

Lactobacillus casei KCTC 3109에 의한 감국 추출물의 항산화능의 변화

이지복¹, 최재영^{2*}

¹(주)엘파운더 대표이사, ²연성대학교 호텔외식조리과 호텔조리전공 교수

Changes in antioxidant activity of *Chrysanthemum indicum* L. extract by *Lactobacillus casei* KCTC 3109

Ja-bok Lee¹, Jae Young Choi^{2*}

¹CEO, L.FOUNDER INC.

²Professor, Dept. of Culinary Arts & Hotel Food Service-Major in Culinary Arts, Yeonsung University

요약 유산균에 의한 감국 추출물(CIL)의 항산화능의 변화를 알아보기 위해 64%, 80% ethanol 로 추출한 농도별 CIL를 발효시켜 total phenolic contents (TPC), flavonoid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), reducing power (RP), linoleic acid 자동산화 저해활성의 변화를 확인해 보았다. TPC의 경우 3109, 3237에서 증가하였으며, flavonoid에서는 모든 균주에서 감소를 나타냈다. DPPH 측정에서는 64% CIL 발효 후 3074, 3109에서 증가하였으며, 80% CIL 발효에서는 모든 균주가 증가를 나타냈다. RP측정에서는 64%, 80% CIL에서 모든 균주에서 증가를 보였으며, linoleic acid 자동산화 저해활성에서는 모든 균주에서 감소를 나타냈다. 특히 3109 항산화능을 평가하는 DPPH와 RP 측정에서 다른 균주에 비해 전반적으로 높게 측정이 되었다. 결과적으로 4종의 유산균 중에서 3109가 발효과정을 통해서 CIL의 항산화 효능을 효과적으로 증대하는 것을 확인할 수 있었다.

주제어 : 감국, 발효, DPPH, 환원력, *Lactobacillus casei* KCTC 3109

Abstract The antioxidant activity of *Chrysanthemum indicum* L. extract (CIL) was investigated by fermenting lactic acid bacteria with the CIL from 64% and 80% ethanol extraction and measuring the total phenolic contents (TPC), flavonoid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), reducing power (RP), and linoleic acid auto-oxidation inhibitory activity. CIL was confirmed to inhibit bacterial auto-oxidation. TPC was increased in strains 3109 and 3237, while flavonoid decreased in all strains. DPPH was increased in strains 3074 and 3109 fermented with 64% CIL and all the strains with 80% CIL. RP was increased and linoleic acid auto-oxidation inhibitory activity decreased in all the strains fermented with 64% or 80% CIL. Among the 4 strains, strain 3109 had the highest DPPH and RP; thus, it was most effective in increasing CIL's antioxidant efficacy through the fermentation process.

Key Words : *Chrysanthemum indicum* L., Fermentation, DPPH, Reducing power, *Lactobacillus casei* KCTC 3109

*This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through High Value-added Food Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (119116-01).

*Corresponding Author : Jae Young Choi(juynay@yeonsung.ac.kr)

Received March 28, 2021

Revised April 21, 2021

Accepted May 20, 2021

Published May 28, 2021

1. 서론

식품은 생물이 생존하는데 가장 중요한 요소이며, 식품을 섭취함으로써 대사활동에 필요한 에너지를 얻는다. 한편 삶의 질의 상승, 교육수준의 향상, 환경에 대한 관심 증가로 인해 건강을 위한 조건으로서 식품에 대한 관심이 늘고 있다[1]. 그러나 식단의 서구화 및 간편화에 의해 전통발효식품은 접하기 힘든 메뉴가 되며 전통발효식품에 대한 관심 및 시장은 감소하고 있었다. 하지만 최근 발효식품이 면역, 비만, 항산화, 미백 등 다양한 효과가 있다는 연구 결과와 미디어 노출에 의해 다시금 발효식품이 관심을 받기 시작하였다[2].

발효는 식품의 맛, 보존성, 영양의 개선 등을 위하여 식품에 미생물을 배양시키는 방법이다[3,4]. 과거 발효는 식품, 주류, 음료 등을 발효하는데 한정적으로 사용되었으며 우연성에 의존하였으나, 현재 발효는 균주 및 발효 조건, 유전 정보 등을 조작하여 체계적 예상 및 조절이 가능하게 되었다[5]. 대표적으로 식품 발효에 사용되는 미생물은 유산균과 고초균, 효모, 곰팡이 등이 있다[6]. 다양한 미생물을 이용한 발효연구 결과, 발효과정은 다당류, 단백질, 배당체, 지방 등을 분해하여 단당류, 아미노산, 비배당체, 지방산 혹은 이들의 중간체 등의 다양한 발효 산물을 얻을 수 있고, 이들의 시너지 작용으로 생리활성 효능을 상승시킬 수 있다고 밝혀졌다 [7,8].

