

Total Polyphenol Contents, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Roasted-flaxseed Extracts Based on Lactic-acid Bacteria Fermentation

Ye-Eun Park¹, Byung-Hyuk Kim¹, Yeo-Cho Yoon^{1,2}, Jung-Kyu Kim^{1,2}, Jun-Hyeong Lee^{1,2}, Gi-Seok Kwon^{2*}, Hak Soo Hwang³ and Jung-Bok Lee^{1*}

¹BHNBIO, Institute for Developments of BioIndustrial-Materials, #201, Industry-academic cooperation Building, Andong National University 1375 Gyeongdongro, Andong 36729, Gyeongbuk, Korea

²Department of Medicinal Plant Resources, Andong National University, Andong 36729, Korea

³Kyochon F&B, 114-10, Wondong, Osan-si, Gyeonggi-do 27850, Korea

Received November 20, 2017 / Revised April 23, 2018 / Accepted May 3, 2018

Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.), also called linseed and one of the raw materials for making linen, is rich in omega-3 fatty acids, vegetable estrogen, α -linolenic acid, and dietary fiber. Studies on flaxseed have reported various additional effects, such as the inhibition of cholesterol, blood clotting, and tumor growth. In this study, we investigated the functional components of flaxseed fermented with lactic-acid bacteria. Lactic-acid bacteria was inoculated into heat-treated (roasted) flaxseed and fermented at 37°C for 72 hr. The fermented flaxseed was extracted with 70% ethanol and the antioxidant effect of the fermented extracts according to the lactic-acid bacteria was analyzed. It was confirmed that the total polyphenol contents had expanded by about 1.5-8 times, and the total flavonoid contents had increased around 1.2 times in the case of fermented flaxseed with lactic-acid bacteria compared to non-fermented flaxseed (NFFS). DPPH radical scavenging and superoxide dismutase-like activities had increased around 5.6 and 2.3 times, respectively, in the fermented flaxseed compared to the NFFS at 100 ppm concentration. The study concluded that fermentation of flaxseed with lactic-acid bacteria is possible and that it is effective to increase the antioxidant effects of flaxseed. These results can be applied to the development of improved foods and cosmetic materials.

Key words : Antioxidant, fermentation, flaxseed, lactic acid bacteria, *Linum usitatissimum* L.

서 론

최근 전세계적으로 고령화 사회로 진입함에 따라, 현대인들은 건강에 대한 욕구와 관심이 증가하고 있다. 주거와 식생활 모든 분야에서 소비자의 기호가 고급화되고 다양화되어 기능성이 부가된 새로운 제품의 개발이 증가하고 있다[23]. 특히 건강한 노년을 위한 제품과 서비스에 대한 관심이 증대되어 항노화와 항산화 관련 분야의 수요 또한 꾸준히 성장하고 있다[16]. 그에 따라 슈퍼푸드라고 불리는 저열량, 저지방이며 다양한 파이토케미컬을 함유한 다양한 식재료들이 많은 관심을 받고 있다. 대표적인 슈퍼푸드에는 마늘, 브로콜리, 아몬드, 블루베리 등이 있으며, 그 중에도 생명의 시작이라고 하는 씨

앗이 대중의 주목을 받으며 ‘슈퍼씨앗’이라 불리고 있다. 대표적인 슈퍼씨앗에는 아마씨(Flaxseed), 치아씨(Chiaseed), 헴프씨(Hempseed)가 있는데, 본 연구에서는 지구상 가장 강력한 식물이란 별명을 가진 아마씨의 특성에 주목하였다[22].

아마씨(*Linum usitatissimum* L., Flaxseed)는 아마과(Linaceae) 식물의 종자로, 중앙아시아 고산지대가 원산지이며 천연 항산화제 및 항암 물질로 알려진 리그난(lignan)을 함유하고 있다[5, 7, 25, 31]. 아마는 예로부터 옷감, 직물 등을 만드는 데 주로 사용되었으며, 동의보감에 따르면 아마는 피부와 뼈 건강에 탁월하고 대변 장애, 항염 및 부인병에 약제로 사용되었다고 전해진다[5, 7, 15, 25, 31]. 뿐만 아니라 식물성 에스트로겐인 리그난을 함유하고 있어 호르몬 관련 질병의 예방 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 오메가-3 지방산, 토크페놀, 미네랄 및 엽산 등 다양한 성분을 함유하고 있어 암 발생 및 증식의 억제, 항산화 및 항암효과가 있다고 보고되기 때문에 슈퍼 푸드로 관심을 받고 있다[7, 17, 31]. 또한, 식이섬유를 약 28% 함유하고 있어 혈중 콜레스테롤과 포도당 수치를 낮추는 역할을 하며, 그 외에 면역계, 심혈관계, 대사증후군, 당뇨 관련 질병의 치료 및 예방효과, 신진대사 촉진으로 인해 다이어트, 지능 향상 등에도 효과적인 재료로 알려져 있다[5, 25, 31].

