

여주를 첨가한 발효음료의 소화효소 억제와 항산화 활성

박수인 · 여성순 · 이영승 · 정윤화 · 김미숙

단국대학교 식품영양학과/천연물 식의약소재산업화 연구센터

Inhibitory Activities of Digestive Enzymes and Antioxidant Activities of Fermented Beverages Using *Momordica charantia* L.

Suin Park, Seoungsoon Yeo, Youngseung Lee, Yoonhwa Jeong, and Misook Kim

Department of Food Science and Nutrition/ARC, Natural Nutraceuticals
Industrialization Research Center, Dankook University

ABSTRACT This study was conducted to develop *Momordica charantia* L. juice fermented by four *Lactobacillus* species such as *Lactobacillus paracasei* (LPA), *Lactobacillus plantarum* (LPL), *Lactobacillus rhamnosus* (LRH), and *Lactobacillus reuteri* (LRE) as well as to investigate their inhibitory effects against digestive enzymes and antioxidant activities. Fermentation was performed at 37°C without nutrient supplementation for 72 h. The pH and total lactic acid contents were within the ranges of 3.75~3.96 and 5.21~10.04% in fermented juices, respectively. The type of starter culture and fermentation time induced changes in flavonoid contents more than total phenolic contents. All juices fermented for 48 h strongly inhibited α -glucosidase activity with the percentage of inhibition ranging of 91.24~95.05%. Antioxidant activities of all juices mostly increased after 48 h of fermentation. Our results suggest that fermented juice possesses inhibitory activity against digestive enzymes and antioxidant activity, and they can be used as health functional beverages.

Key words: *Momordica charantia* L., *Lactobacillus* sp., α -glucosidase inhibition, α -amylase inhibition, antioxidant activity

서 론

최근 서구화된 식생활 및 각종 생활양식의 변화에 따라 고혈압, 비만, 암, 심혈관계 질환 등 각종 만성퇴행성질환의 발병률이 증가하여 심각한 사회 문제로 대두되고 있다. 또한, 소비자의 의식이 변화함에 따라 건강 유지 및 삶의 질 향상을 추구하면서 웰빙에 관한 관심이 급증하고, 건강 지향적이면서 자연 친화적인 기능성 식품에 대한 요구가 증가하고 있다. 특히 음료는 주식 다음으로 일상적 섭취가 가장 많은 식품으로 2016년 국내 시장 규모가 11조 4,482억 원으로 전년 대비 4.8% 증가하였다. 이처럼 음료 시장은 2010년 이후 한 차례의 역성장 없이 증가 추세가 이어지고 있다. 또한, 식품 제조업에서 음료가 차지하는 비중 역시 2010년 11.6%였으나 2016년에는 1.3%가 상승한 12.9%였다(1). 농업기술실용화재단의 보고에 따르면 '발효음료'의 시장 규모가 2011년 기준으로 전체 음료시장의 약 40.6%를 차지하고 있으므로 그 전망이 매우 밝다고 한다(2). 이처럼 건강에 대한 소비자들의 관심 증대에 따라 단순한 음료 섭취의 목적

이 아닌 하나의 제품에 다양한 가치를 담은 기능성 음료 시장이 확대되어 성장하고 있다. 발효음료는 우유나 기능성을 이미 보유하고 있는 과일이나 채소 등의 식물체 원료에 직접 유산균으로 발효하여 기능성을 더욱 증진시키거나 발효 대사체를 통한 새로운 기능성을 추가하기도 하고 풍미를 향상 시키기도 한다(3). 이에 따라 많은 연구자들이 블루베리, 아사이베리, 석류, 홍삼 등을 이용한 항산화 음료나 생리활성 물질이 풍부한 다양한 음료를 개발하고 품질 특성을 연구하였다(4-6).

유산균은 식품에 증식하면서 젖산을 포함한 다양한 대사 산물을 생산하여 식품의 저장성을 연장하고 특유의 풍미를 부여한다. 또한, 병원성 세균의 생육 억제, 유당 불내증의 완화작용, 콜레스테롤 수준 정상화, 면역증진 활성, 항암작용 등 현대인의 성인병 예방과 건강 증진에 탁월한 기능을 나타내는 것으로 보고되고 있어 각종 발효식품, 건강 기능성 식품, 사료 첨가제나 의약품 등의 제조에 광범위하게 활용되고 있다(7-11). 최근에는 다양한 곡류와 한약재, 오디 등을 유산균으로 발효하여 품질적 가치와 기호도가 향상되었을 뿐 아니라 항산화와 항당뇨 활성의 증가나 혈중 콜레스테롤 저하 등 건강 기능성이 증가하였다고 보고된 바 있다(12).

여주(*Momordica charantia* L.)는 박과에 속하는 덩굴성 한해살이 식물로 특유의 쓴맛으로 인해 bitter melon, bitter

Received 28 July 2017; Accepted 13 September 2017

Corresponding author: Misook Kim, Department of Food Science and Nutrition, Dankook University, Cheonan, Chungnam 31116, Korea

E-mail: mkim5@dankook.ac.kr, Phone: +82-41-550-3494

gourd, bitter squash라고 불리어 왔고, 비타민 C, glycosides, saponins, alkaloids 등 생리활성이 뛰어난 물질들을 다량 함유하고 있어 예로부터 건강식품 소재나 약재로 널리 사용되어 왔다(13). 특히 여주에는 cucurbitane-type triterpenoid의 일종인 charantin이 함유되어 있어 인슐린 분비에 결정적 역할을 하는 베타세포를 활성화시킴으로써 인슐린의 분비를 촉진하고 혈당을 낮추는 역할을 한다고 알려져 있다(14). 여주는 주로 용매를 이용하여 추출한 후 항산화(15), 항당뇨(16), 항균(17), 항암 활성(18) 등의 건강 기능성에 관한 연구는 진행되어 왔으나 이를 활용한 식품 개발에 관한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 생리활성이 뛰어난 물질들을 다량 함유하고 있어 예로부터 건강식품 소재나 약재로 널리 사용되고 있는 여주에 유산균을 접종하여 제조한 발효음료의 건강 기능성을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

