

The Antioxidant, Alcohol Metabolizing Enzyme, and Hepatoprotective Activities of *Dendropanax morbifera* Vinegar with Traditional Fermentation Methods

Kyung Im Jung, Han Nah Jung and Young Ju Choi*

Department of Food & Nutrition, Silla University, Busan 46958, Korea

Received February 7, 2022 / Revised March 15, 2022 / Accepted March 17, 2022

This study was performed to investigate the organic acids, alcohol metabolism enzyme, and anti-oxidative, nitrite-scavenging, and hepatoprotective effects of *Dendropanax morbifera* vinegar prepared by a traditional fermentation method. Among the organic acids detected, acetic acid was the highest found, at 91.72 mg/ml, followed by lactic acid (7.31 mg/ml), malic acid (1.36 mg/ml), and succinic acid (1.20 mg/ml). The total polyphenol content of the *D. morbifera* vinegar was 13.73 µg tannic acid equivalent (TAE)/ml. The 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of *D. morbifera* vinegar was 76.04% at a 60% concentration. The superoxide dismutase (SOD) activity of *D. morbifera* vinegar was increased in a dose-dependent manner, which was 95.14% at a 60% concentration, while the α-glucosidase inhibitory activity of *D. morbifera* vinegar was 98.94% at a 10% concentration. The effects of *D. morbifera* vinegar on alcohol metabolism were determined by measuring the generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) by alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH). The ADH and ALDH activities of *D. morbifera* vinegar were increased in a dose-dependent manner, 43.62% and 60.39% at a 60% concentration, respectively. The *D. morbifera* vinegar showed significant protective effects against tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells at the 0.6% concentration. These results suggest that *D. morbifera* vinegar has great potential as a resource for high quality functional health beverages.

Key words : Alcohol dehydrogenase, antioxidant, *Dendropanax morbifera*, hepatoprotective, vinegar

서 론

발효식품은 미생물이 생산하는 2차 대사산물과 다양한 유기물을 포함하고 있어 원래의 식품에는 없던 독특한 풍미를 만들어내므로 조미료나 음료 등의 기호 식품으로서의 역할이 커지게 되었다[27]. 식초는 가장 오래된 대표적인 발효 식품 중 하나로 특유의 향미를 부여하여 음식의 맛을 풍부하게 하고 식욕을 향상시키는 조미료로 많이 이용되어 왔다[3]. 최근에는 식초에 대한 여러 가지 효과가 과학적으로 입증됨에 따라 다양한 천연물을 활용하여 개발된 식초가 기능성 건강 음료로서 소비되는 경향이 높아지고 있다[7, 26]. 과일이나 곡류를 원료로 하여 효모에 의해 당이 알코올로 발효되고, 초산균에 의해 알코올이 초산으로 전환되는 발효 공정을 통해 제조되는 발효 식초는 발효 과정 중에 생성되는 유기산이 활성산소를 제거하는 역할을 한다고 알려져 있다[5, 36]. 전통 발효 식초는 원료의 종류에 따라 초산 이외에도 다양한 유기산과

아미노산, 유리당 및 기능성분들이 포함되어 있다고 보고됨에 따라 오디[3], 아로니아[10], 양파[11], 천도복숭아[12], 야콘[22], 감귤[23], 밀[7], 현미[28, 40] 등 다양한 과실과 곡류를 이용한 식초 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 전통 발효 식초는 노화 방지와 당뇨 및 동맥경화 예방뿐만 아니라 피부 미용, 체지방 감소 등 다양한 생리활성이 보고되어 단순한 조미료가 아닌 건강식품으로 소비자들의 관심이 증가하는 추세이다[8, 11, 22].

두릅나무과에 속하는 황칠나무(*Dendropanax morbifera*)는 우리나라에는 1속 1종만 있는 특산 식물로 해남, 완도, 보길도, 제주도 등의 서남해안 지역 및 일부 온대지역에서 자생하는 난대성 상록 활엽수로 수피에 상처를 내면 흘러나오는 황색의 유액은 예로부터 고급 도료로 사용되었다[14, 16, 19]. 황칠은 quercetin과 chlorogenic acid, rutin 및 ferulic acid 등의 자체적으로 항산화효과를 나타내는 phytochemical을 함유하고 있으며, 이러한 물질의 항산화능에 기반한 여러 효과들이 보고되고 있다[9, 16]. 또한 sesquiterpene 등의 정유 성분 및 arginine, palmitic acid, arachidic acid 등의 성분을 함유하여 지질 개선 효과[33]와 면역활성 증진[21, 25] 및 당뇨병 개선[2] 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 기능성 소재로서 황칠에 대한 새로운 가치가 보고됨에 따라 화장품 및 약제에 활용된 연구는 활발히 진행되고 있으나 식품 산업에서의 활용은 거의 없는 실정이다[14].

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5459, Fax : +82-51-999-5657

E-mail : yjchoi@silla.ac.kr

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.

따라서 본 연구에서는 전통적인 방법으로 황칠나무 잎과 줄기를 이용한 식초를 제조하여 유기산 함량을 분석하고 항산화 효과와 항당뇨 효과, 알코올 분해 효과 및 간보호 효과에 대한 생리활성을 측정하여 황칠을 이용한 기능성 식초 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용한 황칠 잎과 줄기는 전라남도 보길도에서 채취한 것을 구입하여 사용하였고, 누룩(농업법인(주)송학곡자, Gwangju, Korea)은 인터넷으로 구매하였으며, 생수(Samdasoo, Jeju, Korea)와 참쌀(Nonghyup, Jangheung, Korea)은 시중에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 모든 시약은 Sigma Chemical사(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다.