*Corresponding authors

Tel : +82-54-822-8972, Fax : +82-54-822-8973

E-mail : bio91@bhnbio.com (Jung-Bok Lee)

Tel : +82-54-820-590, Fax : +82-54-820-6252

E-mail : gskwon@andong.ac.kr (Gi-Seok Kwon)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

식물계에 널리 분포되어 있는 폴리페놀, 플라보노이드, 토코페롤 등은 항산화 물질로서 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS)의 발생 및 작용을 억제하여 성인병을 예방하고 노화의 방지와 지연에 효과가 있다고 알려져 있다[10, 18, 23, 27]. 현재 폴리페놀과 플라보노이드가 가지는 기능성과 이와 관련된 연구 보고가 많이 있으며, 최근에는 이미 연구된 과일과 채소를 비롯한 다양한 식물을 이용하거나, 다른 생물전환 공정을 통해 개발된 식물자원의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, 효능 분석에 대한 연구가 진행되고 있다[4, 16, 26].

최근 아마씨의 기능성이 알려지며 유효 성분과 생리활성물질에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있으며, 식품첨가물과 건강기능식품 등의 형태로 응용되고 있다[22]. 유럽과 북미에서는 성스러운 씨앗으로 알려져 다양한 식품 소재로 개발되어 있지만, 우리나라의 경우 아마 및 아마씨에 대한 인식과 도입이 늦어 이에 대한 적용 분야와 관련 연구가 미비하며, 특히 발효를 통한 기능성 및 생리활성 성분의 변화에 대한 연구는 매우 부족하다[17, 31].

한편 유산균(Lactic acid bacteria)은 소화에 도움을 주며 장 질환을 억제하며 면역력 증가에 효과적이다[11, 28]. 유산균을 이용한 유산발효는 부패를 방지하고 항균물질을 방출하여 부패균에 의한 독성물질의 억제 및 분해, 장내 유해균 억제와 유익균 유지 및 증가를 유도하여 면역증강작용, 유당분해 등의 효과를 주는 것으로 알려져 있다. 또한 천연물의 유효 활성 성분 및 생리활성의 증가를 목적으로 유산균 발효를 활용한 다양한 연구들이 진행되고 있다[3, 9, 13].

따라서 본 연구에서는 유산균을 이용하여 아마씨의 유산발효 가능 여부를 확인하고, 유산균 발효 아마씨의 총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량, 그리고 항산화 활성의 변화를 측정함으로써 유산발효가 아마씨의 항산화 활성에 미치는 영향과 천연물 기반 기능성 물질 개발의 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기

본 연구에서 사용된 아마씨(Flaxseed)는 동명홍삼에서 판매되고 있는 볶음 아마씨를 구매하여 사용하였다. 아마씨의 유효 성분들의 효과적인 추출을 위해 막자 사발을 이용하여 분쇄 후, 사용하였다. Sodium carbonate, Folin-ciocalteu reagent, Gallic acid, Sodium nitrite, Aluminum Chloride Hexahydrate, Sodium Hydroxide, Rutin, 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH), ascorbic acid, Aluminum chloride hexahydrate, Tris-HCl, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Pyrogallol 등의 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 사의 것을 구입하여 사용하였다. 각 테스트의 흡광도 측정을 위한 ELISA microplate reader는 SpectraMaz M2 Microplate

readers (Molecular devices, USA)를 사용하였다.

발효 방법 및 사용 유산균

아마씨의 발효를 위해 사용된 유산균은 국내 김치로부터 분리 및 동정한 *Lactobacillus brevis* BHN-31, BHN-126, 젓갈로부터 분리 및 동정한 *Pediococcus pentosaceus* BHN-41과 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, Daejeon, Korea)에서 분양 받은 *Lactobacillus casei* KCTC 310를 사용하였다(Fig. 1). 이 4종의 균주는 본 연구소에서 보유중인 40여종 균주 중 paper disc법을 통한 활성 확인 후 선택하였다. 유산균은 모두 MRS 배지(Difco Laboratories Inc., St. Detroit, MI, USA)에서 배양하여 실험에 사용하였으며, 각 조건 마다 아마씨 40 g, 유산균 배양액은 15 ml 접종하여 37°C에서 7일간 발효하였다. 발효 된 아마씨는 70% ethanol에 3일 간 침지하여 추출을 진행하였으며, 추출 후에 filter paper로 여과하고 rotary evaporator (N-1100 and N-1000, EYELA Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 감압 농축하고 동결 건조하여 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

발효 미생물 총 생균수 변화 분석

발효 유산균과 발효중인 아마씨를 각각 1 g을 취하여 생리 식염수로 희석하고, MRS agar (Difco, USA) 배지에 도말하였다. 발효유산균이 도말된 배지는 37°C incubator에서 2일간 배양한 후 생균수(CFU, colony forming unit)를 측정하였다.

총 폴리페놀 함량의 측정

총 폴리페놀 함량의 측정은 folin-denis [29] 방법에 따라 측정하였다. 볶은 아마씨의 발효 추출물을 100 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 각 시험 물질을 10 ul 취하여 10% sodium carbonate (Na_2CO_3) 200 ul, 50% folin-ciocalteu reagent 10 ul를 혼합하여 상온에서 30분간 반응 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준 물질로 사용하여 얻어진 표준 곡선으로부터 총 폴리페놀 함량(ug Gallic acid equivalent/100 g)을 계산하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량의 측정은 flavonoid에 알칼리를 작용시켜 측정하였다[33]. 100 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도로 희석한 각 시험 물질을 20 ul 취하여 70% ethanol 80 ul, 5% sodium nitrite (NaNO_2) 6 ul와 혼합하여 5분간 상온에서 반응한 후, 10% aluminum chloride hexahydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 12 ul를 첨가하여 상온에서 6분간 반응하였다. 1 N sodium hydroxide (NaOH) 40 ul를 첨가하고 11분간 배양하여 반응을 종료하고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Rutin을 표준 물질로 사용하여 표준 곡선을 작성하고 이를 따라 총 플라보노이드 함량(ug Rutin equivalent/100 g)을 계산하였다.