유산균은 발효 과정에서 젖산 및 여러 대사산물을 생산하는 미생물이다. 젖산을 생산하여, 식품의 pH를 낮춤으로써 식품의 보존성을 높이며, 신맛을 내는 음료의 생산 등 식품으로서 오랜 기간 사용되어져 왔다. 이로 인해 미국 Food and Drug Administration (FDA)에서는 generally recognized as safe (GRAS)로서 인정받고 있다. 최근에는 유산균의 섭취가 장내 유해균을 억제시켜, 건강 증진 및 질병 예방을 한다는 것이 알려지면서 유산균 중 이러한 특징이 높은 probiotics 균주에 대한 연구와 응용이 증가되고 있다[9]. 한편, β -glucosidase 활성을 가지는 대표적인 유산균인 *Lactobacillus* sp.는 여러 식물 배당체의 장내 가수분해를 시키는데 중요한 역할을 한다[10,11].

암, 당뇨, 비만과 노화 등은 산화 스트레스와 관련이 있다. 산화 스트레스의 활성산소와 free radical은 세포에서 산화를 유발한다. 특히, 다량의 free radical 형성은 세포 단백질, 세포의 DNA 등을 산화시키고,

nuclear factor-kappa B (NF- κ B), hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 α) 등의 세포 신호와 전자 경로를 매개하는 염증성 interleukins, cytokines 등의 인자를 방출하여 염증 세포를 유발한다. 이런 인자를 해소하려면 superoxide dismutase, catalase 등과 같은 천연 항산화 효소 및 항산화능이 뛰어난 천연작물을 통해 보충함으로써 이를 해소할 수 있다[12,13].

감국(*Chrysanthemum indicum* L.)은 국화과의 여러해살이풀로 동아시아 지역의 양지에서 자란다. 감국차는 감기 예방, 두통, 장염, 변비, 관상동맥, 심장 질환 및 고혈압 치료를 위해 한약으로 널리 사용되었으며, 감국에 포함된 페놀성 화합물에는 chlorogenic acid, luteoloside, 3,5-dicaffeoylquinic acid, luteolin, apigenin 및 quercetin을 포함한 일부 flavonoid가 존재한다[14,15]. 이 중 chlorogenic acid와 luteoloside는 발효과정을 통해 분해되어 더 높은 활성을 나타낼 수 있다. 예를 들어 chlorogenic acid는 caffeic acid와 quinic acid가 ester 결합으로 연결되어 있는 물질이나 동량의 caffeic acid에 비해 약한 항산화능을 나타낸다[16]. 한편 luteoloside와 유사한 구조를 가진 genistin, daidzin과 같은 배당체 isoflavone이 발효를 통해 비배당체로 전환되며 항산화능이 증가했다고 보고되었다[17].

따라서 본 연구에서는 국화의 일종인 감국을 발효하여 감국 발효 시 최적의 항산화 활성 증대를 유도하는 유산균을 선별해 건강식품 원료로의 가능성을 높이는 것을 목표로 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 감국의 추출 및 저항성 유산균 선별

감국은 서울 경동시장 내에서 구입해 시료로 사용하였으며, 유산균은 생물자원센터(KCTC, Korea)에서 분양 받았다. 상온에서 48 hr 동안 감국 200 g을 64%, 80% ethanol 1,000 mL에서 각 추출하였다. 감국 추출물(CIL)의 항균작용에 대해 내성을 가진 유산균을 분리하기 위해 감국 유산균 배지를 제조하여 균의 생장을 확인하였다. 1차선별을 위해 80% CIL 400 mL/L, glucose 20 g/L, soy peptone 20 g/L, yeast extract 10 g/L, agar 20 g/L 농도로 고체배지를 만들었다. 2차선별을 위해 80% CIL 50 mL/L, glucose 20 g/L,

soy peptone 20 g/L, yeast extract 10 g/L 농도로 액체배지를 만들었다. 최종적으로 선별된 균주는 선행 연구[18]와 동일하게 Table 1과 같이 선별되었다.

Table 1. List of lactic acid bacteria

Name	KCTC No.
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	3074
<i>Lactobacillus casei</i>	3109
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3115
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3237

2.2 유산균 배양 특성

유산균 배양 특성을 확인하기 위해 성장률 측정, colony-forming unit (CFU) 측정, 환원당 정량, 유기산 정량, pH정량을 실시하였다. 성장률 측정을 위해 80% CIL 50 mL/L, glucose 20 g/L, soy peptone 20 g/L, yeast extract 10 g/L 농도로 액체배지를 만들었다. 만들어진 액체배지에 유산균 전 배양액을 O.D 3.0 기준으로 10% 농도로 접종한 뒤 4일간 배양하였다. 그 후 UV/Visible spectrophotometer (Ultrospec 3100 pro, GE healthcare, USA)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 감국 유산균 배지에서 유산균의 생장 속도를 측정하였다.

CFU는 생장속도 측정과 같은 방식으로 배양된 각 균주 감국 발효물을 증류수로 다단 희석을 통해 희석하여 MRS agar에 도말 후 CFU를 측정하였다. 환원당 정량은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent와 glucose 용액을 사용하였다. Standard curve를 만들기 위해 glucose 용액을 다양한 농도로 희석하여 사용하였다. 2 mL의 DNS reagent가 담긴 test tube에 감국 발효물이나 glucose 용액을 2 mL를 첨가한 뒤, 끓는 물에 약 10 min 간 증탕하였다. 증탕이 끝나면 바로 찬물에 옮겨 냉각한 뒤 575 nm의 파장에서 흡광도 (Ultrospec 3100 pro, GE healthcare, USA)를 측정하였다.

pH 측정 및 유기산 정량은 pH meter로 감국 발효물의 pH를 측정하였으며, 0.1 N NaOH 용액으로 감국 발효물의 pH가 중성이 될 때까지 NaOH 용액을 첨가한 뒤 첨가한 용액을 바탕으로 유기산의 양을 계산하였다. 균주 별 감국 발효물은 KCTC 번호로 표시하였다.