2013년 경남 함양군에서 재배된 미성숙한 여주를 동결 건조한 가루(Cheonlyeong Food, Hamyang, Gyeongnam, Korea)를 구입하여 본 연구에 사용하였다. Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, aluminum nitrate, potassium acetate, aluminum nitrate, quercetin, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), ascorbic acid, FeCl₃, FeSO₄·7H₂O (iron(II) sulfate heptahydrate), potassium persulfate는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine은 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.(Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

여주 유산균 발효음료 제조

여주 건조물이 10%가 되도록 멸균 증류수를 일정량 부은 후 75°C에서 30분간 살균하여 유산균 4종(*Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*)을 각각 2.5%씩 접종하고 37°C에서 72시간 동안 발효하였다. 제조한 발효음료는 -70°C에서 냉동 보관하면서 분석시료로 이용하였다.

pH와 총산 함량 측정

pH는 원액을 pH meter기(Orion 3-Star Benchtop, Thermo Orion, Beverly, MA, USA)로 측정하였다. 총산 함량은 여주 유산균 발효음료 5 mL에 증류수 20 mL를 가한 후 균질화하여 0.1 N NaOH로 pH 8.2까지 적정하고, 젖산 함량으로 환산하여 백분율로 표시하였다.

환원당 측정

환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법을 이용하여 측정하였다(19). 여주 유산균 발효음료를 9,425×g(10,000

rpm)에서 5분간 원심분리 한 후 상등액 0.2 mL를 취하여 DNS 시약 0.6 mL를 가하고 100°C에서 5분 동안 끓여 반응시켰다. 반응액에 증류수 3 mL를 첨가하여 반응을 종료시킨 후 UV/Visible Spectrophotometer(Ultrospec 2100 pro, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)를 이용하여 파장 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준곡선으로 glucose를 사용하였다.

유산균 수 측정

유산균 수는 일정량의 음료를 멸균 펩톤수로 단계 희석하여 균질화한 후 MRS 평판배지(Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 도말하고 37°C에서 24~48시간 동안 배양하였다. 이후 형성된 colony 수를 세어 시료당 colony forming unit(CFU/mL)으로 나타내었다.

α-Amylase 저해 활성 측정

α-Amylase 저해 활성은 환원당 분석법(20)을 응용하여 측정하였다. 100배 희석한 음료를 1 mg/mL α-amylase 150 μL와 0.02M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 50 μL와 혼합하여 37°C에서 1분간 방치한 후 1% 전분을 기질로 하여 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 반응액에 DNS 시약 1 mL를 가하여 95°C에서 5분 동안 끓여 반응을 정지시킨 후 증류수 2 mL를 넣고 냉각시켜 UV/Visible Spectrophotometer를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해 활성(%)은 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$\alpha\text{-Amylase 저해 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구 효소 활성}}{\text{시료 무첨가구 효소 활성}}\right) \times 100$$

α-Glucosidase 저해 활성 측정

α-Glucosidase 저해 활성은 음료를 2.5 unit/mL α-glucosidase(Sigma-Aldrich Co.) 효소액(0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6.8)과 혼합하여 2 mM p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside(pNPG, Sigma-Aldrich Co.)를 가한 후 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 0.1 M Na₂CO₃를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 냉각한 용액을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해 활성(%)은 다음 식에 의하여 산출하였다(21).

$$\alpha\text{-Glucosidase 저해 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구 효소 활성}}{\text{시료 무첨가구 효소 활성}}\right) \times 100$$

Lipase 저해 활성 측정

Lipase 저해 활성은 Dolenc 등(22)의 방법을 변형하여 측정하였다. 음료 250 μL에 동량의 porcine pancreatic lipase(1 mg/mL in 0.1 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0)를 혼합한 후 기질 p-nitrophenyl palmitate(p-NPP) 250 μL를 첨가한 다음 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해 활성(%)은 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Pancreatic lipase 저해 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구 효소 활성}}{\text{시료 무첨가구 효소 활성}}\right) \times 100$$

총 페놀 함량 측정

여주 유산균 발효음료의 총 페놀 함량은 Folin-Denis법(23)을 변형하여 측정하였다. 음료 200 μL 에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 시약(Sigma-Aldrich Co.) 100 μL 를 가한 후 실온에서 3분 동안 반응시킨 다음 10% sodium carbonate(Na_2CO_3) 300 μL 를 가하고 실온에서 2시간 동안 반응하였다. 반응액은 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 mg GAE (gallic acid equivalent)/g 단위로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 측정

여주 유산균 발효음료의 총 플라보노이드 함량은 Woisky와 Salatino(24)의 방법을 변형하여 측정하였다. 음료 0.5 mL에 2 mL의 증류수를 가한 후 5% NaNO_2 용액 0.3 mL를 가하고 5분 동안 실온에서 반응시켰다. 이 용액에 10% AlCl_3 용액 0.3 mL를 가하고 6분 동안 반응시킨 후 1 M NaOH 용액 2 mL를 첨가하고 다시 11분 반응시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드 함량은 quercetin(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 환산하여 구하였다.

