

홍국발효 대두의 항산화 및 항당뇨 활성

김 선 희^{*,**} · †강 순 아^{***,****}

^{*}호서대학교 벤처대학원 융합공학과 박사과정 학생, ^{**}호서대학교 보건산업연구소 연구원,
^{***}호서대학교 벤처대학원 융합공학과 교수, ^{****}호서대학교 보건산업연구소 소장

Antioxidant and Anti-Diabetic Activities of Soybean Fermented with *Monascus*

Sun Hee Kim^{*,**} and †Soon Ah Kang^{***,****}

^{*}Ph.D. Student, Dept. of Convergence Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

^{**}Researcher, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

^{***}Professor, Dept. of Convergence Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

^{****}Director, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

Abstract

This study was performed to investigate the antioxidant and antidiabetic activities of soybean fermented with *Monascus*. Also, the changes in the content of isoflavones and Monacolin K were analyzed. It was observed that the glycoside forms of daidzin and genistin were converted to aglycones of daidzein and genistein within 6 days of fermentation. The product can be used as a health functional material that can increase bioavailability. Monacolin K production was found to increase significantly with the progression of fermentation with an increase to 0.04 mg/g and 0.44 mg/g on 6 and 12 days of fermentation, respectively. The DPPH radical scavenging activity of soybean fermented with *Monascus* was significantly increased compared to that of soybean. The protein expression of inflammation-related genes (TNF- α , IL-6, and COX-2) in the MIN cell was significantly increased in the presence of alloxan compared to the normal group, but a decrease was observed in the presence of soybean fermented with *Monascus*. In conclusion, soybean fermented with *Monascus* showed the highest antidiabetic and antioxidant effects. These results suggest that soybean fermented with *Monascus* has the potential to be used as a beneficial ingredient with antidiabetic and antioxidant effects.

Key words: *Monascus*-fermented soybean, monacolin K, antioxidant activities, anti-diabetes

서 론

홍국균은 반자낭균과(Hemiascomycetaceae) 홍국균속(Monascaceae)에 속하며 증백미에 *Monascus*속 곰팡이를 배양하여 적색 색소를 내는 것이 특징이다(Lee 등 2007). 약 600년 전부터 동아시아권 국가에서 보존제, 수산연제품, 축산가공품 등에 착색제, 소화촉진제 등의 목적으로 사용되어 왔다(Pyo YH 2008; Jeong 등 2013; Kim 등 2015). 홍국균은 콜레스테롤 생합성 효소인 HMG-CoA reductase의 억제 물질을 생산하여 혈압 강하, 혈관 이완 효과 및 항산화 활성을 갖는 것으로 알려져 있다(Pyo YH 2008). 홍국균의 생리활성물질인 monacolin

K(lovastatin)는 식품의약품안전처 기준으로 500 mg/kg을 함유하는 것을 기능성 원료로 인정하고 있는데, monacolin K의 생성량은 포도당 함량, 배양 과정 중 홍국균의 기질 접촉, 비접촉 면적 등에 영향을 받는다(Park 등 2014). Hu 등(2020)의 연구에서는 홍국은 아세틸콜린을 방출시키는 신경 말단의 능력을 강화시켜 인슐린 분비를 증가시키고 췌장 세포의 M3R을 자극하여 인슐린 분비를 촉진시키는 역할을 한다고 보고하였다. 또한, 포도당 생성 억제, 포도당 섭취 촉진, β 세포 보호, 인슐린 저항성 완화 등에 영향을 미쳐 항당뇨 효과를 가지는 소재이다(Chang 등 2005).

홍국균을 식품에 적용하면 기능성이 향상될 수 있는데, Pyo

† Corresponding author: Soon Ah Kang, Professor, Dept. of Convergence Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea. Tel: +82-2-2059-2353, Fax: +82-2-2059-1405, E-mail: sakang@hoseo.edu

YH(2008)는 홍국균을 이용하여 콩을 발효시킨 홍국발효 콩에서 mevinolin, 이소플라본 및 토코페롤 등 특정 생리활성 성분이 증가되어 새로운 고부가가치 제품으로서의 역할을 할 수 있을 것이라 보고하였다. 홍국을 접종한 특히 다양한 식품관련 선행연구를 통해 홍국의 우수한 기능성이 보고되었는데, 식품의 기능성 효과를 조사한 선행 연구에는 홍국발효 홍삼의 monacolin, mevinolin, lovastatin, acetylcholine과 같은 생리활성 성분의 콜레스테롤 저하 작용, 혈압상승 억제 작용(Park 등 2009), 홍국발효 백태와 서리태의 사포닌 및 GABA 생리활성 성분(Jin & Pyo 2015), 홍국발효 식초의 tyrosinase와 elastase 저해 작용에 의한 안티에이징 효과(Hwang 등 2016), 홍국발효 참당귀 추출물의 항비만 효과(Kim 등 2018), 홍국균으로 발효한 대두(Pyo YH 2006), 현미(Lee 등 2015) 등을 식품에 적용하여 홍국에 함유된 monacolin K와 이소플라본과 같은 생리활성물질에 대한 연구와 같이 홍국을 활용한 식품들의 항산화, 항염증, 항비만 효과에 대한 연구들이 활발히 진행되었다.