2.3 Total phenolic contents 함량 측정

Total phenolic contents (TPC) 함량은 Dewanto의 방법[19]을 변형하여 측정하였다. 각 시료 0.2 mL에 Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich, USA) 0.1 mL를 넣은 뒤 5 min간 안정화 후, 20% sodium carbonate (Junsei, Japan) 0.6 mL를 가하였다. 15 min 후 증류수 9 mL를 넣어 혼합한 뒤 UV/Visible spectrophotometer (Ultrospec 3100 pro, GE healthcare, USA)로 725 nm에서의 흡광도를 측정하였다. TPC 함량은 gallic acid (Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 검량선을 작성하여 농도를 나타냈다.

2.4 Flavonoid 함량 측정

Flavonoid 함량은 Moreno의 방법[20]을 변형하여 측정하였다. 각 시료 0.5 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL, 80% ethanol (Sigma-Aldrich, Germany) 4.3 mL를 가하였다. 40 min 후 UV/Visible spectrophotometer (Ultrospec 3100 pro, GE healthcare, USA)로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Flavonoid 함량은 quercetin (Sigma-Aldrich, Germany)를 이용하여 검량선을 작성하여 농도를 나타냈다.

2.5 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 측정

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 측정은 Blois의 방법[21]을 변형하여 사용하였다. 각 시료 0.1 mL에 methanol 1.9 mL를 첨가한 뒤, 517nm 파장에서의 흡광도 0.8이 되도록 보정한 DPPH 용액 (Cayman Chemical, USA) 1.0 mL를 첨가하였다. 반응액은 vortexing한 뒤 실온에서 30 min 동안 반응시켰다. 반응시킨 뒤, UV/Visible spectrophotometer (Ultrospec 3100 pro, GE healthcare, USA)로 517 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 무첨가 균의 소거능 (%)으로 결과를 산출하였다.

2.6 Reducing power 측정

Reducing power (RP) 측정은 Oyaizu의 방법[22]을 변형하여 사용하였다. 각 시료 0.1 mL에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) (Thomas Scientific, USA) 0.5 mL, 1% potassium ferricyanide

(Sigma-Aldrich, Germany) 0.5 mL를 가하였다. 50℃에서 20 min 동안 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich, Germany) 2.5 mL를 가하였다. 반응액을 1,000 rpm에서 10 min간 원심분리를 시킨 뒤, 상층액 0.5 mL와 distilled water (DW) 0.5 mL, 1% ferric chloride (Sigma-Aldrich, Germany) 0.1 mL를 혼합했다. 혼합물을 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer (Ultrospec 3100 pro, GE healthcare, USA)로 700 nm에서의 흡광도를 측정하였다. RP는 ascorbic acid (Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 검량선을 작성하여 농도를 나타냈다.

2.7 Linoleic acid 자동산화 저해활성

Linoleic acid 자동산화 저해활성 측정은 Haraguchi의 방법[23]을 변형하여 사용하였다. 각 시료 0.02 mL 마다 ethanol에 희석한 2.5% linoleic acid (Sigma-Aldrich, Germany) 0.2 mL, DW 0.78mL를 첨가하였다. 반응액은 70℃ 암 조건에서 1 일간 반응시켰다. 반응시킨 뒤 반응액 0.1 mL, 70% ethanol 2.8 ml, 30% ammonium thiocyanate 0.05 mL, 3.5% hydrochloric acid (HCl)에 녹인 0.02 M ferrous chloride (Sigma-Aldrich, Germany) 0.05 mL를 반응시켰다. 3분간 반응 후 UV/Visible spectrophotometer (Ultrospec 3100 pro, GE healthcare, USA)로 500 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 측정된 값은 시료용액 첨가 군과 무첨가 군과의 과산화물 생성 억제능(%)으로 산출하였다.

2.8 통계분석

모든 실험은 3회 반복 실험을 통해 수치화 했으며, 평균치±표준편차로 표시하고 통계분석은 one-way analysis of variance (ANOVA)로 신뢰구간 $p < 0.05$ 으로 검정을 실시하였다. 대조군과의 유의차를 확인하기 위해 Dunnett's test를 실시하고 통계프로그램은 Graph Pad Prism 5 software (Graph Pad Software, Inc., USA)를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 유산균 배양 특성

배양 특성은 상업적 배양 생산에 있어 발효 조건은

설정과 발효 생산성에 중요한 지표가 된다. 미생물 배양에서 배양액의 혼탁도는 균의 농도에 비례하여 증가하는 것을 이용하는 방법으로 가장 간략하게 균의 농도를 측정하는 방법이다. CFU는 미생물 배양액을 고체배지에 도말하여 생성된 콜로니의 개수를 측정하는 방법으로 콜로니를 생성할 수 있는 살아있는 균의 숫자를 셀 수 있다. Glucose는 미생물의 탄소원으로 유산균의 경우 이를 통해 유기산, 그 중에서도 젖산을 생성한다. 이렇게 생성된 젖산은 pH 감소의 원인이 된다.