항산화 활성 측정

DPPH 라디칼 소거 활성을 확인하기 위해 Blois(25)의 방법을 변형하여 실험하였다. 2배 희석한 음료 300 μL 에 1.2 mL의 0.2 mM DPPH(Sigma-Aldrich Co.)를 가하여 암실에서 30분 동안 반응시킨 후 517 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 3회 반복하여 평균을 낸 다음 대조구에 대한 흡광도의 감소 정도를 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{A_0 - A}{A_0}\right) \times 100$$

A_0 : 시료가 첨가되지 않은 DPPH 용액의 흡광도

A: 반응용액중의 DPPH와 시료의 반응 흡광도

Ferric reducing antioxidant power(FRAP) 활성은 Benzie와 Strain(26)의 방법을 변형하여 실험하였다. 300 mM sodium acetate buffer(pH 3.6)와 2,4,6-tripyridyls-triazine(TPTZ) 용액, FeCl_3 용액을 10:1:1(v/v/v)로 혼합한 용액 2.9 mL를 음료 0.1 mL와 혼합한 후 37°C에서 15분 동안 반응하여 590 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 분석은 3회 반복하여 평균과 표준편차로 나타내었다. 데이터의 통계처리는 Minitab version 16(Minitab Inc.,

State College, PA, USA)을 이용하여 분산분석을 통해 각 샘플 간의 유의성 검증을 수행하였으며 Tukey test를 이용하여 5% 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

여주 발효음료의 발효 특성

여주 유산균 발효음료의 채취 시간별 발효 특성 변화는 Table 1과 같다. 여주 발효음료의 초기 유산균 수는 7.88~7.90 log CFU/mL였으나 24시간 발효 후에 9.12~9.21 log CFU/mL로 증가하였고 이후부터 모두 감소하는 경향을 보여 72시간에는 7.77~8.18 log CFU/mL였으며, 발효균에 따른 유의적인 차이는 없었다. 여주의 환원당은 발효 24시간 동안 상당한 감소를 보였으며, 48시간째에는 거의 모두 소비가 되었다. 이는 미생물 대사 및 증식의 주요 영양원으로 이용되는 당이 여주 유산균 발효 24시간 동안 활발히 이용되었으나, 발효가 진행될수록 영양원인 환원당의 감소에 따라 사멸하는 균들이 증가하였다고 생각된다. 이러한 경향은 유산균을 접종한 감자 발효음료에서도 관찰되었다(27).

여주 발효음료의 초기 pH는 4.47~4.52였으나 24시간 발효 후 LRE(pH 3.95), LPA(pH 3.93), LRH(pH 3.90), LPL(pH 3.88)로 모든 균에서 pH가 감소하였다. Yoon 등(28)의 연구에서 *Lactobacillus*를 접종한 양배추 발효물에서도 초기 pH는 5.0이었으나 24시간 발효 후에 3.7로 감소하는 경향을 보이며 본 연구와 비슷한 결과를 보였다. 여주 발효음료의 pH는 24시간 이후 변화가 크지 않았으나 총산 함량은 24시간 이후에도 지속적인 증가가 관찰되었다. 여주 발효음료의 초기 총산 함량은 3.10~4.14%였으나 24시간 발효 후 LRH는 6.88%, LPL은 6.28%, LPA는 5.63%, LRE는 5.21%로 증가했으며 72시간 발효 후 LPL은 10.04%, LRE는 9.70%, LPA는 8.92%, LRH는 8.47%로 증가하였다. 이러한 pH 값과 총산 함량의 변화는 젖산균의 증식과 밀접한 관련이 있다(29).

본 연구에서는 유산균 수의 증가, pH의 감소 및 총산 함량의 증가로 발효가 원활하게 진행되었음을 알 수 있다. 그러나 121°C에서 15분간 2회 추출한 여주의 열수 추출물을 *Lactobacillus casei*로 발효한 연구에서는 pH가 발효 전에 비해 증가하여 정상적으로 발효가 진행되지 않아 본 연구와 차이가 있어, 여주 유산균 발효음료 제조 시 열에 민감한 영양성분이 *Lactobacillus* 속의 증식에 필수적임을 알 수 있었다(30).

총 페놀 및 총 플라보노이드 함량

식물에 많이 분포되어 있는 페놀 화합물은 각종 질병의 치료 및 예방에 효과가 있고 천연 항산화제로의 작용이 우수하다고 알려져 있다(28). 여주 유산균 발효음료의 총 페놀과 플라보노이드 함량은 Table 2와 같다.

여주 발효음료의 초기 총 페놀 함량은 20.60~22.57 mg

Table 1. Changes in viable cell counts, reducing sugar contents, pH, and total acidity in the fermented *Momordica charantia* L. juices