식초의 제조

황칠을 이용한 식초는 전통적인 식초 제조 방법인 2단계 자연발효 과정을 거쳐 제조하였다. 먼저 깨끗이 씻은 참쌀에 정제수를 부어 12시간 불린 후 증기로 1시간 30분간 가열하고 30분간 뜸을 들여 지은 고두밥은 25℃로 냉각하였다. 또 황칠 잎 250 g과 줄기 250 g에 5배량의 생수를 넣고 끓인 후 면포에 걸러 25℃로 냉각하였다. 고두밥 1 kg에 누룩 200 g을 넣고 황칠 잎과 줄기를 끓여 냉각한 물 1.5 l를 섞어 잘 버무린 후 항아리에 담고 25℃에서 30일간 알코올 발효를 시켰다. 알코올 발효가 끝나면 면포에 거른 맑은 액에 30%의 중초를 첨가하여 15℃에서 3개월간 초산 발효를 시켰으며, 발효가 끝난 황칠 식초의 pH는 3.24±0.1로 나타났다. 황칠 식초의 생리활성 측정을 위해 발효된 식초는 Whatman No. 2 filter paper (Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과하여 4℃에 보관하며 각각의 농도로 희석한 시료를 실험에 사용하였다.

유기산 함량 측정

황칠 식초의 유기산 함량은 HPLC (Model Prominence, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 분석하였다. Column은 PL Hi-Plex H (300 mm × 7.7 mm)를 사용하였고, 이동상 용매는 0.005 M H₂SO₄ 용액으로 0.6 ml/min의 속도로 주입하였으며, 분석 온도는 30℃를 유지하면서 20 μl의 시료를 주입하여 210 nm에서 측정하였다. 황칠 식초에서 분리된 각 피크는 acetic acid와 lactic acid, succinic acid, malic acid, tartaric acid 및 citric acid의 표준 곡선으로부터 그 함량을 산출하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

황칠 식초의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu법[32]을

약간 변형시켜 측정하였으며 표준물질로는 tannic acid를 사용하여 분석하였다. 1%의 농도로 희석한 황칠 식초를 시험관에 취한 후 증류수를 가하여 2 ml로 정용하고 Folin-Ciocalteu reagent 0.3 ml를 가하여 잘 혼합한 다음 3분간 실온에서 반응시켰다. 혼합물에 7.5% Na₂CO₃ 용액 0.4 ml를 가하여 50℃에서 5분간 발색시킨 다음 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 황칠 식초의 총 폴리페놀 함량은 μg tannic acid equivalents (TAE)/ml로 나타내었다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능 측정

황칠 식초의 DPPH radical 소거능은 Blois의 방법[4]을 약간 변형시켜 DPPH에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 96-well plate에 농도별로 희석한 시료와 150 μM DPPH 용액을 1:1의 비율로 혼합하여 37℃에서 30분간 반응 시킨 후, ELISA reader (Versa Max Microplate Reader, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과의 흡광도 차이를 비교하여 free radical의 제거 활성을 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구 흡광도}}\right) \times 100$$

Super oxide dismutase (SOD) 활성 측정

황칠 식초의 SOD 활성은 SOD assay kit (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, USA)를 사용하여 manufacturer's instruction에 기술된 방법에 따라 수행하였다. 농도별로 희석한 시료 20 μl를 96 well plate에 분주하고 WST working solution 200 μl를 넣고 혼합한 후 enzyme working solution 20 μl를 가하여 37℃에서 20분간 반응시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 효소 대신 20 μl의 dilution buffer를 넣어 측정하였다. SOD 활성은 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{SOD activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구 흡광도}}\right) \times 100$$

α-Glucosidase 활성 억제 효과 측정

황칠 식초의 α-glucosidase 활성 억제 효과는 Tibbot와 Skadsen [34]의 방법에 따라 측정하였다. 기질 용액은 50 mM sodium succinate buffer (pH 4.2)에 p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (PNPG)를 용해시켜 1 mg/ml의 농도로 제조하였다. 반응 용액은 기질 용액 0.2 ml와 효소액(0.075 unit/ml)을 혼합하고 대조구에는 증류수 0.1 ml, 반응구에는 농도별로 희석한 시료 0.1 ml를 넣어 37℃에서 30분간 반응시킨 후 0.1 M Na₂CO₃ 0.1 ml를 첨가하여 발색시켰다. Positive control로

는 acarbose를 사용하였으며 α-glucosidase 효소 활성은 생성된 p-nitrophenol (PNP) 양을 405 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 식으로 저해율(%)을 계산하였다.

$$\alpha\text{-Glucosidase inhibitory activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 p-nitrophenyl 생성량}}{\text{대조구의 p-nitrophenyl 생성량}}\right) \times 100$$

Alcohol dehydrogenase (ADH) 활성 측정

황칠 식초의 ADH 활성은 Choi 등[6]과 Racker [31]의 방법을 변형하여 측정하였으며, 생성된 NADH의 양을 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험관에 alcohol 0.1 ml, NAD 수용액(2 mg/ml) 0.5 ml 및 농도별로 희석한 시료 0.1 ml를 첨가하고 10 mM glycine-NaOH buffer (pH 8.8)를 총 부피가 1.8 ml가 되도록 조절하여 25°C 항온수조에서 10분간 반응시킨 후 ADH (10 unit/ml)를 가하여 340 nm에서 spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, UK)를 이용하여 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 증류수를 첨가하였으며, positive control은 약국에서 구입한 간장 활성화제 hepos (CHO-A Pharm. Co. Ltd., Seoul, Korea)를 50%로 희석하여 사용하였다. ADH의 활성은 다음과 같은 식으로 상대적인 백분율(%)로 계산하였다.

$$\text{Relative ADH activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{실험구의 최대 흡광도}}{\text{대조구의 최대 흡광도}}\right) \times 100$$

Acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성 측정

황칠 식초의 ALDH 활성은 Koivula와 Koivusalo의 방법 [17]을 약간 변형하여 측정하였다. 반응 용액은 증류수 2.1 ml, 1.0 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.3 ml, 20 mM NAD⁺ 0.1 ml, 0.1 M acetaldehyde 0.1 ml, 3.0 M KCl 0.1 ml, 0.33 M 2-mercaptoethanol 0.1 ml 및 농도별로 희석한 시료 0.1 ml를 혼합하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 ALDH (1 unit/ml) 0.1 ml를 첨가하여 25°C 항온수조에서 5분간 반응시킨 다음 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 TE buffer (pH 8.0)를 첨가하여 상대 활성(%)으로 나타내었고, positive control은 50% 농도의 hepos를 사용하였으며 ADH 활성 측정식과 동일한 식을 사용하여 ALDH 활성을 측정하였다.

HepG2 세포 배양

실험에 사용한 간암 세포인 HepG2 세포는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였으며 세

포의 배양을 위해 10% heat-inactivated fetal bovine serum 및 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 MEM (Cellgro by Mediatech, Inc., Manassas, VA, USA) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

Cell viability 및 간세포 보호 효과 측정

세포의 성장과 cell viability를 확인하기 위해 96-well cell culture plate (SPL Lifesciences, Gyeonggi-do, Korea)에 HepG2 세포를 배지 100 µl에 1×10⁴ cells/well의 농도로 각 well에 분주하고 황칠 식초를 농도별로 동시에 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후 EZ-Cytox Cell viability assay solution WST-1[®] (Daeil Lab Service, Seoul, Korea)을 각 well에 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 3시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 460 nm에서 흡광도를 측정하였다.

간세포 보호 효과 측정을 위해 96-well cell culture plate에 HepG2 세포를 배지 100 µl에 1×10⁴ cells/well의 농도로 각 well에 분주하였다. 그리고 tacrine (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) 및 다양한 농도의 황칠 식초를 동시에 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간의 배양 후 EZ-Cytox Cell viability assay solution WST-1[®]을 각 well에 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 3시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 460 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험결과는 통계 SAS package (Statistical Analysis System, Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 각 시료의 평균과 표준편차를 계산하였고, 분산분석(ANOVA)과 Duncan's multiple range test를 실시하여 p<0.05 level에서 시료 간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

유기산 함량

황칠 식초의 유기산 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. Acetic acid가 91.72 mg/ml로 가장 높았고, 그 다음으로 lactic acid 7.31 mg/ml, malic acid 1.36 mg/ml, succinic acid 1.20 mg/ml 순으로 나타났으며, tartaric acid와 citric acid는 함유되지 않은 것으로 나타났다. Jang 등[10]은 0~30%의 종초 첨가량에 따른 아로니아 식초의 유기산은 acetic acid, succinic acid, malic acid의 3종으로 이 중 acetic acid가 총 유기산의

Table 1. Contents of organic acid (mg/ml) of *Dendropanax moribifera* vinegar

| Sample | Acetic acid | Lactic acid | Succinic acid | Malic acid | Tartaric acid | Citric acid |
|---------------------------------------|-------------|-------------|---------------|------------|------------------|-------------|
| <i>Dendropanax moribifera</i> vinegar | 91.72 | 7.31 | 1.20 | 1.36 | ND ¹⁾ | ND |

¹⁾Not detected.

4.29~9.2%로 가장 많이 함유된 주요 유기산으로 보고하였고, Bang 등[3]은 오디 식초의 유기산은 acetic acid, succinic acid, citric acid 로 그 중 acetic acid가 가장 많은 것으로 보고하였으며, Jung 등[12]은 천도복숭아 식초의 유기산은 acetic acid, succinic acid, malic acid, lactic acid로 acetic acid가 32.42 mg/ml로 가장 많이 함유된 것으로 보고하여 본 연구결과의 주요 유기산인 acetic acid와 동일한 결과였다. 그러나 Lee 등[23]은 40%의 감귤 미숙과 과즙을 첨가한 식초의 유기산은 lactic acid가 가장 높았고 그 다음으로는 acetic acid, citric acid, malic acid, tartaric acid, oxalic acid로 보고하여 본 연구와는 차이가 있었는데 이와 같은 결과는 초산 발효 시의 균주 사멸기에 영양분 공급이 불충분할 경우에 acetic acid가 아닌 부산물로 lactic acid가 생성되거나[38] 발효 초기에 젖산균에 의한 결과로 보고되고 있다[40]. 본 연구결과 황칠 식초는 포도 및 사과와 신맛에 기여하는 malic acid 뿐만 아니라[39] 식초의 풍미를 향상시키는 것으로 알려진 succinic acid도 함유되어 있기에 산미와 풍미가 우수한 제품으로 개발 가능할 것으로 생각된다. 한편 Park 등[29]은 군주에 따른 황칠 발효 된장의 유기산은 lactic acid가 22.1~48.4 mg/ml로 가장 높았고 그 외 oxalic acid, citric acid, pyroglutamic acid, malic acid 가 검출되어 황칠 식초의 유기산 함량과는 차이가 있었는데, 이는 된장 중에 생육하는 내염성 젖산균의 작용으로 lactic acid가 가장 많이 검출된 것으로 판단하였다.