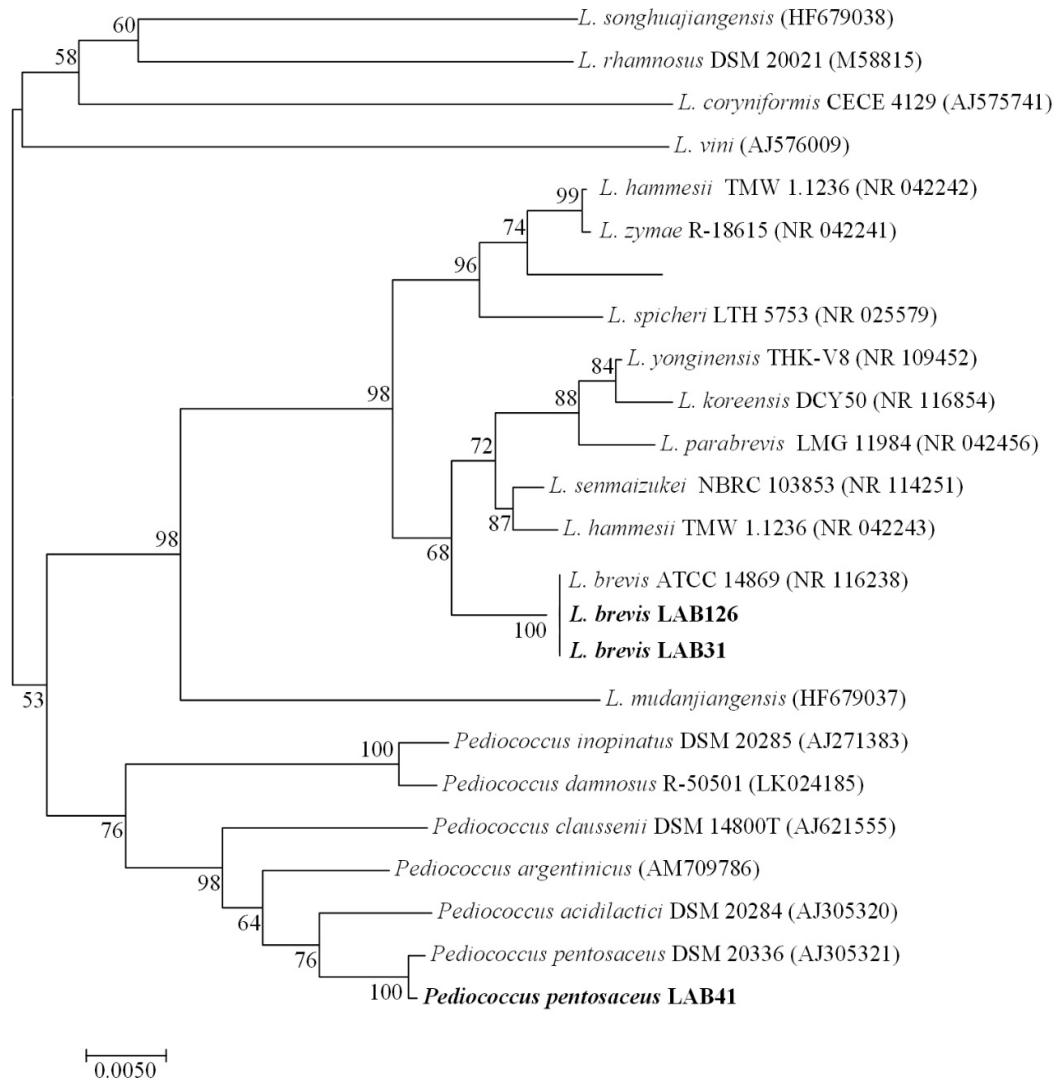


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the isolated BHN-LAB 31, 41, 126 and related bacteria of the Lactobacillus group based on 16S rRNA gene sequence comparisons. The sequences of isolated strains were compared with available from the GenBank database.

DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성능 측정

추출물의 DPPH radical 소거 활성능 측정은 Blois의 방법 [2]에 준하여 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)에 대한 수소 공여 효과로 측정하였다. DPPH는 빛을 차단한 상태에서 99% ethanol을 이용하여 2 mM 농도가 되도록 희석하여 사용하였다. 각 시험 물질 20 ul에 DPPH solution 180 ul를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시험 물질을 첨가한 실험 군과 첨가하지 않은 군의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD 유사 활성 측정은 Marklund [19]의 방법에 준하여 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매 하는 pyrogallol의

생성량을 측정하여 나타내었다. Tris-HCl buffer (50 mM Tris-hydroxymethyl aminomethane in 10 mM EDTA, pH 8.5) 130 ul을 준비하여 100 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도로 희석한 각 시험 물질을 10 ul 첨가한 후 7.2 mM pyrogallol 10 ul와 혼합하여 10분간 상온에서 반응하였다. 1 N HCl 10 ul를 첨가하여 반응을 정지시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 활성도는 시험 물질을 첨가한 실험 군과 첨가하지 않은 군의 흡광도 감소율을 백분율로 나타내었다.