	0 h	24 h	48 h	72 h
	Viable cell counts (log CFU/mL)			
LRE ¹⁾	7.88±0.01 ^{aBC2)}	9.18±0.45 ^{aA}	8.59±0.26 ^{aAB}	7.77±0.31 ^{aC}
LRH	7.88±0.04 ^{aB}	9.15±0.12 ^{aA}	8.97±0.40 ^{aA}	8.10±0.31 ^{aB}
LPA	7.90±0.01 ^{aB}	9.21±0.02 ^{aA}	8.41±0.44 ^{aB}	8.18±0.04 ^{aB}
LPL	7.88±0.02 ^{aC}	9.12±0.21 ^{aA}	8.44±0.04 ^{aB}	8.03±0.00 ^{aC}
	Reducing sugar (mg/mL)			
LRE	0.54±0.03 ^{aA}	0.13±0.02 ^{aB}	0.01±0.00 ^{aC}	0.11±0.01 ^{aB}
LRH	0.62±0.04 ^{aA}	0.12±0.02 ^{aB}	0.01±0.00 ^{aC}	0.12±0.03 ^{aB}
LPA	0.56±0.01 ^{aA}	0.12±0.02 ^{aB}	0.01±0.00 ^{aC}	0.15±0.01 ^{aB}
LPL	0.62±0.04 ^{aA}	0.15±0.05 ^{aB}	0.01±0.00 ^{aC}	0.13±0.02 ^{aB}
	pH			
LRE	4.47±0.01 ^{aA}	3.95±0.02 ^{aB}	3.84±0.06 ^{aC}	3.96±0.04 ^{aB}
LRH	4.49±0.07 ^{aA}	3.90±0.01 ^{bcB}	3.75±0.01 ^{bcC}	3.86±0.03 ^{bbB}
LPA	4.47±0.01 ^{aA}	3.93±0.02 ^{abB}	3.85±0.01 ^{aC}	3.84±0.03 ^{bcC}
LPL	4.52±0.01 ^{aA}	3.88±0.02 ^{cbB}	3.85±0.02 ^{aB}	3.87±0.01 ^{bbB}
	Total acidity (% lactic acid)			
LRE	3.10±0.06 ^{cd}	5.21±0.34 ^{cd}	7.42±0.08 ^{ab}	9.70±0.83 ^{aA}
LRH	3.55±0.09 ^{bc}	6.88±0.53 ^{ab}	8.13±0.08 ^{aA}	8.47±0.35 ^{aA}
LPA	3.75±0.15 ^{bd}	5.63±0.08 ^{bcC}	6.99±0.90 ^{ab}	8.92±0.17 ^{abA}
LPL	4.14±0.12 ^{ad}	6.28±0.14 ^{abC}	7.75±0.22 ^{ab}	10.04±0.10 ^{aA}

¹⁾*M. charantia* L. juice fermented by *L. reuteri* (LRE), *L. rhamnosus* (LRH), *L. paracasei* (LPA), *L. plantarum* (LPL).

²⁾Mean±standard deviation of three replicates; Means with different letters in a column (a-c) and a row (A-D) are significantly different at *P*<0.05 by Tukey's multiple range test.

Table 2. Changes in total phenolic and total flavonoid contents in the fermented *Momordica charantia* L. juices

	0 h	24 h	48 h	72 h
	Total phenolic contents (mg GAE/g)			
LRE ¹⁾	20.60±2.43 ^{aA2)}	21.91±1.69 ^{aA}	22.70±3.16 ^{aA}	22.63±3.30 ^{aA}
LRH	21.69±0.84 ^{aA}	22.58±0.54 ^{aA}	22.97±2.76 ^{aA}	24.34±0.53 ^{aA}
LPA	22.13±0.51 ^{aA}	22.89±1.22 ^{aA}	23.86±1.08 ^{aA}	24.11±2.56 ^{aA}
LPL	22.57±2.87 ^{aAB}	21.79±2.60 ^{aAB}	25.24±1.03 ^{aA}	19.83±0.65 ^{aB}
	Flavonoid contents (mM QE/g)			
LRE	1.84±0.07 ^{bc}	2.10±0.10 ^{bc}	5.32±0.31 ^{aA}	3.60±0.34 ^{aB}
LRH	1.88±0.01 ^{bc}	2.22±0.02 ^{bc}	4.14±0.27 ^{ba}	3.74±0.02 ^{aB}
LPA	2.00±0.11 ^{abc}	2.88±0.29 ^{ab}	3.58±0.03 ^{ba}	2.04±0.28 ^{bc}
LPL	2.11±0.03 ^{ac}	3.25±0.01 ^{aAB}	3.56±0.59 ^{ba}	2.37±0.54 ^{bbC}

¹⁾*M. charantia* L. juice fermented by *L. reuteri* (LRE), *L. rhamnosus* (LRH), *L. paracasei* (LPA), *L. plantarum* (LPL).

²⁾Mean±standard deviation of three replicates; Means with different letters in a column (a,b) and a row (A-C) are significantly different at *P*<0.05 by Tukey's multiple range test.

GAE/g이었으며, 발효 72시간째 LRH는 24.34 mg GAE/g으로 가장 높았으나 발효 시간에 따른 유의적인 차이는 없었다(*P*>0.05). 여주 발효음료의 초기 총 플라보노이드 함량은 1.84~2.11 mM QE/g이었으며, 모든 군에서 48시간 발효 후에 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었다(*P*<0.05). 48시간 발효 후 총 플라보노이드 함량은 LRE가 5.32 mM QE/g으로 가장 높았으며, LRH는 4.14 mM QE/g, LPA는 3.58 mM QE/g, LPL은 3.56 mM QE/g 순이었다. Cheon(30)은 여주 열수 추출물을 *L. casei*로 발효했을 때 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 감소하였다. Lee와 Hong(31)의 연구에서 오디 유산균 발효물의 총 폴리페놀 함량은 발효 전보

다 2배 증가한 10.75 tannic acid g/100 g이었고, 총 플라보노이드 함량은 발효 전보다 3배 증가한 5.02 rutin g/100 g이었으며, 이는 저분자 폴리페놀 화합물의 증가와 미생물 대사를 통한 유용 생리활성 물질의 생성에 의한 것이라고 하였다.

