *Liriope tuber* extract on the decrease of blood glucose. *Hyoysung Bull Pharm Sci* 2: 49-56.