대두는 발효식품인 된장, 간장의 주원료로서 단백질 함량은 높고 지방함량이 낮은 식물 유래 식품으로 Kwon HJ(1999)의 연구에 의하면 대두 추출물이 폐암 발생률을 감소시켰다고 보고하였다(Imm & Kim 2010). 특히, 대두에 함유된 daidzein, genistein과 같은 이소플라본은 혈중 콜레스테롤 저하 효과 외에도 항비만 및 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다(Sirotkin & Harrath 2014). 대두는 발효가 진행될수록 단백질, 지방, 탄수화물이 펩타이드, 아미노산, 지방산, 당으로 가수분해되어 특유의 풍미가 생성되며 부패균이 생성하는 발암물질의 생성이 저하되는 특징이 있다(Oh & Eom 2008). 대두의 기능성을 조사한 선행 연구에는 면역조절 효과(Wei 등 1995), 항돌연변이성(Yoon 등 1996), 항암 및 항염증 효과(Imm & Kim 2010), 항비만 효과(Park 등 2015; Kim 등 2020) 등이 있지만 홍국균 발효 대두의 항당뇨를 연구한 자료는 미비한 편이다. 홍국균에 들어있는 monacolin K는 아세틸콜린을 방출시키는 신경말단의 능력을 강화하여 인슐린 분비를 촉진시키며(Chang 등 2005), 홍국균의 발효를 통해 이소플라본은 배당체에서 비배당체로 전환이 증가되므로 한국인이 가장 많이 섭취하는 대두를 홍국균으로 발효하면 식품의 기능성이 향상될 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 항당뇨 활성을 상승시키는 monacolin K가 함유된 홍국균을 접종한 홍국발효 대두의 항산화 및 항당뇨 활성 평가를 통해 기능성 신소재 개발에 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 홍국발효 대두 제조

대두는 경상북도에서 생산한 백태(*Glycine max*)를 사용하여

건식 분쇄 공정인 에어제트 밀 및 그라인드 밀(Retsch ZM100, Retsch Inc., Rheinische, Germany)을 사용하여 초미세 분쇄하여 분말화하였다. 분말화시킨 대두의 입도를 lazer particle size analyzer(Beckman Coulter Inc., Pasadena, CA, USA)로 분석한 결과, 평균 입도는 30.1 μm 로 나타났으며 홍국발효 대두 제조 전, 액상 기질화를 진행하였다. 초미세 분쇄 소재의 액상 발효에 적합한 홍국균주는 한국생명공학연구원에서 개발하였고(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology 2015), 최적 조건에 맞는 *Monascus sp.* RY1 균주를 이용한 홍국발효 대두를 제공받아 본 연구 시료로 사용하였다. 시료는 대두의 액상홍국발효를 위한 기본 배지로서 초미세분쇄 대두 80 g/L, KH_2PO_4 2.5 g/L, MgSO_4 1.0 g/L를 첨가한 배지로 구성하였다. 무기질소원으로 기본배지에 sodium nitrate, ammonium nitrate, ammonium chloride, ammonium sulfate를 1.5 g/L 농도로 첨가한 후 배양 후 30°C에서 진탕 배양하였다.

2. 홍국발효 대두 추출물 제조

홍국발효 대두 추출물 제조를 위해 일반 대두와 대두 홍국 발효물을 -20°C에서 냉동시킨 뒤, 동결건조기(FD5512, Ilshin BioBase Co., Yangju, Korea)를 이용하여 건조하였다. 건조된 대두는 ultra-blender(Rumilly, Haute-Savoie, France)로 분말화한 뒤 시료 1 g과 에탄올 10 g을 혼합하여 25°C에서 8시간 동안 3회씩 교반기(MS-53MH, JEIO TECH. Co., Daejeon, Korea)로 교반하여 추출하였다. 추출한 용액은 감압농축기(EYELA Rotary Evaporator N-1110V-W, Rikakikai, Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 일정 농도로 제조한 뒤 본 실험의 시료로 사용하였다.

3. 이소플라본 분석

대두와 홍국발효대두의 발효기간에 따라 이소플라본 분석을 위해 Pyo & Lee(2006)과 Sun 등(2011)의 방법을 참고하였다. 시료 0.5 g에 70% 에탄올 5 mL를 혼합한 뒤, 상온에서 30분 동안 ultra sonicator(Bransonic Z245151, Danbury, CT, USA)로 추출하였다. 추출한 용액은 12,000 g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 syringe filter(0.22 μm , Waters Co., Milford, MA, USA)로 여과하였다. HPLC analysis은 JASCO system (JASCO-HPLC-LC-4000, JASCO. Co., Tokyo, Japan)으로 YMC-Pack ODS-AM-303 column(250 mm×4.6 mm i.d., S-5 μm , 120Å, YMC Co., Kyoto, Japan)을 사용하였고 mobile phase는 0.1% phosphoric acid in acetonitrile(solvent A)과 0.1% phosphoric acid in water(solvent B)를 사용하였다. 시료 투입량은 20 μL 로 하였으며 solvent A를 50분 동안 15%에서 35%로 상승시키면서 진행하고 35%에서 10분 동안 유지하였다. Column 온

도는 35°C, 용매 flow rate은 1 mL/min으로 260 nm에서 측정하였다. 이소플라본 정량은 표준용액을 이용한 검량곡선을 이용하여 계산하였다. Waters HPLC system은 Model 2695 separation module system과 Model 2487 UV detector(Waters Corporation, Milford, MA, USA)를 사용하였다.

4. Monacolin K 정량 분석

홍국발효 기간에 따라 생성되는 monacolin K 분석을 위해 분말 시료 1 g을 10 mL의 추출용매 70% 에탄올에 2시간 용해한 뒤 3,500 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액을 syringe filter(PVDF nonsterile syringe filter 0.45 µm, 17 mm, National Scientific Supply Co., Claremont, CA, USA)로 여과하여 HPLC로 분석하였다(Oh 등 2018). 분석을 위한 column은 C18 column(5 µm pore size, 4.6×150 mm, Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, USA)을 사용하였고 mobile phase는 acetonitrile과 0.1% phosphoric acid를 65:35(v/v) 비율로 혼합하여 pH를 2.5로 조정된 뒤 이용하였다. Detector는 2487 UV(Waters Co., Milford, MA, USA)를 이용하여 237 nm에서 분석하였다. Monacolin K의 정량을 위해 표준물질인 mevinolin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 표준정량곡선을 제조하여 이용하였다.