총 폴리페놀 함량

황칠나무 잎에는 chlorogenic acid, ferulic acid, resveratrol, quercetin, myricetin, rutin, (+)-catechin 등의 페놀성 화합물들이 함유된 것으로 알려져 있다[9]. 따라서 본 연구에서는 전통적인 방법으로 제조한 황칠 식초의 총 폴리페놀 함량을 tannic acid 표준 곡선으로부터 측정된 결과 13.73 µg TAE/ml로 나타났다(Table 2). Lee 등[23]은 감귤 미숙과와 완숙과의 총 폴리페놀 함량은 각각 1,546.6 µg gallic acid equivalent (GAE)/ml와 230.9 µg GAE/ml로 미숙과 식초가 더 높은 것으로 보고하였고, Jung 등[12]은 천도복숭아 식초의 총 폴리페놀 함량은 121.84 µg TAE/100 ml로 보고하였으며, Bang 등[3]은 오디 주스와 오디 식초의 총 폴리페놀 함량은 각각 841.79 µg GAE/ml와 778.06 µg GAE/ml로 발효에 의해 폴리페놀 함량은 감소하는 것으로 보고하였는데, 이는 초산 발효 과정에서 강한 페

Table 2. Total polyphenol contents of *Dendropanax morbifera* vinegar

| Sample | Total polyphenol (µg TAE/ml) ¹⁾ |
|--------------------------------------|--|
| <i>Dendropanax morbifera</i> vinegar | 13.73±2.00 ²⁾ |

¹⁾TAE standards for tannic acid equivalent.

²⁾Results are mean ± SD of triplicate data.

놀 분해 작용이 발생하여 식초의 총 폴리페놀 함량이 감소한다고 하였다[1]. 천연물에 널리 존재하는 phytochemical의 한 종류인 폴리페놀 화합물은[39] 전자나 수소를 제공함으로써 활성산소에 대해 손상되는 단백질과 효소, 세포막 및 DNA 등에 대해 항산화 작용에 중요한 역할을 하는 물질로 알려져 있으며[35], 항암 작용과 콜레스테롤 저하 작용 등 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고되어 있다[15].

DPPH radical 소거능

DPPH assay는 분자 내 radical을 갖고 있는 자색의 diphenylpicrylhydrazyl이 항산화 물질에 의해 수소나 전자를 받아 비가역적으로 안전한 분자인 diphenylpicrylhydrazine을 형성하며 환원됨에 따라 자색에서 탈색되는 원리를 이용한 측정법으로[37] 재현성이 높은 비교적 간단한 방법이기때문에 천연물의 항산화 효과를 알아보기 위해 널리 사용되는 방법 중의 하나이다[3]. 따라서 본 연구에서 10%와 20%, 40% 및 60% 농도로 희석한 황칠 식초의 DPPH radical 소거능을 측정할 결과(Fig. 1) 각각 36.87%와 42.32%, 60.67% 및 76.04%로 농도의존적으로 DPPH radical 소거능이 증가하였다($p < 0.05$). Lee 등[23]은 감귤 미숙과와 감귤 완숙과 식초의 DPPH radical 소거능은 각각 29.0%와 5.0%로 감귤 미숙과 식초의 DPPH radical 소거능이 높은 것으로 보고하였고, Jung 등[12]은 천도복숭아 식초 40% 농도에서의 DPPH radical 소거능은 84.47%로 보고하였으며, Jang 등[10]은 0~30%의 종초 첨가량에 따른 아로니아 식초의 DPPH radical 소거능은 발효 10일차에서 45.00%~33.53%로 종초 첨가량이 증가할수록 DPPH radical 소거능이 감소하는 것으로 보고하였는데 이는 phenolic hydroxyl group이 산화되어 radical 소거능이 낮아지는 것으로 보고하였다. 한편 LEE 등[24]은 황칠나무 잎 70% 에탄올 추출물 0.1, 0.5, 1, 5 mg/ml농도에서의 DPPH radical 소거능은

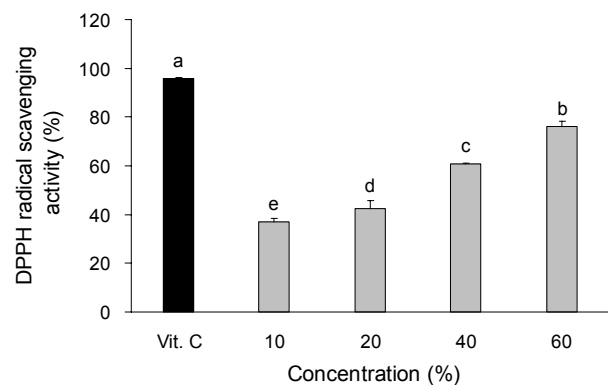


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of *Dendropanax morbifera* vinegar. Results are mean ± S.D. of triplicate data. Vitamin C (Vit. C, 0.1 mg/ml) is used as positive control. Different letters (a-e) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

각각 19.1%, 44.7%, 76.4% 및 89.8%로 보고하였다. 황칠나무에는 resveratrol과 chlorogenic acid, rutin 및 quercetin 등의 페놀성 화합물이 함유되어 있지만 황칠나무의 특정 지표성분으로 활용 가능한 신규 성분들이 보고된 연구는 거의 없는 실정이다[19]. 본 연구결과 황칠 식초의 높은 DPPH radical 소거능을 확인하였으며, 이는 황칠에 다량 함유되어 있는 페놀성 화합물과 발효 공정에 의해 생성된 유기산에 의한 결과라 생각된다.

SOD 활성

본 연구에서는 10%와 20%, 40% 및 60% 농도로 희석한 황칠 식초의 SOD 활성을 측정하였다(Fig. 2). 그 결과 농도 의존적으로 SOD 활성은 증가하였으며 각각의 농도에서 43.51%와 67.36%, 85.48% 및 95.14%로 높게 나타났다($p < 0.05$). Jung 등 [12]은 천도복숭아 식초 40% 농도에서의 SOD 활성은 61.44%로 보고하였고, Jeong 등[11]은 양파 식초의 SOD 유사 활성은 58.58%로 보고하였다. 천연물에서 SOD 활성이나 SOD 유사 활성을 나타내는 물질을 탐색하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있으나, 황칠나무나 황칠 식초의 SOD 활성 및 SOD 유사 활성에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구결과 황칠 식초는 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능 및 SOD 활성 또한 높은 것으로 나타났기에 천연 항산화제로서의 활용 가치가 높을 것으로 판단된다.