이에 감국 발효물의 혼탁도, CFU, glucose, 유기산, pH 측정 결과는 Table 2와 같다. 본 실험에서는 흡광도를 통한 균체 측정, CFU를 통한 균체 측정, glucose 잔량, 유기산 함량, pH에서 3074가 가장 높은 성장을 보였다.

Table 2. Fermentation characteristics of the strains of lactic acid bacteria

	OD ₆₀₀	CFU/mL	Glucose	Organic acid	pH
3074 ¹⁾	0.661	1.19×10 ⁹	0.71	8.29	3.58
3109 ²⁾	0.549	9.4×10 ⁸	2.18	6.15	3.89
3115 ³⁾	0.548	9.2×10 ⁸	1.68	7.61	3.79
3237 ⁴⁾	0.570	9.1×10 ⁸	1.21	6.38	3.84

¹⁾ *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*.

²⁾ *Lactobacillus casei*

³⁾ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

⁴⁾ *Lactobacillus rhamnosus*

3.2 Total phenolic contents

TPC에는 polyphenol과 flavonoid, anthocyanin 등 다양한 물질이 포함된다. 이들의 구조는 phenol을 기본 구조로 하고 있으며, 이들은 수소공여능, 전자공여능, 라디칼 안정화, 금속 chelating 활성 등 항산화능에 관련된 작용을 가지고 있다. 뿐만 아니라 hydroxyl group 역시 수소공여능을 가지고 있어 강한 항산화능을 나타낸다[24]. CIL 및 감국 발효물의 TPC 측정 결과는 Fig. 1과 같다. 64% CIL의 경우 농도는 0.697 ± 0.013 mM였으며, 3109, 3237에서 유의성 있게 증가를 나타냈으나($p < 0.01$, $p < 0.001$), 3115에서는 유의하게 감소하였다($p < 0.001$). 80% CIL의 경우 발효 전 농도는 0.734 ± 0.015 mM였으며, 발효 후 3109, 3237에서 유의하게 증가를 나타냈으나($p < 0.01$), 3115에서는 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 반면 3074의 경우 60%, 80% CIL 대비 감소하였으나 유의성은 발견되지 않았다.

일반적으로 발효과정에서 생성된 다양한 효소들은

cellulose나 lignin을 분해하여 phenolic contents의 추출을 증가시키나, 미생물 대사과정에서 생기는 활성 산소 및 phenolic contents를 분해하는 효소들로 인해 장기적인 발효는 phenolic contents를 감소시킨다 [25,26]. 본 연구에서도 이러한 이유에 의해 3074와 3115에서 감소하는 경향을 보인 것으로 생각된다. 한편 이러한 결과와 반대로 Oh의 연구[17]에서는 미생물의 발효로 인해서 배당체인 물질들이 비배당체로 전환되어 phenolic contents로서 측정되는 양이 증가되었다. 이러한 변화의 이유는 phenolic contents의 측정 방법에 있다. Phenolic contents 측정은 phenolic contents가 알칼리조건에서 phosphomolybdate/hosphotungstic acid complex에 전자를 공여하여 청자색의 환원물을 만드는 현상을 이용한 것으로[27], 유사한 특성을 가진 방향족 아미노산, 핵산, 환원당, thiol성 물질, amine 성 물질들 역시 전자공여능으로 인해 phenolic contents로서 측정된다.

본 연구에서는 발효과정에서 생산된 여러 효소들이 배당체를 비배당체로 전환하는 한편 단백질을 분해하여 방향족 아미노산을 생산하였을 것으로 생각된다. 방향족 아미노산은 phenolic contents와는 다르게 취급되나, 이들 역시 radical 소거능, chelating 효과 등을 통해 체내의 산화 스트레스를 줄이는 물질로 건강에 도움이 되는 것으로 보고되었다[28].

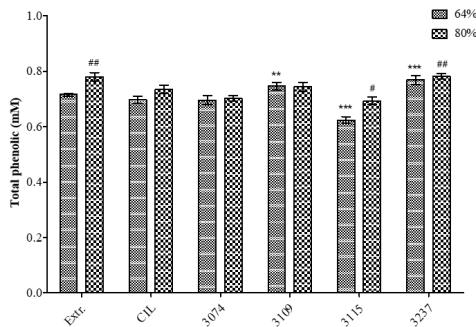


Fig. 1. The total phenolic contents of CIL fermented with lactic acid bacteria

CIL, *Chrysanthemum indicum* L. extract; 3074, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*; 3109, *Lactobacillus casei*; 3115, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; 3237, *Lactobacillus rhamnosus*; The data are expressed as mean±SD. The significance of the difference was analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparison between the 64% CIL group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, comparison between 80% CIL group.