5. 항산화 활성 평가

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거활성능을 측정하기 위해 0.1 mM DPPH 용액 3.75 mL와 추출물 0.25 mL를 10초간 혼합하여 암소에서 30분 동안 반응시켰다. 30분 반응 후에 UV-VIS spectrophotometer(Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, USA)로 517 nm에서 측정하였다(Shamma & Bhat 2009). 대조군은 추출 시료와 동량의 메탄올 용액을 혼합하여 실험시료와 동일한 과정으로 실험을 진행하였다. DPPH 라디칼 소거 활성능은 대조군이 50% 라디칼을 소거하는 시점의 시료의 양(EC50, effective concentration)을 정하였다.

6. 항당뇨 활성 평가

MIN cell은 10% fetal bovine serum, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 U/mL) 및 nystatin(25 g/mL) 등을 함유한 RPMI 1640 배지에서 CO₂ 배양기(WS-180 CA, World Science Co., Bucheon, Korea)로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고, 3일마다 배양액을 교환하면서 배양하였다. MIN 세포에서 인슐린 분비능력을 배양한 채도에서 농도가 60 mg/mL 인 저혈당 농도의 배지(KRBB, 0.2% BSA)에서 1시간 동안 분비한 인슐린 농도를 ELISA kit(LINCO Research, Inc., Billerica, MA,

USA)를 사용하여 ELISA-reader(VERSA max, micro-reader, MDS Co., MO, USA)를 이용하여 측정하였다.

췌장 β-세포에만 특이적으로 내독소성을 가지고 있는 alloxan의 처리를 통해 MIN 세포주의 혐기적인 상황에 대한 대두 홍국발효물의 방어능력을 NO 생성율로 측정하였다. 세포의 생존율을 보기 위하여 MIN 세포주를 18시간 배양하고 96 well plate(Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)에 1×10⁶/well 분포로 배양한 후, 70~80% 정도로 세포가 자라면 실험 시료인 대두 홍국발효물을 농도별로 25, 50, 100 µg/mL로 1시간 동안 전 처리한 후, alloxan 10 mM를 1~2시간 동안 병용 처리하였다. 홍국발효 대두의 농도별 처리에 의한 세포의 분화모습을 관찰하였다.

Alloxan에 대한 항독소능 측정을 위하여 배지에 3-(4,5-dimethyl thiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 100 µg을 첨가하여 4시간 동안 더 배양하였고, 배양이 된 후에는 배지를 버리고, dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 100 µL를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Carmichael 등 1987).

Western blot을 이용한 염증 단백질 발현 측정을 위하여 분리한 단백질은 Bradford assay 방법을 이용하여 단백질의 농도를 정량하였다(Bradford MM 1976). 추출된 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하고 polyvinylidene fluoride membrane(PVDF, Bio-Rad, National Scientific Supply Co., Claremont, CA, USA)으로 이동시킨 후, PBS-T를 함유한 5% 탈지유로 비특이적인 단백질을 blocking하였다. Blocking 과정 후에는 PVDF membrane을 PBS-T 3회, PBS 1회로 세척한 다음 1차 항체를 4°C에서 overnight하면서 반응시켰다. 그 이후에 PBS-T 3회, PBS 1회로 세척한 다음 2차 항체를 실온에서 2시간 동안 처리하였다. IL-6, TNF-α, COX-2 및 α-TUBULIN (Santa Cruz, Dallas, TX, USA) 1차 항체를 사용하였고, 각각에 맞는 2차 항체를 사용한 후 LAS-4000(Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)을 이용하여 확인하였다(Feghali & Wright 1997; Pan 등 2018).

7. 통계 처리

모든 실험의 데이터는 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타났다. 통계분석을 위해 SPSS ver. 18 statistical software package(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 One-way analysis of variance(ANOVA)를 실시한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 실험군 간의 유의성을 검증하였고, 모든 검정의 유의수준은 $p < 0.05$ 을 적용하였다.

결과 및 고찰

1. 홍국발효 대두의 이소플라본 함량

대두의 홍국발효과정 중 이소플라본의 함량 변화 및 활성형인 비배당체(aglycone)로의 전환에 대해 HPLC 분석 결과는 Fig. 1과 같다. 대두의 대표적인 이소플라본이며 배당체형인 daidzin과 genistin 형태는 *Monascus* sp. RY1 균주에 의한 발효과정 중 생체활성형인 비배당체 daidzein 및 genistein으로 6일 이내에 거의 대부분 전환되는 것으로 나타났다. 대두의 daidzein 및 genistein 함량은 48.50±9.33 ug/g 및 2.04±1.34 ug/g이었으나 홍국발효 대두는 각각 315.59±20.67 ug/g 및 289.35±16.55 ug/g으로 홍국에 의한 발효과정에서 비배당체의 전환이 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 또한, 발효 6일 째에 각각 739.37±14.26 ug/g 및 1,125.56±27.34 ug/g으로 2~3배로 유의하게 증가하였다($p<0.05$)(Table 1). 즉, 홍국발효대두의 배당체는 홍국균에 의하여 발효가 6일 진행될 때부터 비배당체로 전환되는 양이 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 홍국발효 대두는 발효 6일 째에 배당체는 239.56±15.68 ug/g이었으나 비배당체는 1,864.27±21.59 ug/g으로 홍국에 의한 발효과정에서 비배당체로의 전환이 유의하게 증가하면서 이루어짐을 확인하였다($p<0.05$). 본 연구에서 보여준 결과는 Hwang & Pyo(2018)의 연구에서도 홍국발효 콩에서 발효 기간에 따라 배당체 이소플라본은 대부분 비배당체형으로 생물 전환되는 것으로 보고되었다. 또한, Chen 등(2015)의 연구에서도 발효 홍국균 발효 시 pH가 감소함에 따라 가수분해가 일어나면서 비배당체 함량이 증가하였고 배당체 함량이 감소함을 보임으로써 본 연구결과와 흡사한 경향성을 보였다. 대두에 함유된 이소플라본은 aglycone(daidzein, genistein, glycitein), β -glucoside conjugates(glucosides, malonyl glucosides, acetyl glucosides) 등 3가지 타입이 있고 4개의 다른 화학 구조를 가지는데 대부분이 β -glucoside 형태로 존재하며 발효, 열처리와 같은 가공 과정은 기존 이소플라본의 화학적 구조, 구성 요소 등에 영향