탄수화물 관련 효소의 저해 활성

식사를 통해 섭취된 전분은 α-amylase에 의해 올리고당이나 맥아당의 형태로 전환된 후 α-glucosidase의 가수분해 작용에 의하여 포도당의 형태로 전환되어 체내에서 이용된다. 따라서 α-amylase와 α-glucosidase 등 탄수화물 소

Table 3. Changes in α -amylase and α -glucosidase activity in the fermented *Momordica charantia* L. juices

	0 h	24 h	48 h	72 h
α -Amylase inhibition (%)				
LRE ¹⁾	4.20±0.35 ^{aA2)}	13.11±2.03 ^{aA}	14.21±5.58 ^{aA}	14.23±6.84 ^{aA}
LRH	4.28±1.35 ^{aC}	10.86±1.52 ^{abB}	19.00±0.79 ^{aA}	5.15±1.38 ^{aC}
LPA	3.93±0.50 ^{abB}	14.15±1.45 ^{aA}	16.90±1.91 ^{aA}	5.29±0.84 ^{abB}
LPL	4.87±0.56 ^{abB}	8.05±0.45 ^{bbB}	15.24±1.71 ^{aA}	14.29±3.24 ^{aA}
α -Glucosidase inhibition (%)				
LRE	59.63±0.49 ^{abC}	85.89±5.13 ^{aA}	92.32±2.62 ^{aA}	70.14±4.39 ^{bbB}
LRH	58.44±0.04 ^{bc}	72.08±7.12 ^{bbC}	95.05±2.28 ^{aA}	78.60±10.20 ^{abAB}
LPA	61.26±0.09 ^{ad}	76.74±0.67 ^{abC}	91.24±0.12 ^{aA}	89.30±0.36 ^{abB}
LPL	60.03±1.80 ^{abC}	82.72±2.60 ^{abB}	91.86±2.49 ^{aA}	87.44±0.44 ^{abAB}

¹⁾*M. charantia* L. juice fermented by *L. reuteri* (LRE), *L. rhamnosus* (LRH), *L. paracasei* (LPA), *L. plantarum* (LPL).

²⁾Mean±standard deviation of three replicates; Means with different letters in a column (a,b) and a row (A-D) are significantly different at $P<0.05$ by Tukey's multiple range test.

화효소의 저해제는 복합 탄수화물의 흡수를 억제하여 소장 전체에 포도당이 흡수되어 당 수치가 높아지는 것을 막아준다(12).

여주 발효음료의 초기 α -amylase 저해 활성은 3.93~4.87%였으나 발효균의 종류나 발효 시간에 따라 유의적인 차이가 있었다(Table 3). 모든 여주 발효음료에서 48시간 발효 시 14.21~19.00%로 가장 높은 저해 활성을 보였다. 특히 LRH는 19.00%로 가장 높은 저해 활성을 보였으며, LPA는 16.90%, LPL은 15.24%, LRE는 14.21% 순이었다. Nam과 Kim(13)은 여주의 추출 용매를 달리하여 α -amylase 저해 활성을 분석한 결과 에탄올 추출물이 41.34~73.37%로 물 추출물보다 높았다고 보고하였다. α -Amylase 저해 활성은 섭취된 복합 탄수화물의 분해를 억제하여 당뇨나 비만의 예방이나 치료하는 데 활용되고 있으나, 높은 저해 활성은 복부 팽만감과 통증을 유발한다. 따라서 효과적으로 당뇨와 비만을 예방하고 치료하기 위해서 완전한 amylase 저해 활성과 높은 α -glucosidase 저해 활성의 필요성이 제시되어 왔다(12).

α -Glucosidase는 소장 상피세포의 brush-border membrane에 존재하는 효소로 이 효소의 활성 저해는 인슐린 분비를 통하지 않고 당질 가수분해와 흡수과정을 저해함으로써 탄수화물의 소화와 흡수를 지연시키는 역할을 하며, 소장 전체에 포도당이 흡수되어 식후 혈당 수치가 높아지는 것을 막아준다(32). 여주 발효음료의 초기 α -glucosidase 저해 활성은 58.44~61.26%였으며 여주 유산균 발효음료의 α -glucosidase 저해 활성은 48시간까지 증가하여 48시간째 LRH는 95.05%, LRE는 92.32%, LPL은 91.86%, LPA는 91.24%로 모든 균에서 90% 이상의 높은 저해 활성을 보였다. 또한, 총 플라보노이드 함량이 48시간 발효하였을 때 가장 높은 결과를 보이며 여주 발효음료가 탄수화물 분해 효소 저해 활성과 관련이 있다고 생각된다. 이는 여주의 유산균 발효 과정에서 항당뇨나 비만의 기능을 갖는 유효 성분의 활성이 증가하거나 흡수 또는 추출이 용이한 형태로 전환된 것이라 생각된다. Kim 등(33)은 쓴맛을 가진 메밀을 다양

한 용매로 추출한 후 α -glucosidase 저해 활성을 측정 한 결과, 저해 활성에 관여하는 물질이 rutin과 quercetin 등의 플라보노이드 성분이라 추측하였다. Nam과 Kim(13)은 4 mg/mL의 농도에서 여주 열수 추출물의 α -glucosidase 저해 활성이 52.84%, 에탄올 추출물은 72.89%라고 하였다. 따라서 α -amylase와 α -glucosidase 활성이 모두 높아 식후 혈당 상승을 효과적으로 억제할 수 있으나 분해되지 않은 복합 탄수화물들의 장내 이행으로 인한 복부 팽만감이나 통증 등 부작용의 가능성도 존재할 수 있을 것이라고 생각된다(34).