α -Glucosidase 저해 효과

황칠 식초로부터 당 분해를 억제 할 수 있는 가능성을 확인하기 위하여 당질 소화 효소인 α -glucosidase의 저해능을 acarbose를 양성 대조군으로 하여 측정하였다. 그 결과(Fig. 3) 1%와 2%, 5% 및 10%의 농도로 희석한 황칠 식초에서 각각 42.92%, 53.52%, 97.51%, 98.94%로 농도 의존적으로 α -glucosidase

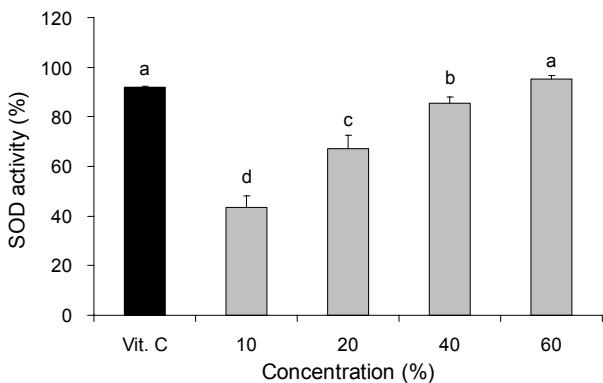


Fig. 2. Superoxide dismutase (SOD) activity of *Dendropanax morbifera* vinegar. Results are mean \pm S.D. of triplicate data. Vitamin C (Vit. C, 0.5 mg/ml) is used as positive control. Different letters (a-d) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

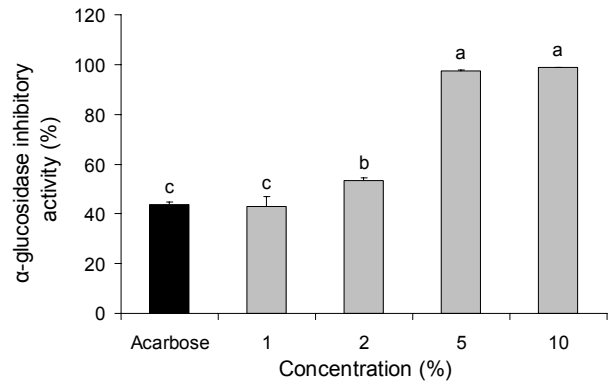


Fig. 3. Inhibitory effects of *Dendropanax morbifera* vinegar on α -glucosidase activity. Results are mean \pm S.D. of triplicate data. Acarbose (0.05 mg/ml) is used as positive control. Different letters (a-c) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

저해 효과가 증가하였다($p < 0.05$). 양성 대조군으로 사용한 acarbose는 비만 억제 및 혈당 조절의 수단으로 개발되었으나 복통과 설사 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있기에 이를 대체할 수 있는 천연물의 탐색이 필요한 실정이다[28]. 본 연구결과 황칠 식초는 α -glucosidase에 의한 식사 후 혈당의 급격한 상승을 억제하여 단당류 생성을 효율적으로 저해 가능할 것으로 판단된다. 한편 Noh와 Pyo [28]는 α -glucosidase 저해 활성을 IC₅₀으로 확인한 결과 홍국발효 곡물식초는 0.09 mg/ml, 양성 대조군인 acarbose는 0.10으로 홍국발효 곡물식초의 저해 효과가 높은 것으로 보고하였고, Lee 등[22]은 야콘 식초가 제2형 당뇨병마우스에서의 혈당 변화를 측정할 결과 대조군에 비해 공복 시 혈당을 유의적으로 저하시키는 것으로 보고하였다.

Alcohol 분해 활성

음주로 인하여 발생하는 숙취를 해소하기 위한 약품이 개발되어 있지만 이들은 자체의 부작용이나 독성으로 인하여 보다 안전한 천연물로부터 유래된 음료에 관심이 모아지고 있으나 [20], 황칠 및 황칠 식초의 알코올 분해 효과에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 알코올 분해 대사의 1차 효소인 aldehyde dehydrogenase (ADH) 활성과 실질적인 숙취 해소 효과를 확인하기 위한 acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성에 대한 황칠 식초의 효과를 확인하였다. 황칠 식초의 ADH 활성을 측정할 결과(Fig. 4) 양성 대조군인 50% 농도의 hepos는 84.53%로 나타났고, 10%와 20%, 40% 및 60% 농도에서의 황칠 식초는 각각 6.64%, 13.21%, 31.85%, 43.62%로 농도 의존적으로 ADH 활성은 증가하였다($p < 0.05$). 음주 후 실제 느끼는 숙취는 acetaldehyde에 의한 것으로 알려져 있으므로 숙취 해소 효과를 확인하기 위하여 ALDH 활성을 측정할 결과(Fig. 5) 50% 농도의 hepos는 66.99%로 나타났

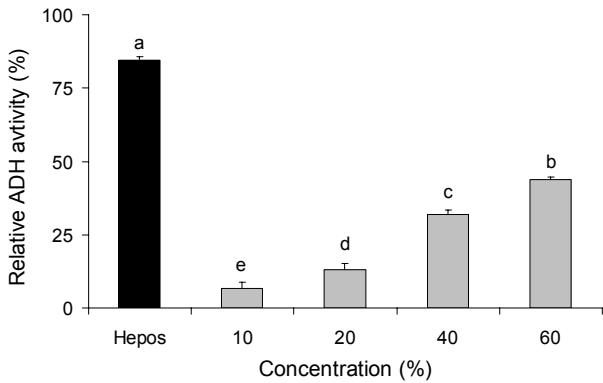


Fig. 4. Effects of *Dendropanax morbifera* vinegar on the alcohol dehydrogenase (ADH) activity. Results are mean \pm S.D. of triplicate data. Hepos (50%) is used as positive control. Different letters (a-e) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