3.3 Flavonoid 함량 측정

Flavonoid는 phenolic contents의 하나로 주로 식물에서 찾아볼 수 있다. 이들은 전자공여능을 가지고 있어 항산화능을 나타내기 때문에 이를 식물 항산화능에 대한 표준물질로서 자주 이용된다. Fig. 2의 결과에서 64% CIL의 경우 발효 전 농도는 0.539 ± 0.020 mM였으나, 발효 후 모든 균주에서 유의성 있게 감소를 나타냈다($p < 0.001$). 80% CIL의 경우도 발효 전 농도는 0.536 ± 0.019 mM였으나, 발효 후 모든 균주에서 유의하게 감소하였다($p < 0.001$).

Flavonoid의 감소는 phenolic contents 감소와 동일하다고 볼 수 있다. 미생물 대사과정에서 생기는 활성 산소와 flavonoid를 분해시키는 효소들로 인해 flavonoid가 감소한 것으로 보인다[29]. Flavonoid는 발효과정에서 polyphenol과 flavonoid가 유산균이 생성한 효소에 의해 분해된 것으로 예상된다. Phenolic contents의 경우 오히려 발효 후 증가한 균주도 있었으나, flavonoid의 경우 모든 균주에서 발효 후 감소 경향을 보였다. Phenolic contents의 경우 아미노산, 핵산, thiol성 물질, amine성 물질 다양한 물질이 측정되며, 이로 인해 농도가 증가될 수 있으나, flavonoid의 경우 식물에서만 생성되는 물질이며, 발효를 통해 추가적으로 생산되지 않으므로 실험결과 감소한 것으로 보인다[30].

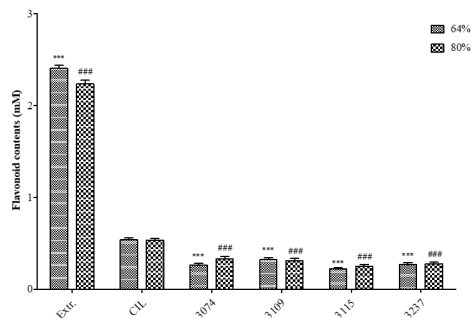


Fig. 2. Contents of flavonoid of CIL fermented with lactic acid bacteria

CIL, *Chrysanthemum indicum* L. extract; 3074, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*; 3109, *Lactobacillus casei*; 3115, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; 3237, *Lactobacillus rhamnosus*; The data are expressed as mean±SD. The significance of the difference was analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. *** $p < 0.001$, comparison between the 64% CIL group; ### $p < 0.001$, comparison between 80% CIL group.

3.4 DPPH 측정

DPPH 측정은 DPPH의 분자에 라디칼이 존재하는 경우 보라색으로 발색되는 것을 이용하는 방법으로 DPPH는 비교적 안정적이기 때문에 항산화제에 의한 감소를 안정적으로 측정할 수 있다. CIL 및 감국 발효 물의 DPPH 측정 결과는 Fig. 3과 같다. 64% CIL의 경우 발효 전 DPPH는 $34.04 \pm 0.94\%$ 였으며, 발효 후 3074, 3109에서 유의하게 증가를 나타냈으나($p < 0.001$), 3237에서는 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$). 80% CIL의 경우 발효 전 DPPH는 $19.67 \pm 0.97\%$ 였으며, 발효 후 모든 균주에서 증가를 나타냈다($p < 0.001$).

본 실험에서 TPC와 flavonoid 결과와 DPPH의 결과는 차이가 존재했다. 그 이유로는 미생물 대사과정에서 phenolic contents와 flavonoid가 분해되며 농도가 감소하지만[25,26,29] chlorogenic acid나 luteoloside와 같은 물질들은 효소의 분해과정에 의해 항산화능이 증가하기도 한다. 그 예로 감국과 국화의 기능성 물질 중 하나인 chlorogenic acid는 caffeic acid와 quinic acid가 ester 결합으로 연결되어 있는 물질이나 동량의 caffeic acid에 비해 약한 항산화능을 나타낸다[16]. 또한, 단백질 역시 고분자 상태에서는 낮은 항산화능을 나타내지만 저분자로 분해되는 과정에서 항산화능이 높아진다[31].

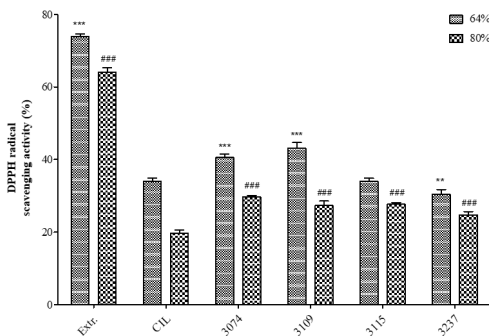


Fig. 3. DPPH radical rate of CIL fermented with lactic acid bacteria

CIL, *Chrysanthemum indicum* L. extract; 3074, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*; 3109, *Lactobacillus casei*; 3115, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; 3237, *Lactobacillus rhamnosus*. The data are expressed as mean \pm SD. The significance of the difference was analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparison between the 64% CIL group; ### $p < 0.01$, comparison between 80% CIL group.