통계 분석

모든 실험은 3회 반복 측정하여 means ± standard로 나타내었으며 통계 분석은 SPSS (SPSS Inc., Armonk, NY, USA)를 이용하여 각 추출물 간의 유의성을 검증하였다. 유의성은 p<0.01, p<0.05 수준에서 Duncan의 다중 검증법(Duncan's

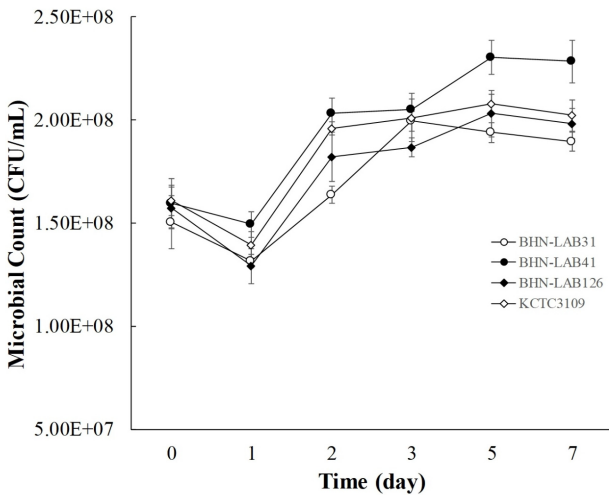


Fig. 2. Change in total viable bacteria of Flaxseed with lactobacillus during fermentation.

multiple range test)에 따라 분석하였다.

결 과

발효 미생물 총 생균수 변화 분석

발효 진행 중에 시간 별로 총 생균수를 측정한 결과는 Fig. 2에서 보이는 것과 같이 발효 도입 시 총 생균수는 평균 1.57×10^8 cfu/ml이었으며, 1일차까지 점차적으로 감소하다가 2일차부터 생균수가 증가되는 양상을 보였다. 5일차에 총 생균수가 최고에 도달하였으며, 그 이후로는 생균수가 미약하게 감소하며 크게 변동하지 않는 모습을 보였다. 이로써 7일차에 아마씨의 발효를 종료하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

과일 및 엽채류 등 식물에 풍부하게 함유되어 있는 폴리페놀류 화합물은 분자 내에 다량의 히드록실기(-OH)를 함유하여 항산화 효과뿐만 아니라 항암, 콜레스테롤 저해, 정장 작용

등 다양한 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다[12, 16, 26]. 페놀성 화합물 분자 내 Phenolic hydroxyl기가 효소 단백질 등 큰 분자들과 수소를 공유하며 결합하기 때문에 활성산소종을 효과적으로 제거해주면서 산화 및 노화 억제 기능을 하며, 플라보노이드는 폴리페놀계 화합물 중 하나로 역시 항산화 활성뿐만 아니라 다양한 생리활성 기능을 한다고 알려져 있다[6, 16, 30].

아마씨 발효 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 비 발효 아마씨(NFFS) 추출물은 100 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도에서 각각 22.75 ± 0.50 ug/100 g, 39.33 ± 0.38 ug/100 g, 74.58 ± 6.58 ug/100 g의 값을 보였고, 유산균 발효 아마씨 추출물은 전반적으로 NFFS보다 약 1.5~8배 증가된 결과를 보였다. 총 플라보노이드 함량 측정의 결과는 Table 2와 같다. NFFS는 100 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도에서 38.06 ± 0.69 ug/100 g, 47.94 ± 1.50 ug/100 g, 61.67 ± 1.88 ug/100 g의 값을 보였으며, 유산균 발효 아마씨 추출물은 NFFS보다 전반적으로 약 1.2배 증가된 결과를 보였다.

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성능 측정

DPPH radical 소거활성능은 활성 radical에 전자 또는 수소를 공여하여 free radical의 활성을 저해시키는 원리로 활성 산소를 억제시키는 능력을 의미한다. DPPH는 free radical 상태에서 보라색을 띠며, 항산화 물질로부터 전자 또는 수소를 얻어 non-radical로 환원이 되면 노란색의 DPPH로 전환된다. 이때 보라색이 노란색으로 탈색되는 정도를 측정하여 항산화능을 확인하는 방법이다. DPPH가 온도, pH 그리고 빛에 민감한 것이 단점으로 알려져 있지만, DPPH radical 소거활성 측정법은 천연물 추출물의 항산화 활성 측정의 한 방법으로 널리 사용되고 있다[8, 23, 27].

아마씨 발효 추출물의 DPPH radical 소거활성능을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 양성 대조군인 ascorbic acid에 비해 낮은 활성을 보였지만, NFFS와 발효 아마씨를 비교한 결과는

Table. 1. Total polyphenol contents of extracts from fermented flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) with Lactic acid bacteria, Total polyphenol contents (ug/100 g) of fermentation flaxseed based on gallic acid as standard. NFFS; Non-Fermented Flaxseed

	NFFS	<i>L. brevis</i> BHN-31	<i>L. brevis</i> BHN-126	<i>P. pentosaceus</i> BHN-41	<i>L. casei</i> KCTC3109
100 ppm	22.75±0.50	28.50±2.38	36.67±4.45	40.75±4.34	30.41±2.88
500 ppm	39.33±0.38	67.16±11.90	67.00±4.27	51.41±9.81	66.41±9.61
1,000 ppm	74.58±0.58	114.5±14.60	141.00±39.72	148.83±21.72	155.00±15.76