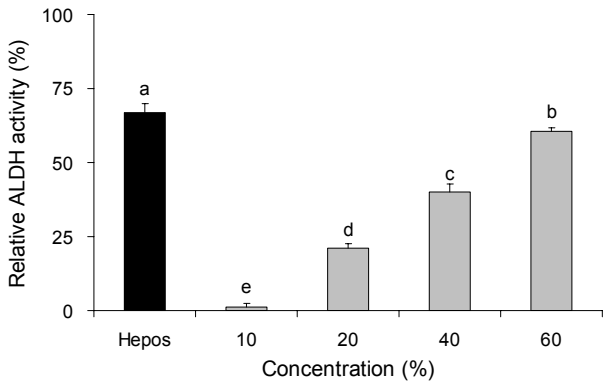


Fig. 5. Effects of *Dendropanax morbifera* vinegar on the acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) activity. Results are mean \pm S.D. of triplicate data. Hepos (50%) is used as positive control. Different letters (a-e) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

고, 10%와 20%, 40% 및 60% 농도에서 황칠 식초의 ALDH 활성은 각각 1.28%, 21.23%, 40.02%, 60.39%로 농도 의존적으로 ALDH 활성은 증가하였다($p < 0.05$). 이상의 결과에서 황칠 식초는 알코올 분해 효과와 함께 숙취의 원인 물질인 acetaldehyde 분해 효과가 높은 것으로 나타났기에 기능성 숙취해소 음료 개발을 위한 기초 자료로 충분한 가치가 있을 것으로 판단된다.

Cell viability 및 간세포 보호 효과

황칠 식초의 세포 독성 측정을 위해 0.1%와 0.2%, 0.5%, 1%, 2% 및 5% 농도로 희석한 시료를 HepG2 세포에 처리하여 세포 생존율을 측정된 결과(Fig. 6), 각각 102.45%, 101.79%, 119.55%, 88.92%, 13.47% 및 15.24%로 1% 이상의 농도에서는 세포 생존율이 급격하게 감소하는 것으로 나타났다. 식초와 같은 대부분의 발효식품에 대한 연구는 건조 및 분말 상태의 시료를

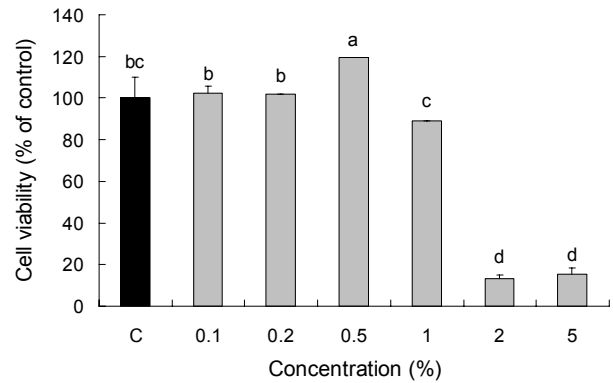


Fig. 6. Effects of *Dendropanax morbifera* vinegar on cell viability in HepG2 cells. Cytotoxicity was determined by WST1 assay. Results are mean \pm S.D. of triplicate data. Different letters (a-d) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

제조하여 실험에 사용하는데, 이와 같은 방법으로는 식초 고유의 효과 검증에 한계가 있을 것으로 생각된다[13]. 따라서 이후 진행된 세포 실험은 대조군과 유의적인 차이가 없으므로 나타난 1% 미만의 농도로 진행하였다.

본 연구에서는 간세포 보호 효과 실험에 주로 사용되는 HepG2 간암 세포주를 이용하여 간세포 보호 효과를 확인하였다. HepG2 세포에 황칠 식초와 알츠하이머 치료제로서 사용되지만 간 독성을 유발하는 물질인 tacrine을 동시에 처리했을 때 황칠 식초가 해당 세포주에 미치는 독성 및 간 보호 효과를 확인하였다. 먼저 tacrine 단독으로 HepG2 세포에 처리하여 세포의 성장을 확인하고 또한 tacrine과 황칠 식초를 함께 처리하여 세포의 성장을 비교하였다(Fig. 7). 그 결과 Tacrine 만을 처리했을 때의 세포 생존율은 52.33%로 나타났고, tacrine과 0.1%, 0.4%, 0.6%의 황칠 식초를 함께 처리했을 때의 세포

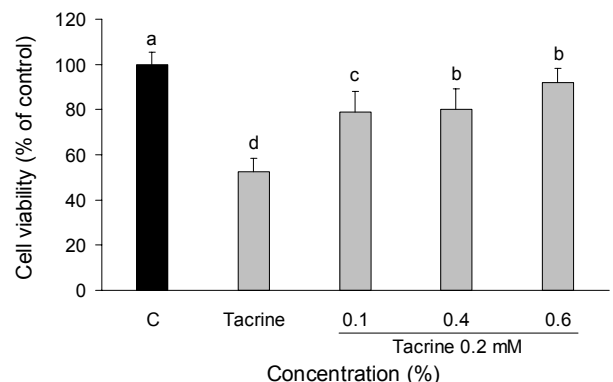


Fig. 7. Hepatoprotective effects of *Dendropanax morbifera* vinegar against tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells. Cytotoxicity was assessed after 2 hr with 0.2 mM of tacrine in RPMI medium. Results are mean \pm S.D. of triplicate data. Different letters (a-d) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