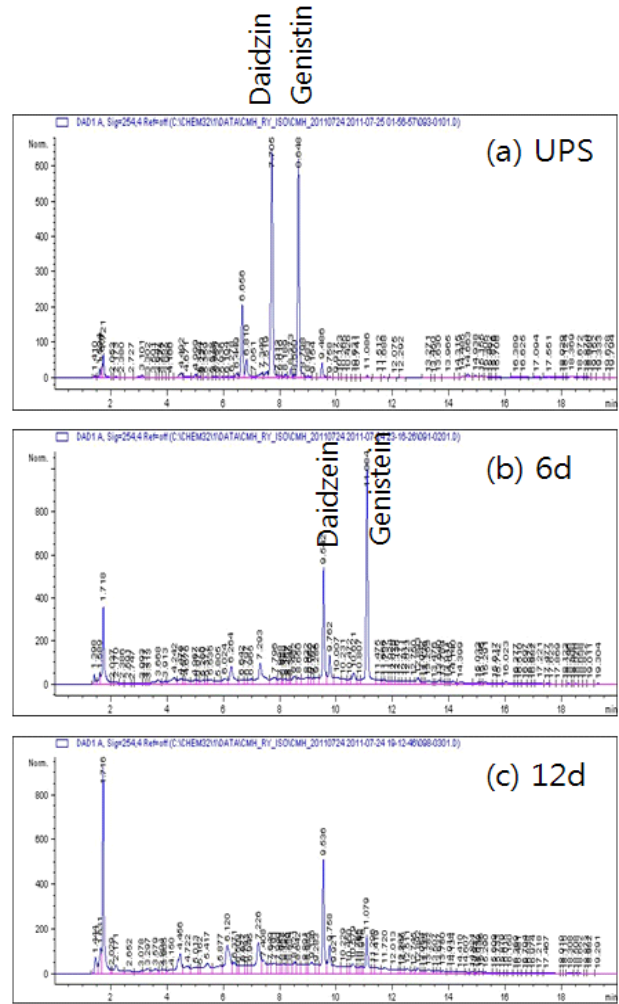


Fig. 1. The HPLC chromatogram of the bioconversion of soy isoflavones during fermentation of ultrafine pulverized soybean by *Monascus* sp. RY1. (a) UPS: ultrafine pulverized soybean, (b) 6 d: ultrafine pulverized soybean fermented with *Monascus* for 6 days, (c) 12 d: ultrafine pulverized soybean fermented with *Monascus* for 12 days.

Table 1. Bioconversion of soy isoflavones during fermentation of ultrafine pulverized soybean by *Monascus* sp. RY1

| Samples ¹⁾ | Isoflavones content (ug/g) | | | | | |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Isoflavones | | | | Total | |
| | Daidzin | Genistin | Daidzein | Genistein | Glycoside | Aglycone |
| UPS | 403.33±19.42 ^b | 1,131.74±24.32 ^a | 48.50±9.33 ^c | 2.04±1.34 ^d | 1,534.27±26.32 ^a | 50.51±7.50 ^d |
| UPSM-0d | 458.58±21.59 ^a | 931.33±18.48 ^{ab} | 315.59±20.67 ^b | 289.35±16.55 ^b | 1,389.76±11.42 ^b | 604.59±17.44 ^c |
| UPSM-6d | 98.35±13.47 ^c | 142.10±19.61 ^b | 739.37±14.26 ^{ab} | 1,125.56±27.34 ^a | 239.56±15.68 ^c | 1,864.27±21.59 ^a |
| UPSM-12d | 61.48±10.53 ^d | 93.56±24.21 ^c | 782.28±32.34 ^a | 219.81±19.29 ^c | 254.35±16.55 ^{bc} | 1,001.33±26.07 ^b |

Each value represents the mean±S.D. (n=3).

^{a-d}Means with the different letters are significantly different from the period of fermentation ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests.

¹⁾ UPS: ultrafine pulverized soybean, UPSM-0, 6, 12d: ultrafine pulverized soybean fermented with *Monascus* for 0, 6, 12 days.

을 미친다(Ikeda 등 1995). 본 연구에서 홍국발효 시간이 경과함에 따라 비배당체 함량이 증가한 결과는 홍국발효는 대두의 이소플라본을 매우 효과적인 생리활성 형태인 유리형태로 전환되는 것이 확인됨으로서 건강기능 소재로서 활용 가능성을 높여 주었다.