Lipase 저해 활성

여주 유산균 발효음료의 lipase 저해 활성은 Table 4와 같다. 초기 여주 발효음료의 lipase 저해 활성은 16.17~20.41%이며 48시간 발효 후 45.05~54.52%로 높아졌다. LPL은 54.42%로 가장 높은 저해 활성을 보였으며, LRE는 51.94%, LPA는 49.44%, LRH는 45.05% 순이었다. Ado 등(35)의 연구에서 여주 메탄올 추출물의 lipase 저해 활성은 83.6%였다. 또한, 지질분해효소 저해물질을 함유한 약용 식물에 관한 Lee 등(36)의 연구에서 도라지는 lipase 활성을 44.5%, 구기자 20.0~47.8% 저해하였다는 보고가 있다. 지방질 가수분해 효소인 lipase는 triglyceride의 에스테르 결합을 가수분해하여 monoglyceride와 fatty acid로 분해되고 이는 담즙산염과 미셀을 형성해서 흡수된다. 흡수된 지방산은 소장 상피세포에서 triglyceride로 재합성되어 순환혈액 속에 들어가고 간장이나 지방조직, 근육 등으로 보내져 사용되고 남은 triglyceride는 각 조직에 축적된다(12). 이때 지방의 축적이 과도하면 비만을 초래할 수 있으나 lipase의 활성 저해를 통해 지방이 체내에 소화, 흡수되지 않고 체외로 배설되게 함으로써 지방의 축적을 막을 수 있다. 영양소의 소화나 흡수를 저해하거나 식욕을 저해함으로써 체중을 조절하는 의약품으로 orlistat, acarbose, miglitol, voglibose 등이 있으며 혈당 조절제도 비만 억제 수단으로 개발되어 있다(12). 특히 현재 시판 중인 비만치료제 or-

Table 4. Changes in lipase activity in the fermented *Momordica charantia* L. juices

	0 h	24 h	48 h	72 h
LRE ¹⁾	16.17±0.96 ^{bc2)}	50.35±6.18 ^{aAB}	51.94±5.50 ^{aA}	39.49±2.85 ^{aB}
LRH	16.94±0.92 ^{bb}	46.33±6.92 ^{abA}	45.05±6.79 ^{aA}	34.61±7.19 ^{aA}
LPA	20.41±0.76 ^{ab}	27.11±5.96 ^{cb}	49.44±5.12 ^{aA}	46.72±9.13 ^{aA}
LPL	17.54±0.40 ^{bb}	32.00±5.60 ^{bcB}	54.52±6.50 ^{aA}	29.25±7.95 ^{aB}

¹⁾*M. charantia* L. juice fermented by *L. reuteri* (LRE), *L. rhamnosus* (LRH), *L. paracasei* (LPA), *L. plantarum* (LPL).

²⁾Mean±standard deviation of three replicates; Means with different letters in a column (a-c) and a row (A-C) are significantly different at *P*<0.05 by Tukey's multiple range test.

listat는 triglyceride를 분해하는 췌장의 지방분해 효소인 lipase에 비가역적인 결합을 하여 지방분해 효소를 불활성화시킴으로써 triglyceride 및 cholesterol의 흡수를 감소 시킴과 동시에 배설시키는 기작으로 항비만 작용을 하지만 복부고통, 설사 등의 부작용이 있어 이러한 부작용이 없는 천연 항비만 소재 개발을 위한 연구가 지속하고 있다(37). 탄수화물과 지질 가수분해 효소의 저해 작용이 모두 우수한 여주 유산균 발효음료는 당뇨와 비만의 예방과 치료를 위한 우수한 후보가 될 수 있을 것이라 생각된다.

항산화 활성

여주 유산균 발효음료의 DPPH 라디칼 소거 활성과 FRAP 활성은 Table 5와 같다. Free radical은 생체 내의 산화적 스트레스에 의해 생성되는데 이는 세포의 구성성분과 강하게 반응하여 세포와 조직에 손상을 가하고 지속적인 DNA 손상을 줌으로써 각종 질병을 유발하게 된다(38). 이처럼 항산화 활성은 항균, 항염증, 피부 미백 등 다양한 활성과 관련성을 가지고 있으며 이외에도 각종 성인병 및 노화 촉진 등의 생물학적 손상의 주요 요인이 되는 활성산소를 제거하는 항산화제에 관한 많은 연구가 보고되었다(39).

초기 여주 발효음료의 DPPH 라디칼 소거 활성은 54.75~57.73%였으나 48시간 발효 후 62.12~75.07%로 증가하였으며, LRE는 75.07%, LRH는 74.61%, LPL은 65.00%, LPA는 62.12% 순이었다. Go(40)는 여주를 물로 추출하였을 때 DPPH 라디칼 소거 활성이 41.94%였고, 메탄올로 추

출하였을 때는 79.31%였다고 보고하였고, Cheon(30)의 연구에서는 여주 물 추출물을 *L. casei*로 발효한 후 DPPH 라디칼 소거 활성이 2.7% 증가하였으나 개뽕쥬, 신선초 추출물은 발효를 통하여 오히려 감소하는 경향을 보였다.

여주를 *Lactobacillus*로 발효한 후 24시간 내에 FRAP 활성은 크게 증가하였다. 초기 여주 발효음료의 FRAP 활성은 309.48~372.23 mg FeSO₄·7H₂O equivalent/g이었으나 48시간 발효 후에 590.49~711.87 mg FeSO₄·7H₂O equivalent/g으로 값이 증가하였다. LRE는 72시간 발효 후 가장 높은 FRAP 활성(750.78 mg FeSO₄·7H₂O equivalent/g)을 보였으며, LRH는 48시간 발효 후 951.76 mg FeSO₄·7H₂O equivalent/g으로 가장 높았다. LPA와 LPL은 24시간 후 723.32 mg FeSO₄·7H₂O equivalent/g과 744.77 mg FeSO₄·7H₂O equivalent/g으로 가장 높은 활성을 보였으며 72시간 동안 유지하는 경향을 보였다. Kubola와 Siriamornpun(15)은 여주 메탄올 추출물을 분석한 결과 항산화 활성을 나타낸다고 알려진 gallic acid, p-coumaric acid, benzoic acid 등이 검출되었으며, 특히 열매에서 gallic acid가 가장 많이 검출되었다고 보고하였다. Lee 등(41)은 연근과 도라지 당 추출물을 *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*로 각각 발효한 결과 도라지 당 추출물을 *L. delbrueckii*로 발효한 군에서만 FRAP 활성이 증가하여 집중균에 따라 항산화 물질의 생성 정도가 다를 수 있다. 연근 추출물은 유산균 발효가 FRAP 활성을 오히려 유의적으로 감소하는 경향을 보였다. 본 연구에서는 여주 유산균