3.5 Reducing power 측정

RP 측정은 Oyaizu의 방법[22]을 변형하여 사용하였다. 이 방법은 철이 이온화되었을 때 2가 철이온(Fe^{2+})과 3가 철이온(Fe^{3+})의 색이 다른 것을 이용하는 것으로 Fe^{3+} 이 환원제에 의하여 Fe^{2+} 으로 환원되었을 때 색 변화를 측정한다. Fig. 4의 결과에서 64% CIL의 경우 발효 전 RP는 0.103 ± 0.036 mg/mL였으며, 발효 후 모든 균주에서 증가를 나타냈으며, 그 중 3109의 증가가 가장 높게 나타났다. 80% CIL의 경우도 발효 전 농도는 0.114 ± 0.040 mg/mL였으며, 발효 후 모든 균주에서 증가했으며, 특히 3109은 증가가 가장 높게 나타났으나, 유의성은 나타나지 않았다.

RP 측정은 DPPH 측정과 유사한 경향을 보였다. 발효과정은 reductone을 생성하여 환원력을 증가시킬 수 있다[32]. Reductone은 unsaturated diol 중 두 개의 hydroxyl group 사이 이중결합이 존재하는 동시에 ketone group이 존재하는 물질을 말하며, ascorbic acid와 maillard reaction products가 이에 속한다. 또한, 환원력 증가의 원인 중 하나로 단백질의 분해를 들 수 있다. Canabady-Rochelle의 연구[33]에 의하면 단백질의 소수성과 크기에 의해 환원력이 높아지며, 소수성 아미노산으로 이루어진 dipeptide가 가장 높은 환원력을 보였다. 유산균의 경우 대부분 protease 활성을 나타내는데, 본 연구에서 환원력이 증가한 요인 중 하나로 유추할 수 있다.

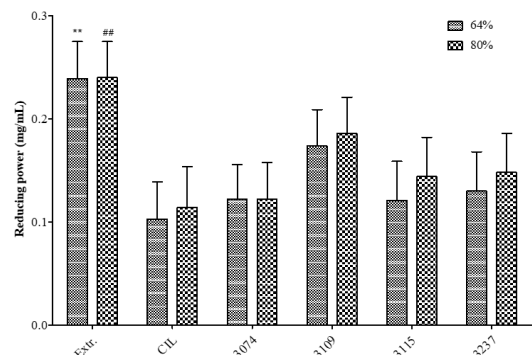


Fig. 4. Reducing power of CIL fermented with lactic acid bacteria

CIL, *Chrysanthemum indicum* L. extract; 3074, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*; 3109, *Lactobacillus casei*; 3115, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; 3237, *Lactobacillus rhamnosus*. The data are expressed as mean \pm SD. The significance of the difference was analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. ** $p < 0.01$, comparison between the 64% CIL group; ## $p < 0.01$, comparison between 80% CIL group.

3.6 Linoleic acid 자동산화 저해 활성

Linoleic acid 자동산화 저해활성 측정 결과는 Fig. 5와 같다. 64% CIL의 경우 발효 전 linoleic acid 자동산화 저해활성은 $56.06 \pm 1.14\%$ 였으며, 발효 후 모든 균주에서 유의하게 감소를 나타냈으며($p < 0.001$), 80% CIL의 경우 발효 전 linoleic acid 자동산화 저해활성은 $66.18 \pm 1.38\%$ 였으며, 발효 후 모든 균주에서 유의하게 감소하였다($p < 0.001$).

Linoleic acid는 불포화 지방산의 일종으로, 공기 중에서 자연적으로 산패가 진행되며, 산패된 불포화 지방산을 섭취하였을 경우 세포막의 파괴, 노화, 심장질환, 암 발생가능성 증가 등 여러 문제가 발생할 수 있다[34]. 산패를 막기 위해서 산소 차단, 저온 보관, 식물유래 phenolic compound의 처리 등 다양한 방법이 사용되고 있다[35]. 본 연구에서도 불포화 지방산인 linoleic acid를 이용하여 CIL 및 감국 발효물의 자동산화 저해활성을 각 측정하였으며, 모든 균주에서 감소하였다. 이러한 경향은 flavonoid의 발효 전 후 변화와도 유사하다. Wang의 연구[36]에 따르면 flavonoid가 자동산화 저해활성을 가지고 있다고 보고하였고, 이를 토대로 발효에 의해 감소된 flavonoid에 의해 linoleic acid 자동산화 저해활성 역시 감소하였다고 추측할 수 있다.

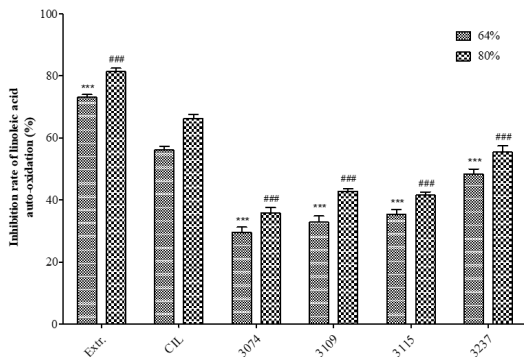


Fig. 5. Inhibition of linoleic acid auto-oxidation of CIL fermented with lactic acid bacteria

CIL, *Chrysanthemum indicum* L. extract; 3074, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*; 3109, *Lactobacillus casei*; 3115, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; 3237, *Lactobacillus rhamnosus*. The data are expressed as mean \pm SD. The significance of the difference was analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. *** $p < 0.001$, comparison between the 64% CIL group; ### $p < 0.001$, comparison between 80% CIL group.