2. 홍국발효 대두의 monacolin K 함량

콜레스테롤 저하 작용이 있는 것으로 알려진 홍국발효 대사산물인 monacolin K 함량을 HPLC로 분석한 결과는 Table 2와 같다. Monacolin K는 생체 내 활성형인 acid 형과 비활성형인 lactone 형으로 생산되므로 각각에 대해 분석한 결과, 초미세 분쇄 대두를 발효한 경우 생산되는 monacolin K는 acid 형이 대부분인 것으로 나타났으며, lactone형의 생산은 매우 적었다. Acid 형과 lactone 형의 합계인 총 monacolin K 함량은, 발효 6일에는 0.04±0.01 mg/g으로 서서히 생산되어 발효 12일에 총 monacolin K는 0.44±0.02 mg/g으로 유의하게 증가하였고($p<0.05$), 발효 20일에는 1.14±0.02 mg/g에 도달하면서 유의하게 증가하였다($p<0.05$). Kang 등(2003)과 Lee 등(2015)의 홍국발효 발아현미 연구에서도 홍국균 발효가 monacolin K 함량이 증가하여 본 연구와 유사한 경향을 보였다. 또한 Lee 등(2019)은 균이 성장한 뒤에 monacolin K가 생성되어 4일간 발아가 진행될수록 홍국쌀의 monacolin K 함량이 5.3배 증가한다고 보고하였다. Lee 등(2015)의 연구에서는 monacolin K 함량이 현미(215.85 mg/kg), 백미(40.41 mg/kg)보다 32°C에서 1일간 발아시킨 발아현미(1,263.04 mg/kg)에서 가장 높은 함량을 보였다. 이와 같은 결과로 보아 홍국발효 대두는 생체 내 활성형인 monacolin K 함유율이 높아 건강기능소재로 활용가치가 높을 것으로 판단된다.

3. 홍국발효 대두의 항산화 활성

홍국발효 대두(UPSM)의 DPPH 라디칼 소거능 효과에 대

Table 2. Production of Monacolin K during fermentation of ultrafine pulverized soybean by *Monascus* sp. RY1

| Sample ¹⁾ | Monacolin K content (mg/g) | | |
|----------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|
| | Acid form | Lactone form | Total |
| UPS | 0.00±0.00 ^e | 0.00±0.00 ^e | 0.00±0.00 ^d |
| UPSM-0d | 0.01±0.01 ^{bc} | 0.00±0.00 ^e | 0.01±0.01 ^c |
| UPSM-6d | 0.03±0.01 ^b | 0.01±0.01 ^b | 0.04±0.01 ^b |
| UPSM-12d | 0.41±0.02 ^a | 0.03±0.01 ^a | 0.44±0.02 ^a |

Each value represents the mean±S.D. (n=3).

^{a-d}Means with the different letters are significantly different from the period of fermentation ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests.

¹⁾ UPS: ultrafine pulverized soybean, UPSM-0, 6, 12d: ultrafine pulverized soybean fermented with *Monascus* for 0, 6, 12 days.

한 EC50 값을 구하여 ascorbic acid, trolox 및 홍국쌀과 비교한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 본 실험에서 홍국발효 대두의 DPPH 라디칼 소거능 효과는 26.55±2.10 mg/mL로 발효 전 대두의 소거능 효과(88.70±1.58 mg/mL)에 비하여 유의하게 라디칼을 소거할 수 있는 항산화 활성이 높았다($p<0.05$). 항산화 활성이 높은 양성대조군인 ascorbic acid(7.45±0.92 mg/mL) 및 trolox(9.91±0.15 mg/mL)에 비하여 홍국발효 대두는 항산화활성은 유의하게 낮았다($p<0.05$). UPSM의 라디칼 소거능은 홍국쌀(33.62±1.33 mg/mL)보다 항산화 활성이 유의하게 높게 나타남으로서($p<0.05$) 홍국 접종이 대두의 항산화 활성을 높인 것으로 나타났다. Park 등(2009)의 연구에 의하면 홍삼 추출물보다 홍국발효홍삼의 항산화능이 더 높아 본 연구 결과와 유사한 경향을 보였다. 또한, Park 등(2005)의 연구에서는 홍국색소 성분을 용매분획법으로 분리한 결과, 홍국이 BHT보다 높은 항산화 활성을 가지는 색소를 함유하였다고 보고하였다. Lee 등(2015)의 연구에 의하면 홍국발효 발아현미, 백미, 대두의 항산화능이 발아가 진행됨에 따라 유의적으로 항산화능이 증가하여 본 연구 결과와 일치하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 홍국발효 대두의 항산화활성이 증가한 것은 Lee 등(2007)에 의하면 발아 시, 결합형 페놀 화합물이 유리형태로 전환되어 페놀 화합물의 추출 수율이 증가한다고 보고하였다.

4. 홍국발효 대두(UPSM)의 항당뇨 활성

췌장 β -세포에만 특이적으로 내독소성을 가지고 있는 alloxan의 처리에 의한 MIN 세포주의 혐기적인 상황에서 홍국발효 대두(UPSM)의 방어능력을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 홍국발효 대두(UPSM)을 농도별로 전 처리하였을 때

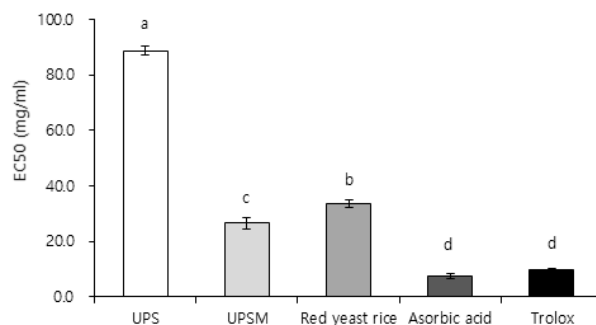


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of UPS and UPSM. UPS: ultrafine pulverized soybean, UPSM: ultrafine pulverized soybean fermented with *Monascus*. Each value represents the mean±S.D. (n=3). ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests.