Table 5. Changes in DPPH scavenging activity and FRAP activity in the fermented *Momordica charantia* L. juices

	0 h	24 h	48 h	72 h
DPPH scavenging activity (%)				
LRE ¹⁾	54.75±0.98 ^{ab2)}	58.55±1.46 ^{bb}	75.07±1.91 ^{aA}	58.47±2.99 ^{aB}
LRH	55.81±4.72 ^{ab}	60.91±2.61 ^{abB}	74.61±3.15 ^{aA}	63.65±3.23 ^{aB}
LPA	56.42±0.92 ^{ab}	65.32±2.88 ^{aA}	62.12±2.69 ^{bbB}	63.70±4.93 ^{aAB}
LPL	57.73±0.05 ^{ab}	62.88±1.34 ^{abA}	65.00±0.47 ^{bbA}	59.61±1.06 ^{aB}
FRAP activity (mg FeSO ₄ ·7H ₂ O equivalent/g)				
LRE	333.75±47.07 ^{aC}	658.54±37.84 ^{aAB}	590.49±29.96 ^{cb}	750.78±81.53 ^{aA}
LRH	309.48±17.02 ^{aC}	754.55±77.58 ^{aB}	951.76±26.63 ^{aA}	640.42±100.14 ^{aB}
LPA	346.29±26.49 ^{ab}	723.32±35.79 ^{aA}	711.87±34.94 ^{ba}	654.19±37.29 ^{aA}
LPL	372.23±43.29 ^{ab}	744.77±45.31 ^{aA}	648.25±4.68 ^{bcA}	634.99±67.02 ^{aA}

¹⁾*M. charantia* L. juice fermented by *L. reuteri* (LRE), *L. rhamnosus* (LRH), *L. paracasei* (LPA), *L. plantarum* (LPL).

²⁾Mean±standard deviation of three replicates; Means with different letters in a column (a-c) and a row (A-C) are significantly different at *P*<0.05 by Tukey's multiple range test.

발효음료의 환원력이 초기 여주 발효음료보다 높았기에 전자 환원력을 갖는 항산화 성분 함량도 높을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 다양한 생리활성 기능을 가지고 있는 여주 (*Momordica charantia* L.)와 유산균의 기능성을 이용하여 건강 기능성을 갖춘 발효 음료를 개발하고자 하였다. 따라서 여주에 *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*를 각각 접종하여 여주 유산균 발효음료를 제조하고 이들의 항산화 활성 및 소화효소 억제 효과를 연구하였다. 여주 유산균 발효음료의 pH는 24시간 발효 후 감소하였으나 총산 함량은 발효시간이 진행될수록 꾸준히 증가하였다. 총 페놀 함량은 발효시간에 따른 유의적인 차이가 없었으나 총 플라보노이드 함량은 48시간 발효 후 모든 군에서 유의적으로 가장 높은 값을 나타냈다. 또한, 모든 발효음료군에서 48시간 발효 후의 α -glucosidase 저해 활성은 91.24~95.05%로 높았으나 α -amylase의 저해 활성은 14.21~19.00%로 낮았다. DPPH 라디칼 소거 활성과 FRAP 활성 모두 여주 분말 첨가량에 따라 증가하였고, 이에 따라 여주 유산균 발효음료의 프로바이오틱 효과와 탄수화물 분해효소 저해 활성 및 항산화 활성이 우수함을 확인하였으며 향후 이들이 기능성 음료로서의 이용 가능성이 높을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 농림축산식품부 농업연구센터(ARC, Agriculture Research Center)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim TH. 2016. 2017 *Industry outlook: food and beverage*. IBKv (Industrial Bank of Korea) Investment Securities Research Center, Seoul, Korea. p 3-12.
- Um IY, Kim SY, Jeon HJ. 2012 Fermented beverage industry trend report. <https://www.fact.or.kr/action.do?action=farmtech%24view&seq=613&searchtext=%EB%B0%9C%ED%9A%A8%EC%9D%8C%EB%A3%8C&page=1> (accessed Jul 2017).
- Han SY, Yeo SH, Jeong ST, Choi HS, Baek SY, Park HY. 2012. Status and prospect of plant fermented liquid in Korea. *Food Science and Industry* 45(3): 31-43.
- Korea Food Industry Association (KFIA). 2013. Processed food subdivision market status. www.kfia.or.kr/kfia/sub.php?menukey=172 (accessed Jul 2017).
- Kim JS, Ha TY, Ahn JY, Kim HK, Kim S. 2008. Composition and quantitative analysis of stilbenoids in mulberry (*Morus alba* L.) leaves and fruits with DAD/UV HPLC. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 124-128.
- Kwon HJ, Park CS. 2008. Biological activities of extracts from *Omija* (*Schizandra chinensis* Baillon). *Korean J Food Preserv* 15: 587-592.
- Jung HK, Kim ER, Yae HS, Choi SJ, Jung JY, Juhn SL. 2000. Cholesterol-lowering effect of lactic acid bacteria and fermented milks as probiotic functional foods. *Food Industry and Nutrition* 5(2): 29-35.
- Yeo MH, Kim DM, Kim YH, Kim JH, Baek H, Chung MJ. 2008. Antitumor activity of CBT-AK5 purified from *Lactobacillus casei* against Sarcoma-180 infected ICR mice. *Korean J Dairy Sci Technol* 26: 23-30.
- Lee Y, Chang HC. 2008. Isolation and characterization of kimchi lactic acid bacteria showing anti-*Helicobacter pylori* activity. *Kor J Microbiol Biotechnol* 36: 106-114.
- Yang HS, Choi YJ, Oh HH, Moon JS, Jung HK, Kim KJ, Choi BS, Lee JW, Huh CK. 2014. Antioxidative activity of mushroom water extracts fermented by lactic acid bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 80-85.
- Adolfsson O, Meydani SN, Russell RM. 2004. Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr* 80: 245-256.
- Kim HY, Lim SH, Park YH, Ham HJ, Lee KJ, Park DS, Kim KH, Kim S. 2011. Screening of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity with Gangwon-do wild plants extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 308-315.
- Nam SW, Kim M. 2015. A study on inhibitory activities on carbohydrase and anti-inflammatory activities of hot-water and ethanol extracts from immature dried bitter melon (*Momordica charantia* L.). *J East Asian Soc Diet Life* 25: 999-1006.
- Lee SY, Eom SH, Kim YK, Park NI, Park SU. 2009. Cucurbitane-type triterpenoids in *Momordica charantia* Linn. *J Med Plants Res* 3: 1264-1269.
- Kubola J, Siriamornpun S. 2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*. *Food Chem* 110: 881-890.
- Subratty AH, Gurib-Fakim A, Mahomoodally F. 2005. Bitter melon: an exotic vegetable with medicinal values. *Food Sci Nutr* 35: 143-147.
- Roopashree TS, Dang R, Rani RHS, Narendra C. 2008. Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. *Int J Appl Res Nat Prod* 1: 20-28.
- Braca A, Siciliano T, D'Arrigo M, Germanò MP. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. *Fitoterapia* 79: 123-125.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
- Gao H, Kawabata J. 2005. α -Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. Part 3: Synthesis and evaluation of 2,3,4-trihydroxybenzoyl-containing flavonoid analogs and 6-aminoflavones as α -glucosidase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 13: 1661-1671.
- Adisakwattana S, Sookkongwaree K, Roengsumran S, Petsom A, Ngamrojnavanich N, Chavasiri W, Deesamer S, Yibchok-anun S. 2004. Structure-activity relationships of trans-cinnamic acid derivatives on α -glucosidase inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 2893-2896.
- Dolenc A, Govedarica B, Dreu R, Kocbek P, Srcic S, Kristl J. 2010. Nanosized particles of orlistat with enhanced *in vitro* dissolution rate and lipase inhibition. *Int J Pharm* 396: 149-155.
- Folin O, Denis W. 1915. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J Biol Chem* 22: 305-308.