Table. 2. Total flavonoid contents of extracts from fermented flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) with Lactic acid bacteria. Total flavonoid contents (ug/100 g) of fermentation flaxseed based on rutin as standard. NFFS; Non-Fermented Flaxseed

	NFFS	<i>L. brevis</i> BHN-31	<i>L. brevis</i> BHN-126	<i>P. pentosaceus</i> BHN-41	<i>L. casei</i> KCTC3109
100 ppm	38.05±0.69	44.06±2.41	47.50±3.55	45.11±2.42	43.72±2.11
500 ppm	47.94±1.50	54.89±2.94	64.44±2.04	62.56±2.33	56.61±1.25
1,000 ppm	61.67±1.88	70.72±2.83	81.56±5.11	76.39±3.40	71.11±1.99

유의적인 차이를 보였다. NFFS 추출물은 농도가 100 ppm일 때 1.27±0.77%, 각 유산균을 이용한 발효 아마씨 추출물은 농도가 100 ppm일 때 8.7±3.96%, 8.41±1.67%, 3.60±2.10%, 7.92±4.36%로 비 발효 아마씨와 비교하여 유산균 발효 아마씨가 평균적으로 약 5.6배 증가된 DPPH radical 소거활성능을 보였다. 500 ppm, 1,000 ppm 농도에서는 NFFS가 9.61±0.36%, 21.98±0.51%의 활성을 보였고, 유산균 발효 아마씨는 14~16%, 23~26%의 활성을 보여 각각 1.6배, 1.14배 정도 증가된 것을 확인하였다. 이에 비해 양성 대조군인 ascorbic acid는 500 ppm 농도에서 약 94%의 활성을 보였다.

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD (Superoxide dismutase)는 세포에 유해한 환원 산소종을 과산화수소로 전환시키는 반응($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 촉매 하는 항산화 효소이다. 이 과정에서 생성된 H_2O_2 는 catalase에 의해 물 분자와 산소 분자로 전환되어 산화로부터 생체를 보호하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다[10, 18]. 따라서 이 실험에서는 생체 항산화 방어 기전 중 효소 적 방어 기전의 하나로 superoxide radical을 환원시켜서 생체를 산화와 노화로부터 보호하는 SOD 유사활성 측정을 pyrogallol의 자동 산화 반응을 이용하여 superoxide anion radical 소거 여부를 조사하였다.

아마씨 발효 추출물의 SOD 유사 활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. NFFS 추출물은 100 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도

에 따라 6.95±0.75%, 24.97±2.41%, 70.53±1.77%의 SOD 유사 활성을 보였으며, 유산균 이용 발효 아마씨 추출물은 농도가 100 ppm일 때 각각 18.57±4.27%, 16.59±1.97%, 19.37±4.40%, 11.35±3.42% 활성을 보이며 평균적으로 약 2.3배 증가된 활성을 보였다. 500 ppm, 1,000 ppm 농도에서는 유산균 발효 아마씨 추출물이 약 29~31%, 74~75%의 활성을 보여 각각 1.22배, 1.06배 증가된 결과를 보였다. 전반적인 SOD 유사 활성 결과는 DPPH radical 소거 활성능, 총 폴리페놀함량 측정 결과와 유사하게 유산균 발효 아마씨 추출물이 증가된 양상을 보였다. 양성 대조군인 ascorbic acid는 농도 1,000 ppm에서 약 66%의 SOD 유사 활성을 보였으며, 유산균 발효 아마씨 추출물의 SOD 유사 활성을 통한 항산화 활성이 약 75%로 ascorbic acid보다 높게 측정되어 비교적 높은 SOD 유사활성을 보였다.

고 찰

아마씨는 '생명을 살리는 씨앗'으로 알려진 자생력이 강한 식물로서 오메가-3 지방산과 섬유질, 식물성 에스트로젠인 리그난을 풍부하게 함유한 슈퍼 푸드로 관심을 받고 있다[15]. 볶은 아마씨 등 가공된 씨 자체를 섭취할 뿐만 아니라 아마씨유, 플레이크, 제과제빵 시 첨가물 등의 형태로 다양한 모습으로 가공, 섭취하고 있다[17, 22].

본 연구에서는 시중에 판매중인 볶은 아마씨를 유산균으로 발효 후 70% Ethanol 추출물을 이용하여 총 폴리페놀 함량

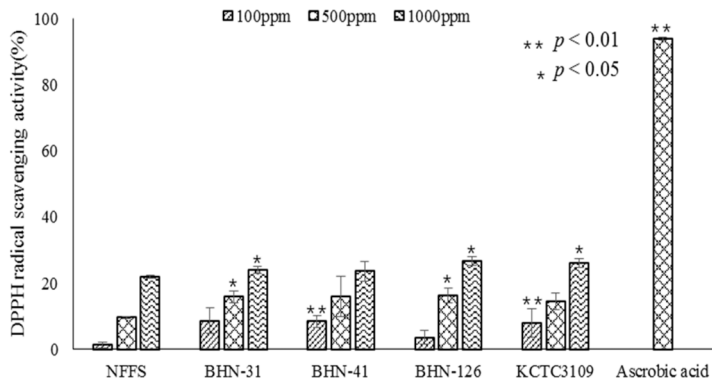


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of extracts from fermented flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) with each Lactic acid bacteria. DPPH radical scavenging activity was measured at 517 nm. Percent scavenging of the DPPH free radical was quantified compared to the control. (NFFS ; Non-fermented flaxseed, BHN-LAB31, 126 ; *Lactobacillus brevis*, BHN-LAB41 ; *Pediococcus pentosaceus*, KCTC 3109 ; *Lactobacillus casei*)