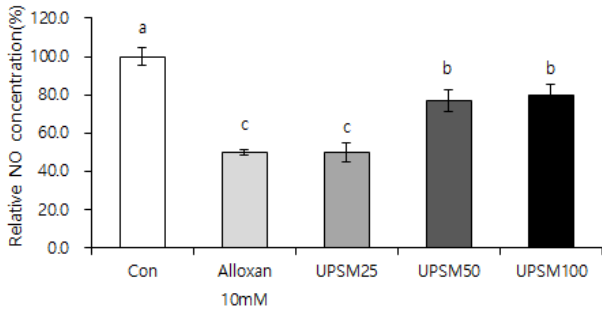


Fig. 3. Relative NO concentration of ultrafine pulverized soybean fermented (UPSM) with *Monascus* on MIN cell. Con: control, Alloxan: alloxan control, UPSM 25, 50, 100: alloxan control pretreated with UPSM 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Each value represents the mean \pm S.D. ($n=3$). ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests.

UPSM25는 $49.9\pm 4.8\%$, UPSM50은 $77.1\pm 5.6\%$, UPSM100은 $79.5\pm 5.9\%$ 로 50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 유의적으로 NO 생성물이 증가하여 가장 높은 NO 저해능을 보였다($p<0.05$). Lee 등(2010)의 보고에 의하면 높은 항산화능을 가진 식품 소재일수록 높은 NO 저해능을 보인다고 하였는데, 이는 본 연구에서 홍국발효 대두(UPSM)이 높은 항산화 활성과 NO 저해능을 보인 결과와도 유사하였다. 홍국발효 대두(UPSM)의 농도별 처리에 의한 MIN 세포주의 분화모습을 관찰한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 그 결과 홍국발효 대두(UPSM)의 농도가 증가할수록 세포의 생존율이 증가하였는데, 이는 alloxan에 의하여 파괴되는 정도가 감소하였기 때문인 것으로 사료

된다.

MIN 세포주에 대하여 실험 시료인 홍국발효 대두를 농도별로 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 전 처리한 후 alloxan 10 mM를 병용 처리한 후 염증관련 사이토카인 유전자 발현을 측정한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. Alloxan 처리에 의하여 증가되었던 TNF- α 와 IL-6의 발현은 홍국발효 대두(UPSM)를 농도에 의존하여 유의적으로 감소하는 것을 볼 수 있었고, 특히 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서 크게 감소하였다($p<0.05$). 또한, alloxan 처리에 의하여 증가한 COX-2 발현은 홍국발효 대두를 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리에 의하여 통계적으로 유의하게 감소하는 것을 볼 수 있었다($p<0.05$). Suh 등(2003)의 연구에서는 대두의 이소플라본이 TNF- α 와 IL-6의 발현을 억제한다는 보고를 하였고 본 연구에서는 홍국발효 과정에 의하여 염증성 사이토카인을 감소시키는 결과를 보였다. Hu 등(2020)에 의하면 당뇨병을 가진 쥐에게 홍국균의 주입이 공복 혈당 수준을 감소시키고, glucose tolerance 개선, 인슐린 수치 증가, 포도당, 지질 관련 장애 완화 역할을 한다고 보고하였다. 특히 Chang 등(2005)의 연구에서는 인슐린이 부족한 쥐에서 홍국균은 포도당 생성의 주요 효소인 PEPCK의 전사를 억제하여 포도당 생성을 억제하였고 3T3-L1 지방세포 내 GLUT4의 인슐린 수용체, 단백질 키나제 B 인산화를 통해 포도당 섭취를 촉진하여 최종적으로 항당뇨 효과를 확인하였다고 보고하였다. Lee 등(2020)의 곡류 및 두류의 항산화, 항당뇨 효과를 조사한 연구에 의하면 항산화 활성이 항당뇨 효과와 유의적 상관관계를 보이면서 두류가 간세포의 포도당 흡수를 증가시켜 당뇨병에 도움을 준다고 보고하였다. 이상과 같은 결과에서 홍국균을 이용한 발효과정은 항염증효과

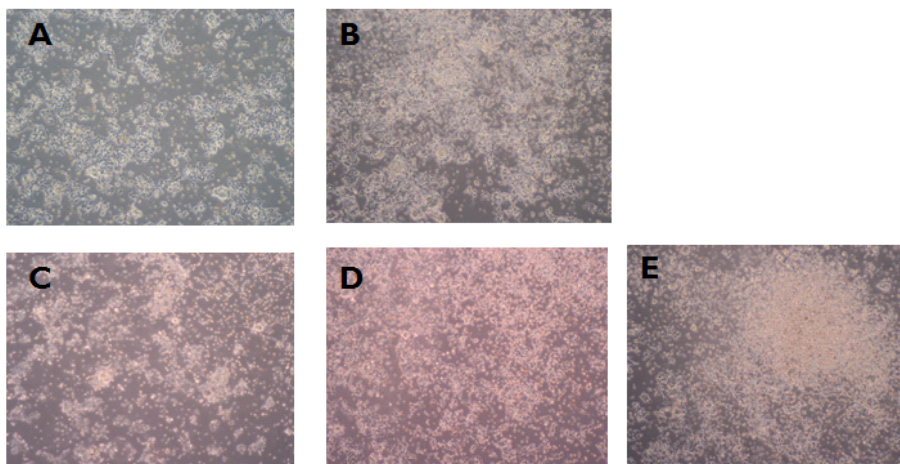


Fig. 4. Effect of ultra finely pulverized soybean fermented with *Monascus* on MIN cell. A: control, B: alloxan control, C: alloxan control pretreated with UPSM-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, D: alloxan control pretreated with UPSM-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, E: alloxan control pretreated with UPSM-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