24. Woisky RG, Salatino A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res* 37: 99-105.
25. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
26. Benzie IF, Strain JJ. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299: 15-27.
27. Kim NJ, Jang HL, Yoon KY. 2012. Potato juice fermented with *Lactobacillus casei* as a probiotic functional beverage. *Food Sci Biotechnol* 21: 1301-1307.
28. Yoon KY, Woodams EE, Hang YD. 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresour Technol* 97: 1427-1430.
29. Hahn YS. 2003. Effect of salt type and concentration on the growth of *Lactobacillus* isolated from kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 35: 743-747.
30. Cheon KH. 2016. A study of fermentation from *Artemisia annua*, *Monordica charantia* and *Angelica keiskei* extracted using *Lactobacillus* sp.. *MS Thesis*. Chonnam National University, Gwangju, Korea.
31. Lee DH, Hong JH. 2016. Physicochemical properties and antioxidant activities of fermented mulberry by lactic acid bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 202-208.
32. Kim JH, Lee SY, Kwon OJ, Park JH, Lee JY. 2013. Anti-aging and anti-diabetes effects of *Aconitum pseudo-laeve* var. *erectum* extracts. *J Life Sci* 23: 616-621.
33. Kim JE, Joo S, Seo JH, Lee SP. 2009. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzymes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 989-995.
34. Krentz AJ, Bailey CJ. 2005. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 65: 385-411.
35. Ado MA, Abas F, Mohammed AS, Ghazali HM. 2013. Anti- and pro-lipase activity of selected medicinal, herbal and aquatic plants, and structure elucidation of an anti-lipase compound. *Molecules* 18: 14651-14669.
36. Lee HJ, Moon JH, Lee WM, Lee SG, Kim AK, Woo YH, Park DK. 2012. Charantin contents and fruit characteristics of bitter melon (*Momordica charantia* L.) accessions. *J Bio-Environment Control* 21: 379-384.
37. Cooke D, Bloom S. 2006. The obesity pipeline: current strategies in the development of anti-obesity drugs. *Nat Rev Drug Discov* 5: 919-931.
38. Yang SO, Kim SH, Cho S, Lee J, Kim YS, Yun SS, Choi HK. 2009. Classification of fermented soymilk during fermentation by ¹H NMR coupled with principal component analysis and elucidation of free-radical scavenging activities. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 1184-1188.
39. Boo HO, Lee HH, Lee JW, Hwang SJ, Park SU. 2009. Different of total phenolics and flavonoids, radical scavenging activities and nitrite scavenging effects of *Momordica charantia* L. according to cultivars. *Korean J Med Crop Sci* 17: 15-20.
40. Go MJ. 2010. Biological activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) extracts. *MS Thesis*. University of Daejin, Gyeonggi, Korea.
41. Lee KS, Kim JN, Chung HC. 2015. Study on anti-oxidative activities and beverage preferences relating to fermented lotus root and *Platycodon grandiflorum* extracts with sugar through lactic acid fermentation. *J East Asian Soc Diet Life* 25: 183-192.