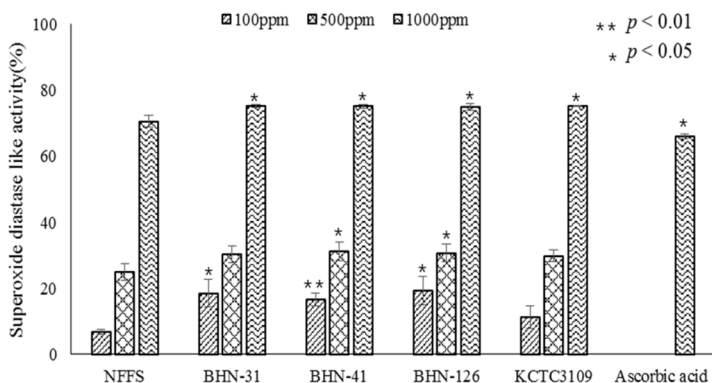


Fig. 4. Superoxide dismutase like activity of extracts from fermented flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) with each Lactic acid bacteria. SOD-like activity was measured at 420 nm. (NFFS ; Non-fermented flaxseed, BHN-LAB31, 126 ; *Lactobacillus brevis*, BHN-LAB41 ; *Pediococcus pentosaceus*, KCTC3109 ; *Lactobacillus casei*)

및 플라보노이드 함량, 항산화 활성(DPPH radical 소거 활성, SOD 유사 활성)을 알아보았다. 그리고 국내 김치 또는 젓갈로부터 서로 다른 3종의 균주를 분리·동정하였고 발효 시간에 따라 미생물 성장속도를 측정하고 이에 따른 발효 아마씨의 생리활성도를 비교·분석하였다. 비 발효 아마씨(NFFS)와 유산균 발효 아마씨의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 변화를 분석하였을 때 폴리페놀은 약 1.5~8배, 플라보노이드는 약 1.2배 증가하였다. 각 시험 물질의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량의 상관관계를 검토하였을 때 상관계수는 0.9221로 두 변인 간 높은 수준의 상관관계를 확인하였다. 따라서 유산균 발효 아마씨의 총 폴리페놀 함량이 높을수록 플라보노이드 함량도 비교적 높은 것으로 사료 된다. 폴리페놀 함량에 비해 플라보노이드 함량의 변화량이 작은 원인은 해당 시험 물질 내에 비플라보노이드계 폴리페놀의 함량의 높기 때문으로 추측되며, Kwon의 보고[15]에 따르면 갈색 아마씨 추출물의 폴리페놀 함량은 29.88±3.25 mg/g으로 참깨와 들깨에 비해서는 약 2배 이상 높은 함량을 보였고 황색 아마씨보다는 약 3배 높은 것으로 나타났다. 이로써 갈색 아마씨 추출물의 산화안정성, 항산화 활성이 뛰어난 것을 확인하였으며, 페놀성 화합물은 가공 공정의 변화와 가열 온도의 증가에 따라 더욱 증가한다는 Kim의 보고[14]를 종합하면, 유산균 발효를 포함한 다양한 가공 공정 변화 또는 가열 온도에 변화를 주어 갈색 아마씨의 건강증진 효능과 기능성 측면의 가치를 부가시킬 수 있을 것으로 판단된다. 또한 아마씨 발효 균주에 따른 생리활성을 측정하여 차이를 보이는 것을 확인하였으며, 향후 균주별 특성과 전처리에 대한 연구를 수행할 예정이다.

DPPH radical 소거활성능은 NFFS에 비해 100 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도에서 각각 5.6배, 1.6배, 1.14배 증가되었으며, SOD 유사활성능은 낮은 농도부터 각각 2.3배, 1.2배, 1.06배 증가하였다. 이는 폴리페놀 함량의 변화와 유사한 경향을 보였으며 전반적으로 유산균 발효 아마씨 추출물의 항산화 활성이 더 우수한 것을 확인하였다. 일반적으로 항산화 활성 및 미백활성은 활성물질의 농도가 증가함에 따라 효능도 증가하지만, 모든 물질이 농도의존적이지는 않다[1]. 갈색 아마씨의 DPPH radical 소거활성능이 10,000 ppm 농도에서 40.96±0.14%, 25,000 ppm 농도에서 77.81±0.61%라는 연구 보고를 통해 유추해볼 때[15], 높은 농도의 유산균 발효 아마씨 추출물을 이용한다면 100%에 가까운 DPPH radical 소거활성능을 보일 것으로 예상된다. Park 등은[22] 아마씨 분말을 첨가하여 스펀지 케이크를 조리하여 케이크의 맛과 외관뿐만 아니라 DPPH radical 소거능, 조직감, 관능검사 등을 실시하였는데 아마씨 분말이 첨가된 스펀지 케이크의 DPPH radical 소거능이 일반 스펀지 케이크보다 약 1.8~3.6배 향상되었다. 아마씨 추출물의 DPPH radical 소거활성능은 양성대조군(ascorbic acid)과 비교하면 작은 값이지만, NFFS보다 유산균 발효 아마씨가 높은 활성을 보인다는 것에 의미가 있으며, 이는 DPPH

radical 소거활성능이 페놀성 물질에 의한 항산화 작용의 지표이고 총 폴리페놀 함량과 높은 상관성을 가진다고 보고된 것과 관련이 있다고 사료된다.