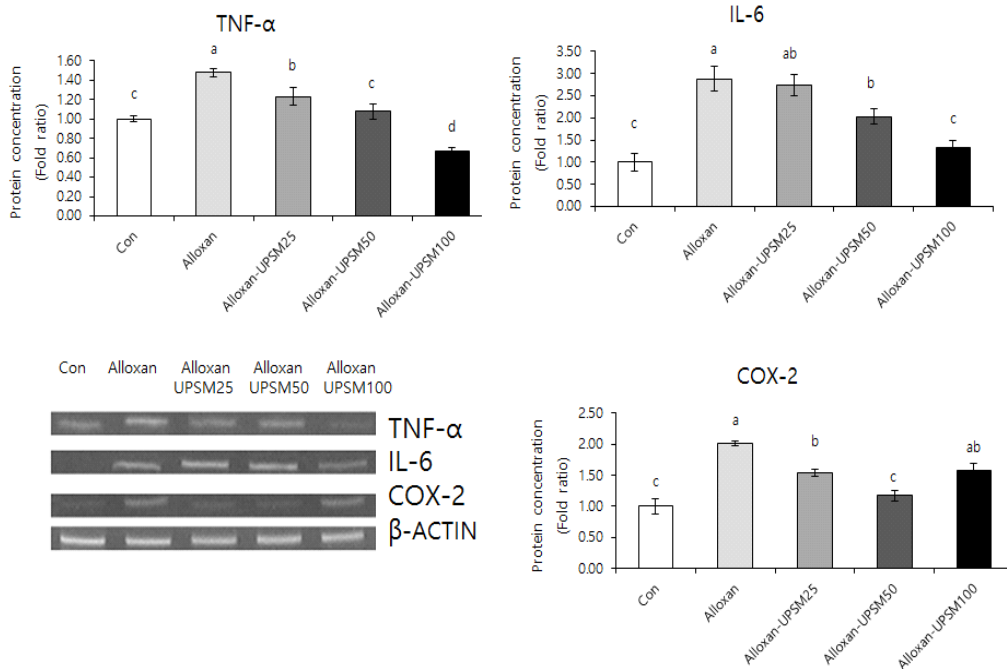


Fig. 5. Effect of *Monascus* fermented soybean on protein expression levels of TNF- α , IL-6 and COX-2 against alloxan induced pancreatic β -cell damage. Con: control, Alloxan: alloxan control, Alloxan+UPSM 25, 50, 100: alloxan control pretreated with UPSM 25, 50, 100 μ g/mL. Each value represents the mean \pm S.D. (n=3). ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests.

를 증가시키는 결과를 보임으로써 기능성 소재의 가공방법에 활용가치를 높일 것으로 보인다. 그러나 국내 및 국외에서 홍국발효 대두의 항당뇨 활성을 검증한 자료는 미비하고 홍국발효를 통해 항당뇨 활성효과를 얻은 연구는 없어 본 연구 결과가 홍국균 활용에 의한 당뇨병 예방 기능성 소재개발에 도움이 될 것이라 생각된다.

요약 및 결론

본 연구는 홍국발효 대두의 항산화 및 항당뇨 활성효과를 검증하기 위해 이소플라본 및 monacolin K 함량 변화, 항산화 및 항당뇨 활성효과를 조사하였다. 홍국발효 대두의 이소플라본을 분석한 결과 배당체형인 daidzin과 genistin 형태는 *Monascus* sp. RY1 균주에 의한 발효과정 중 생체활성형인 비배당체 daidzein 및 genistein으로 전환되었다. Monacolin K 생성은 홍국발효가 진행됨에 따라 함량이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 항산화 활성을 측정한 결과 대두보다 홍국발효대두의 DPPH 라디칼 소거능은 유의하게 증가하여 홍국발효에 의해 항산화 효과가 증가하는 것으로 나타났다. 항당뇨 효과는 췌장 β -세포에만 특이적으로 내독소성을 가지고 있는 alloxan의 처리에 의하여 증가되었던 TNF- α , IL-6

및 COX-2의 발현은 홍국발효 대두(UPSM)에 의하여 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다. 즉, MIN 세포주의 혐기적인 상황에 대하여 홍국발효 대두(UPSM) 처리에 의한 방어능력이 입증되었다. 본 연구 결과에서 홍국발효 대두의 발효과정 중 비배당체의 전환 및 Monacolin K 함량의 증가를 볼 수 있었고, 항산화 및 항당뇨 효과를 검증하였다. 이상과 같은 결과는 질환예방용 기능성식품개발에 홍국균 활용에 의한 기능성 소재개발에 도움이 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 과제 결과 일부는 한국생명공학연구원 지역산업기술 개발사업(70007070)의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다.