생장율은 각각 78.88%, 80.00%, 92.00%로 tacrine 단독 처리시보다 HepG2 세포 성장율은 각각 50.74%, 52.88%, 75.81% 증가하였다($p < 0.05$). 황칠의 간세포 보호 효과에 대한 연구에서 Lee 등[18]은 *t*-butyl hydroperoxide를 처리한 HepG2 세포에서 황칠 뿌리 에탄올 추출물이 간 보호 효과가 있는 것으로 보고하였고, Park 등[30]은 CCl_4 를 처리한 HepG2 세포에 대한 황칠 잎 열수 추출물 역시 간 보호 효과가 있는 것으로 보고하였다. 지금까지 식초의 간 보호 효과에 대한 연구는 거의 없는 실정으로 본 연구결과 quercetin과 chlorogenic acid 등의 페놀성 화합물이 다량 함유된 황칠나무[9]로 제조한 황칠 식초는 폴리페놀 함량과 DPPH radical 소거능 및 SOD 활성이 높은 것으로 나타났기에 알코올과 tacrine 등의 독성 물질에 의해 증가된 활성산소종을 효과적으로 제어함으로써 간세포 보호 효과가 있는 것으로 사료된다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Andlauer, W., Stumpf, C. and Furst, P. 2000. Influence of the acetification process on phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3533-3536.
- An, N. Y., Kim, J. E., Hwang, D. Y. and Ryu, H. K. 2014. Anti-diabetic effects of aqueous and ethanol extract of *Dendropanax morbifera* Leveille in streptozotocin-induced diabetes model. *J. Nutr. Health* **47**, 394-402.
- Bang, S. I., Gwon, G. H., Cho, E. J., Lee, A. Y. and Seo, W. T. 2020. Characteristics of fermented vinegar using mulberry and its antioxidant activity. *Kor. J. Food Preserv.* **27**, 651-662.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1200.
- Budak, N. H., Aykin, E., Seydim, A. D., Greene, A. K. and Guzel-Seydim, Z. B. 2014. Functional properties of vinegar. *J. Food Sci.* **79**, R757-R764.
- Choi, J. T., Joo, H. K. and Lee, S. K. 1995. The effect of *Schizandrae fructus* extract on alcohol fermentation and enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agri. Chem. Biotech.* **38**, 278-282.
- Cho, K. M., Shin, J. H. and Seo, W. T. 2013. Production of Korean domestic wheat (keumkangmil) vinegar with *Acetobacter pasteurianus* A8. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **45**, 252-256.
- Hwang, Y. J., Cho, H. Y. and Pyo, Y. H. 2016. Effect of unpolished rice vinegar containing *Monascus*-fermented soybean on inhibitory activities of tyrosinase and elastase. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **45**, 149-154.
- Hyun, T. K., Ko, Y. J., Kim, E. H., Chung, I. M. and Kim, J. S. 2015. Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. *Ind. Crops. Prod.* **74**, 263-270.
- Jang, S. W., Jun, H. I., Oh, H. H., Jeong, D. Y. and Song, G. S. 2021. Quality characteristics of aronia vinegar imparted by varying concentrations of seed vinegar. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **50**, 522-530.
- Jeong, E. J., Park, H. J. and Cha, Y. J. 2016. Fermented production of onion vinegar and its biological activities. *Kor. J. Food Nutr.* **29**, 962-970.
- Jung, K. I., Jung, H. N., Ha, N. Y. and Choi, Y. J. 2018. Physicochemical properties, and antioxidative and alcohol-metabolizing enzyme activities of nectarine vinegar. *J. Life Sci.* **28**, 1193-1200.
- Jung, K. I., Kim, B. K., Kang, J. H., Oh, G. H., Kim, I. K. and Kim, M. H. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory activities of water and the fermentation liquid of sea tangle (*Saccharina japonica*). *J. Life Sci.* **29**, 596-606.
- Kim, D. H., Lee, S. M. and Ro, H. K. 2019. Effects of fermented *Dendropanax morbifera* extract on the quality of *Kimchi* during fermentation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **48**, 1120-1126.
- Kim, H. J., Jun, B. S., Choi, M. L. and Cho, Y. S. 2000. Antioxidative activities by water-soluble extracts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **43**, 148-152.
- Kim, J. S., Cheong, M. J., Chung, K. A., Song, S. Y. and Lee, H. H. 2019. Effect of *Dendropanax morbifera* extract addition on Chungkukjang on immune response of mice. *J. Kor. Academia-Industrial* **20**, 430-438.
- Koivula, T. and Koivusalo, M. 1975. Different from of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochim. Biophys. Acta.* **397**, 9-23.
- Lee, C., Yang, M. and Moon, J. O. 2019. Antioxidant and hepatoprotective effects of the ethanol extract of *Dendropanax morbifera* Leveille on the *t*-butyl hydroperoxide-induced HepG2 cell damages. *Kor. J. Pharmacogn.* **50**, 32-36.
- Lee, K. H., Na, H. J., Song, C. K., Kang, S. Y. and Kim, S. O. 2018. Quercetin quantification in a Jeju *Dendropanax morbifera* Lev. extract by varying different parts, harvest times, and extraction solvents. *Kor. J. Food Preserv.* **25**, 344-350.
- Lee, K. S., Kim, G. H., Seong, B. J., Kim, H. H., Kim, M. Y. and Kim, M. R. 2009. Effects of aqueous medicinal herb extracts and aqueous fermented extracts on alcohol-metabolizing enzyme activities. *Kor. J. Food Preserv.* **16**, 259-265.
- Lee, M. H., Kwon, H. O., Park, S. J., Lee, D. S., Kim, H. S., Kim, E., Kim, Y. J. and Lee, J. M. 2019. Immunomodulatory effect of *Dendropanax morbifera* leaf water extract in NC/Nga mice as models for atopic dermatitis. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **48**, 915-921.
- Lee, M. K., Choi, S. R., Lee, J., Choi, Y. H., Lee, J. H., Park, K. U., Kwon, S. H. and Seo, K. I. 2012. Quality characteristics and anti-diabetic effect of yacon vinegar. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 79-86.
- Lee, M. R., Hwang, J. H., Oh, Y. S., Oh, H. J. and Lim, S. B. 2014. Quality characteristics and antioxidant activity of immature *Citrus unshiu* vinegar. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 250-257.