4. 결론

항산화능은 식물 추출물의 평가에 가장 자주 사용되는 지표로, 섭취 시 체내 활성 산소의 저해, 염증 반응의 경감, 세포 및 유전물질의 손상 방지 등 다양한 작용을 하며, 제품에 포함 시 제품의 산패를 방지하는 효과가 있다. 이를 알아보기 위해 TPC, flavonoid, DPPH, RP, linoleic acid 자동산화 저해활성을 측정하였다. TPC 측정으로 3109, 3237에서 증가, 3074, 3115에서는 감소하였다. Flavonoid는 모든 균주에서 감소를 보였다. DPPH 측정에서 64% CIL의 경우 3074, 3109에서 증가를 나타냈으며, 3115, 3237에서는 감소하였다. 80% CIL의 경우, 발효 후 모든 균주에서 증가하였다. RP 측정에서는 발효 후 모든 균주에서 증가를 나타냈으며, 그 중 3109의 증가가 가장 높게 나타났다. linoleic acid 자동산화 저해활성에서는 발효 후 모든 균주에서 감소를 나타냈다. 결과적으로 CIL의 발효는 발효과정에서 생성된 효소와 활성산소에 의해 flavonoid 및 flavonoid와 직접 관련된 지질 산화 억제능을 감소시키는 결과를 보였다. 그렇지만 항산화능을 전반적으로 평가하는데 사용되는 DPPH 측정과 RP의 측정 결과 대부분의 균주에서 증가 또는 CIL의 항산화능과 비슷한 수치를 보였다. 이는 발효를 통해 항산화능이 증가했다는 선행연구[26, 29, 32]의 결과와 일치하였다. 특히, 3109로 발효한 경우 DPPH와 RP의 확인한 증가를 보였으며, flavonoid는 소모되었으나, 그 외의 전반적인 항산화능이 발효과정을 통해 증가되었음을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

- [1] M. Niva. (2007). 'All foods affect health': Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite*, 48(3), 384-393. DOI : 10.1016/j.appet.2006.10.006
- [2] E. G. Mun, B. Kim, E. Y. Kim, H. J. Lee, Y. Kim, Y. Park & Y. S. Cha. (2018). Research trend in traditional fermented foods focused on health functional evaluation. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 47(4), 373-386. DOI : 10.3746/jkfn.2018.47.4.373
- [3] K. Y. Park. (2012). Increased health functionality of fermented foods. *Food Industry and Nutrition*,

- 17(1), 1-8.
- [4] D. Shin & D. Jeong. (2015). Korean traditional fermented soybean products: *Jang. Journal of Ethnic Foods*, 2(1), 2-7.
DOI : 10.1016/j.jef.2015.02.002
- [5] S. Parekh, V. A. Vinci & R. J. Strobel. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 54(3), 287-301.
DOI : 10.1007/s002530000403
- [6] S. R. Couto & M. Á. Sanromán. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291-302.
DOI : 10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022
- [7] H. Y. Ahn, K. R. Park, Y. R. Kim, J. Y. Cha & Y. S. Cho. (2013). Chemical characteristics in fermented cordycepin-enriched *Cordyceps militaris*. *Journal of Life Science*, 23(8), 1032-1040.
DOI : 10.5352/jls.2013.23.8.1032
- [8] L. Aguirre, E. M. Hebert, M. S. Garro & G. S. de Giori. (2014). Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains on soybean proteins. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 780-785.
DOI : 10.1016/j.lwt.2014.06.061
- [9] K. R. Pandey, S. R. Naik & B. V. Vakil. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics—a review. *J Food Sci Technol*, 52(12), 7577-7587.
DOI : 10.1007/s13197-015-1921-1
- [10] V. Lei, W. K. A. Amoah-Awua & L. Brimer. (1999). Degradation of cyanogenic glycosides by *Lactobacillus plantarum* strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganisms. *Int J Food Microbiol*, 53(2-3), 169-184.
DOI : 10.1016/s0168-1605(99)00156-7
- [11] D. O. Otieno, J. F. Ashton & N. P. Shah. (2006). Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 39(4), 394-407.
DOI : 10.1016/j.foodres.2005.08.010
- [12] S. Srivastava, D. Singh, S. Patel & M. R. Singh. (2017). Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress in autoimmune disorders. *Int J Biol Macromol*, 101, 502-517.
DOI : 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.100
- [13] M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald & K. Robards. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.
DOI : 10.1039/b009171p
- [14] S. G. Lee. (2013). *Quality control of Chrysanthemum species by simultaneous determination of phenolic compounds*. Master's thesis, Chungang University, Seoul.
- [15] H. G. Kim, J. H. Ko, Y. G. Lee, H. S. Pak, D. C. Kim, K. S. Son, Y. S. Baek, O. K. Kwon, H. K. Shin & N. I. Baek. (2016). Flavonoids from the flower of *Chrysanthemum morifolium*. *J Appl Biol Chem*, 59(4), 357-360.
DOI : 10.3839/jabc.2016.060
- [16] Y. Sato, S. Itagaki, T. Kurokawa, J. Ogura, M. Kobayashi, T. Hirano, M. Sugawara & K. Iseki. (2011). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm*, 403(1-2), 136-138.
DOI : 10.1016/j.ijpharm.2010.09.035
- [17] H. J. Oh & C. S. Kim. (2007). Antioxidant and nitrite scavenging ability of fermented soybean foods (*Chungkukjang*, *Doenjang*). *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 36(12), 1503-1510.
DOI : 10.3746/jkfn.2007.36.12.1503
- [18] J. Y. Choi, J. S. Lim, B. R. Sim & Y. H. Yang. (2020). Inhibitory effect of lactic acid bacteria-fermented *Chrysanthemum indicum* L. on adipocyte differentiation through hedgehog signaling. *Journal of Life Science*, 30(6), 532-541.
DOI : 10.5352/jls.2020.30.6.532
- [19] V. Dewanto, X. Wu, K. K. Adom & R. H. Liu. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, 50(10), 3010-3014.
DOI : 10.1021/jf0115589
- [20] M. Moreno, M. I. Isla, A. R. Sampietro & M. A. Vattuone. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol*, 71(1-2), 109-114.
DOI : 10.1016/s0378-8741(99)00189-0.
- [21] M. S. Blois. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- [22] M. Oyaizu. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
DOI : 10.5264/eiyogakuzashi.44.307