References

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated color-

- metric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936-942
- Chang JC, Wu MC, Liu IM, Cheng JT. 2005. Increase of insulin sensitivity by stevioside in fructose-rich chow-fed rats. *Horm Metab Res* 37:610-616
- Chen JC, Wang J, Wang ZJ, Li YJ, Pang J, Lin HT, Yin SW. 2015. Effect of *Monascus* aged vinegar on isoflavone conversion in soy germ by soaking treatment. *Food Chem* 186:256-264
- Feghali CA, Wright TM. 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2:12-26
- Hu J, Wang J, Gan QX, Ran Q, Lou GH, Xiong HJ, Peng CY, Sun JL, Yao RC, Huang QW. 2020. Impact of red yeast rice on metabolic diseases: A review of possible mechanisms of action. *J Agric Food Chem* 68:10441-10455
- Hwang JY, Cho HY, Pyo YH. 2016. Effect of unpolished rice vinegar containing *Monascus*-fermented soybean on inhibitory activities of tyrosinase and elastase. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45:149-154
- Hwang JY, Pyo YH. 2018. Effects of acetic acid fermentation on contents of bioactive components in soy-koji vinegar brewed from *Monascus*-fermented soybeans. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 47:1128-1135
- Ikeda K, Matsuda Y, Katsumaru A, Teranishi M, Yamamoto T, Kishida M. 1995. Factors affecting protein digestibility in soybean foods. *Cereal Chem* 72:401-405
- Imm JY, Kim SJ. 2010. Anti-cancer and anti-inflammatory effects of mung bean and soybean extracts. *Korean J Food Sci Technol* 42:755-761
- Jeong EJ, Kim KP, Bang BH. 2013. Quality characteristics of cookies added with Hongkuk powder. *Korean J Food Nutr* 26:177-183
- Jin YJ, Pyo YH. 2015. Effect of *Monascus*-fermentation on the content of black soybeans. *Korean J Food Sci Technol* 47:409-412
- Kang DZ, Um JB, Lee SK, Lee JH. 2003. Content of rutin and monacolin K in the red buckwheat fermented with *Monascus ruber*. *Korean J Food Sci Technol* 35:242-245
- Kim M, Im S, Cho YK, Choi C, Son Y, Kwon D, Jung YS, Lee YH. 2020. Anti-obesity effects of soybean embryo extract and enzymatic allyl-modified isoquercitrin. *Biomolecules* 10:1394-1408
- Kim SH, Park BW, Kim JH. 2015. Quality characteristics of tarakjuk prepared with red yeast-rice. *Korean J Food Nutr* 28:313-319
- Kim YW, Kim TH, Sim SY, Ahn HY, Park KR, Kim JW, Cho YS. 2018. Effects of extracts of *Monascus*-fermented *Angelica gigas* Nakai in high-fat diet-induced obesity in rats. *J Life Sci* 28:58-67
- Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology. 2015. *Monascus* strain suitable for liquid fermentation of ultra finely pulverized substrate and uses thereof. Korea Patent 10-1542909
- Kwon HJ. 1999. Bioactive compounds of soybean and their activity in angiogenesis regulation. *Korean Soybean Digest* 16:63-68
- Lee H, Yu M, Kim HJ, Sung J, Jeong HS, Lee J. 2020. Antioxidant and antidiabetic activities of ethanol extracts of cereal grains and legumes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 49:323-328
- Lee HK, Hwang IG, Kim HY, Woo KS, Lee SH, Woo SH, Lee J, Jeong HS. 2010. Physicochemical characteristic and antioxidant activities of cereals and legumes in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:1399-1404
- Lee JH, Kim BH, Yoon YC, Kim JG, Park YE, Park HS, Hwang HS, Kwun IS, Kwon GS, Lee JB. 2019. Effects against obesity and diabetes of red pepper (*Capsicum annum* L.) fermented with lactic acid bacteria. *J Life Sci* 29:354-361
- Lee JH, Kwak EJ, Kim JS, Lee KS, Lee YS. 2007. A study on quality characteristics of sourdough breads with addition of red yeast rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36:785-793
- Lee SH, Jang GY, Kim MY, Kim S, Lee YR, Lee J, Jeong HS. 2015. Effect of *Monascus* fermentation on content of monacolin K and antioxidant activities of germinated brown rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44:1186-1193
- Oh HA, Kim IY, Lee YJ, Song MS, Lee JS, Heon SJ. 2018. Comparison of monacolin K and antioxidant components of red yeast rice produced by germinated brown rice using normal and processing rice cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 47:1344-1348
- Oh HI, Eom SM. 2008. Changes in microflora and enzyme activities of cheonggukjang prepared with germinated soybeans during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 40:56-62
- Pan Y, Long X, Yi R, Zhao X. 2018. Polyphenols in liubao tea can prevent CCl₄-induced hepatic damage in mice through its antioxidant capacities. *Nutrients* 10:1280
- Park CD, Jung HJ, Lee HW, Kim HS, Yu TS. 2005. Antioxidant activity of *Monascus* pigment of *Monascus purpureus* P-57

- mutant. *Korean J Microbiol* 41:135-139
- Park JC, Cha JY, Lee CH, Doh ES, Kang IH, Cho YS. 2009. Biological activities and chemical characteristics *Monascus*-fermentation Korean red ginseng. *Korean Soc Life Sci* 19:1553-1561
- Park JY, Han SI, Seo WD, Ra JE, Sim EY, Nam MH. 2014. Study on *Monascus* strains and characteristic for manufacturing red yeast rice with high production of monacolin K. *Korean J Crop Sci* 59:167-173
- Park YM, Lim JH, Seo EW. 2015. Anti-obesity effect of by-product from soybean on mouse fed a high fat diet. *Korean J Plant Resour* 28:168-177
- Pyo YH, Lee YC. 2006. Mevinolin production by *Monascus pilosus* KFRI-1140 in solid state fermentation using soymeal. *Food Sci Biotechnol* 15:647-649
- Pyo YH. 2006. The method of soybean yogurt contain red yeast rice fermented bean extract. Korea Patent 10-2007-0115000
- Pyo YH. 2008. Effect of *Monascus*-fermentation on the content of GABA and free amino acids in soybean. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37:1208-1213
- Sharma OP, Bhat TK. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem* 113:1202-1205
- Sirotkin AV, Harrath AH. 2014. Phytoestrogens and their effects. *European J Pharmacol* 741:230-236
- Suh KS, Koh G, Park CY, Woo JT, Kim SW, Kim JW, Park IK, Kim YS. 2003. Soybean isoflavones inhibit tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. *Phytochemistry* 63:209-215
- Sun JM, Sun BL, Han FX, Yan SR, Yang H, Akio K. 2011. Rapid HPLC method for determination of 12 isoflavone components in soybean seeds. *Agric Sci China* 10:70-77
- Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang, Y. 1995. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 208:124-130
- Yoon KD, Kwon DJ, Hong SS, Kim SI, Chung KS. 1996. Inhibitory effect of soybean and fermented soybean products on the chemically induced mutagenesis. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 24:525-528

Received 01 February, 2021

Revised 19 March, 2021

Accepted 05 April, 2021