Jung 등[10]은 ethanol의 농도를 달리하여 머루 추출물의 항산화 활성을 확인하였는데, 가장 높은 SOD 유사활성의 보인 추출구(100% ethanol, 1.6 g/dL)에서 46.86±0.91%의 값을 보였다. 본 연구에서 가장 높은 SOD 유사활성을 보인 시험물질(BHN-LAB126, 1,000 ppm)의 결과값은 26.70±1.41%이지만, 머루가 포도과 식물 중 포도나 거봉에 비해 높은 항산화 활성과 resveratrol 함량으로 알려져 있다는 것[10]과 머루 추출물과 유산균 발효 아마씨 추출 시험물질의 농도가 약 16배 차이인 것을 고려한다면, 유산균 발효 아마씨 추출물의 SOD 유사활성능 결과값은 충분히 항산화 기능성 소재로의 가능성을 대변하고 있는 것으로 판단된다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때, 유산균 발효 아마씨 추출물을 섭취, 사용할 때 생체 산화 및 노화 예방, 피부탄력 및 주름 예방뿐만 아니라 암 또는 염증의 예방에도 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다[9, 20, 24, 32].

그러나 본 연구에서 항산화 활성 관련 시험 외에 α -Glucosidase, Tyrosinase, Elastase inhibition activity assay를 통해 해당 당, 미백 활성 등 각 효소의 억제 활성을 확인하였으나, 해당 실험에서는 유산균 발효 아마씨의 효소 억제 활성의 변화 양상을 확인할 수는 없었다. 따라서 유산균을 이용하여 아마씨를 발효시킴으로써 생물전환공정을 통해 항산화 활성과 같은 기능성을 증가시킬 수 있으며, 추후에는 이를 바탕으로 아마씨의 리그난 등 항산화능을 나타내는 물질의 그 효능을 극대화 시키는 생리활성 연구도 진행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 생 아마씨와 볶음 아마씨 사이 식이섬유 함량과 비타민 E, 아미노산 등 유용성분 함량의 차이가 있는 것으로 보아[21], 생 아마씨의 가공 정도나 볶음 아마씨와 혼합을 고려하여 추출한다면 아마씨의 장점을 극대화한 다양하고 새로운 건강기능식품 또는 푸드 코스메틱 소재의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

References

1. Alkan, Y., Haefeli, W., Burhenne, J., Stein, J., Yaniv, I. and Shalit, I. 2004. Voriconazole-induced QT interval prolongation and ventricular tachycardia: a non-concentration-dependent adverse effect. *Clin. Infect. Dis.* **39**, e49-e52.
2. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199.
3. Chang, H. G. and Park, Y. S. 2003. Lactic acid fermentation and biological activities of *Rubus coreanus*. *J. Appl. Biol. Chem.* **46**, 367-375.
4. Halliwell, B., Aeschbach, R., Lölliger, J. and Aruoma, O. 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 601-617.