- [23] H. Haraguchi, K. Hashimoto & A. Yagi. (1992). Antioxidative substances in leaves of *Polygonum hydropiper*. *J Agric Food Chem*, 40, 1349-1351. DOI : 10.1021/jf00020a011
- [24] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller & G. Paganga. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159. DOI : 10.1016/S1360-1385(97)01018-2
- [25] N. B. Othman, D. Roblain, N. Chammen, P. Thonart & M. Hamdi. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chem*, 116(3), 662-669. DOI : 10.1016/j.foodchem.2009.02.084
- [26] M. S. Oliveira, E. P. Cipolatti, E. B. Furlong & L. S. Soares. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activity in fermented rice (*Oryza sativa*) bran. *Food Science and Technology (Campinas)*, 32(3), 531-537. DOI : 10.1590/s0101-20612012005000071
- [27] J. I. Hong, H. J. Kim & J. Y. Kim. (2011). Factors affecting reactivity of various phenolic compounds with the Folin-Ciocalteu reagent. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 40(2), 205-213. DOI : 10.3746/jkfn.2011.40.2.205
- [28] N. Rajapakse, E. Mendis, W. K. Jung, J. Y. Je & S. K. Kim. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38(2), 175-182. DOI : 10.1016/j.foodres.2004.10.002
- [29] F. O. Adetuyi & T. A. Ibrahim. (2014). Effect of fermentation time on the phenolic, flavonoid and vitamin C contents and antioxidant activities of okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds. *Nigerian Food Journal*, 32(2), 128-137. DOI : 10.1016/s0189-7241(15)30128-4
- [30] N. S. Alrawaiq & A. Abdullah. (2014). A review of flavonoid quercetin metabolism bioactivity and antioxidant properties. *Int J PharmTech Res*, 6(3), 933-941.
- [31] J. Chen, S. Liu, R. Ye, G. Cai, B. Ji & Y. Wu. (2013). Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1684-1692. DOI : 10.1016/j.jff.2013.07.013
- [32] J. H. Yang, J. L. Mau, P. T. Ko & L. C. Huang. (2000). Antioxidant properties of fermented soybean broth. *Food Chem*, 71(2), 249-254. DOI : 10.1016/S0308-8146(00)00165-5
- [33] L. L. S. Canabady-Rochelle, C. Harscoat-Schiavo, V. Kessler, A. Aymes, F. Fournier & J. M. Girardet. (2015). Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. *Food Chem*, 183, 129-135. DOI : 10.1016/j.foodchem.2015.02.147
- [34] J. P. Cosgrove, D. F. Church & W. A. Pryor. (1987). The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 22(5), 299-304. DOI : 10.1007/BF02533996
- [35] S. Maqsood, S. Benjakul, A. Abushelaibi & A. Alam. (2014). Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: A detailed review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1125-1140. DOI : 10.1111/1541-4337.12106
- [36] P. F. Wang & R. L. Zheng. (1992). Inhibitions of the autoxidation of linoleic acid by flavonoids in micelles. *Chem Phys Lipids*, 63(1-2), 37-40. DOI : 10.1016/0009-3084(92)90019-1

이 자 복 (Ja-bok Lee)

[정회원]



- 2018년 2월 : 건국대학교 생물공학과(이학박사)
- 2017년 9월 ~ 현재 : ㈜엘파운더 대표이사
- 관심분야 : 피부과학, 유산균, 기능성화장품, 생물학, 발효
- E-Mail : hyunmins1@hanmail.net

최 재 영 (Jae Young Choi)

[정회원]



- 2021년 2월 : 건국대학교 생물공학과(공학박사)
- 2018년 4월 ~ 현재 : 연세대학교 호텔외식조리학과 호텔조리전공 교수
- 관심분야 : 미생물학, 식품학
- E-Mail : juynay@yeonsung.ac.kr