5. Hosseinian, F. S., Muir, A. D., Westcott, N. D. and Krol, E. S. 2006. Antioxidant capacity of flaxseed lignans in two model systems. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **83**, 835.
6. Hyon, J. S., Kang, S. M., Han, S. W., Kang, M. C., Oh, M. C., Oh, C. K., Kim, D. W., Jeon, Y. J. and Kim, S. H. 2009. Flavonoid component changes and antioxidant activities of fermented *Citrus grandis* Osbeck peel. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 1310-1316.
7. Ibrügger, S., Kristensen, M., Mikkelsen, M. S. and Astrup, A. 2012. Flaxseed dietary fiber supplements for suppression of appetite and food intake. *Appetite* **58**, 490-495.
8. Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H. and Itakura, Y. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.* **60**, 417-420.
9. Jeon, J. M., Choi, S. K., Kim, Y. J., Jang, S. J., Cheon, J. W. and Lee, H. S. 2011. Antioxidant and antiaging effect of ginseng berry extract fermented by lactic acid bacteria. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* **37**, 75-81.
10. Jeong, H. J., Park, S. B., Kim, S. A. and Kim, H. K. 2007. Total polyphenol content and antioxidative activity of wild grape (*Vitis coignetiae*) extracts depending on ethanol concentrations. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 1491-1496.
11. Jun, H. S., Choi, Y. K., Won, Y. S., Hun, B. H. and Kim, J. W. 1999. Effects of lactic acid bacteria on infection of *Salmonella typhimurium* of mouse. *Kor. J. Dairy Sci.* **21**, 171-182.
12. Kim, E. J., Choi, J. Y., Yu, M. R., Kim, M. Y., Lee, S. H. and Lee, B. H. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 337-342.
13. Kim, H. S. and Gilliland, S. E. 1983. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. *J. Dairy Sci.* **66**, 959-966.
14. Kim, H. W. 2000. Studies on the antioxidative compounds of sesame oils with roasting temperature. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**, 246-251.
15. Kwon, O. J. 2016. Characterization of flaxseed and flaxseed oil as edible oil resources. *Kor. J. Food Preserv.* **23**, 547-552.
16. Lee, M. Y., Yoo, M. S., Whang, Y. J., Jin, Y. J., Hong, M. H. and Pyo, Y. H. 2012. Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 540-544.
17. Lim, J. A. and Lee, J. H. 2015. Quality and antioxidant properties of cookies supplemented with black sesame powder. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 1058-1063.
18. Lim, J. D., Cha, H. S., Choung, M. G., Choi, R. N., Choi, D. J. and Youn, A. R. 2014. Antioxidant activities of acidic ethanol extract and the anthocyanin rich fraction from *Aronia melanocarpa*. *Kor. J. Food Cook Sci.* **30**, 573-578.
19. Marklund, S. and Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *FEBS J.* **47**, 469-474.
20. Na, G. M., Han, H. S., Ye, S. H. and Kim, H. K. 2004. Physiological activity of medicinal plant extracts. *Kor. J. Food Preserv.* **11**, 388-393.
21. Nam, J. S. 2010. Studies on the nutritional components and physicochemical characteristics of various flax (*Linum usitatissimum*) seeds and oils. *Kor. J. Food Nutr.* **23**, 516-525.
22. Park, B. G., Lee, S. Y. and Lee, M. H. 2017. Quality and antioxidant properties of sponge cake added with flaxseed powder. *Culinary Science Hospitality Research* **23**, 207-215.
23. Park, G. H., Lee, S. H., Kim, H. Y., Jeong, H. S., Kim, E. Y., Yun, Y. W., Nam, S. Y. and Lee, B. J. 2011. Comparison in antioxidant effects of four citrus fruits. *J. Food Hyg. Saf.* **26**, 355-360.
24. Park, S. H., Lee, S. J., Jeon, M. J., Kim, S. Y., Mun, O. J., Kim, M. H., Kong, C. S., Lee, D. G., Yu, K. H. and Kim, Y. Y. 2014. Evaluation of biological activities of fermented *Hizikia fusiformis* extracts. *J. Life Sci.* **24**, 304-310.
25. Prasad, K. 2005. Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Atherosclerosis* **179**, 269-275.
26. Rice Evans, C., Miller, N. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2**, 152-159.
27. Seo, E. J., Hong, E. S., Choi, M. H., Kim, K. S. and Lee, S. J. 2010. Antioxidant and skin whitening effects of *Rhamnus yoshinoi* extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **42**, 750-754.
28. Shida, K., Makino, K., Morishita, A., Takamizawa, K., Hachimura, S., Ametani, A., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S. and Kaminogawa, S. 1998. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **115**, 278-287.
29. Smeriglio, A., Galati, E. M., Monforte, M. T., Lanuzza, F., D'angelo, V. and Circosta, C. 2016. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of cold-pressed seed oil from finola cultivar of *Cannabis sativa* L. *Phytother Res.* **30**, 1298-1307.
30. Song, H. S., Kim, H. K., Min, H. O., Choi, J. D. and Kim, Y. M. 2011. Changes in physicochemical and sensory properties of *Hizikia fusiforme* water extract by fermentation of lactic acid bacteria. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **44**, 104-110.
31. Thompson, L. U., Rickard, S. E., Orcheson, L. J. and Seidl, M. M. 1996. Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. *J. Carcinog.* **17**, 1373-1376.
32. Woo, J. Y., Paek, N. S. and Kim, Y. M. 2005. Studies on antioxidative effect and lactic acid bacteria growth of per-simmon leaf extracts. *Kor. J. Food Nutr.* **18**, 28-38.
33. Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.

초록 : 유산균 발효에 따른 볶은 아마씨 추출물의 폴리페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화 활성

박예은¹ · 김병혁¹ · 윤여초^{1,2} · 김중규^{1,2} · 이준형^{1,2} · 권기석^{2*} · 황학수³ · 이중복^{1*}

(¹비에이치앤바이오, ²안동대학교 생약자원학과, ³(주)교촌F&B)

아마(*Linum usitatissimum* L.)의 종자인 아마씨(Flaxseed)는 아마인(仁)이라고도 불리며 오메가-3 지방산, 식물성 에스트로젠, 알파-리놀렌산 및 식이섬유가 풍부하게 함유되어 있다. 또한 콜레스테롤 저해, 혈액응고 저해, 종양의 성장 억제 등 다양한 효과에 대한 다양한 연구가 보고 되어있다. 본 연구는 유산균을 이용해 발효한 아마씨의 기능성 성분을 조사하기 위해 가열 처리된(볶은) 아마씨에 4종의 유산균(NFFS ; Non-fermented flaxseed, BHN-LAB31, 126 ; *Lactobacillus brevis*, BHN-LAB41 ; *Pediococcus pentosaceus*, KCTC3109 ; *Lactobacillus casei*)을 접종하여 37°C에서 7일 동안 발효를 진행하였고, 발효 후 70% 에탄올을 통해 추출하여 각 발효 유산균에 따른 추출물의 항산화 활성을 측정하였다. 그 결과, 발효하지 않은 아마씨(NFFS)에 비해 유산균 발효 아마씨에서 전반적으로 총 폴리페놀 함량 약 1.5~8배, 총 플라보노이드 함량 약 1.2배 증가된 것을 확인하였다. DPPH radical 소거 활성능은 100 ppm 농도에서 비 발효 아마씨 대비 5.6배, SOD 유사활성능은 2.3배 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 연구결과를 종합하여 볼 때 유산균을 이용한 아마씨의 발효가 가능하며, 유산균 발효가 아마씨의 항산화능 증대에 효과적인 것을 확인하였으며 본 연구를 기반으로 한 기능성 식품 또는 화장품 소재로의 개발 및 응용이 가능할 것으로 기대된다.