24. Lee, S. G., Lee, S. H. and Park, E. J. 2015. Antimicrobial and antioxidant activities of ethanol leaf extract of *Dendropanax morbiferus* Lev. *Kor. J. Food Cook. Sci.* **31**, 515-523.
25. Lee, S. H., Lee, H. S., Park, Y. S., Hwang, B., Kim, H. J. and Lee, H. Y. 2002. Screening of immune activation activities in the *Dendropanax morbifera* leaves of Lev. *Kor. J. Medicinal Crop. Sci.* **10**, 109-115.
26. Lee, S. M., Choi, Y. M., Kim, Y. M., Kim, D. J. and Lee, J. 2009. Antioxidant activity of vinegars commercially available in Korean markets. *Food Eng. Prog.* **13**, 221-225.
27. Mo, H. W., Jung, Y. H., Jeong, J. S., Choi, K. H., Choi, S. W., Park, C. S., Choi, M. A., Kim, M. L. and Kim, M. S. 2013. Quality characteristics of vinegar fermented using omija (*Schizandra chinensis* Baillon). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 441-449.
28. Noh, Y. H. and Pyo, Y. H. 2021. The *in vitro* anti-diabetic and anti-obesity effect of *Monascus*-fermented grain vinegar. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **50**, 783-791.
29. Park, S. E., Seo, S. H., Yoo, S. A., Na, C. S. and Son, H. S. 2016. Quality characteristics of Doenjang prepared with fermented Hwangchil (*Dendropanax morbifera*) extract. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **45**, 372-379.
30. Park, S. H., Lee, J. Y., Jhee, K. H. and Yang, S. A. 2020. Protective effect of *Dendropanax morbifera* leaf extract on CCl₄-induced oxidative damage in HepG2 cells. *J. Life Sci.* **30**, 370-378.
31. Racker, E. 1955. Alcohol dehydrogenase from bakers yeast. *Methods Enzymol.* **1**, 500-506.
32. Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152-178.
33. Tam, X. T. and Ryu, H. K. 2015. Effects of *Dendropanax morbifera* leaf extracts on lipid profiles in mice fed a high-fat and high-cholesterol diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 641-648.
34. Tibbot, B. K. and Skadsen, R. W. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative alpha-glucosidase gene from barley. *Plant Mol. Biol.* **30**, 229-241.
35. Tsao, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231-1246.
36. Turker, G., Kizilkaya, B. and Arifoglu, N. 2014. Determination of organic acid composition and free radical scavenging capacity of Kefir. *Asian J. Chem.* **26**, 2443-2446.
37. Wang, K. J., Zhang, Y. J. and Yang, C. R. 2005. Antioxidant phenolic compounds from rhizomes of *polygonum paleaceum*. *J. Ethnopharmacol.* **96**, 483-487.
38. Woo, C. H., Park, C. H. and Yoon, H. H. 2000. Production of acetic acid from cellulosic biomass. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 458-463.
39. Yi, M. R., Kang, C. H. and Bu, H. J. 2017. Acetic acid fermentation properties and antioxidant activity of lemongrass vinegar. *Kor. J. Food Preserv.* **24**, 680-687.
40. Yoon, S. R., Kim, G. R., Lee, J. H., Lee, S. W., Yeo, S. H., Jeong, Y. J. and Kwon, J. H. 2010. Properties of organic acids and volatile components in brown rice vinegar prepared using different yeast and fermentation methods. *Kor. J. Food Preserv.* **17**, 733-740.

초록 : 전통적인 발효 방법으로 제조한 황칠 식초의 항산화, 알코올 대사 효소 및 간보호 활성

정경임 · 정한나 · 최영주*

(신라대학교 식품영양학과)

본 연구에서는 전통적인 방법으로 제조한 황칠 식초의 유기산 함량을 측정하고 항산화 효과와 항당뇨 효과, 알코올 대사 효소 활성 및 HepG2 세포에 대한 간보호 효과를 알아보았다. 황칠 식초의 유기산 분석결과 acetic acid가 91.72 mg/ml로 가장 높았고, 그 다음으로는 lactic acid (7.31 mg/ml), malic acid (1.36 mg/ml), succinic acid (1.20 mg/ml) 순으로 나타났다. 황칠 식초의 총 폴리페놀 함량은 13.73 µg TAE/ml로 나타났다. DPPH radical 소거능은 농도 의존적으로 증가하였으며 60% 농도에서 76.04%로 나타났고, SOD 활성은 60% 농도에서 95.14%로 나타났다. 황칠 식초 10% 농도에서의 α-glucosidase 저해 효과는 98.94%로 높게 나타났다. 알코올 분해 활성을 알아보기 위해 ADH 및 ALDH 활성을 측정한 결과, 두 가지 효소 모두 황칠 식초의 농도 의존적으로 증가하였으며 60% 농도에서의 ADH 및 ALDH 활성은 각각 43.62% 및 60.39%로 나타났다. 황칠 식초 0.6% 농도에서는 tacrine으로 유도된 HepG2 세포주에 대하여 간보호 활성이 높게 나타났다. 이상의 결과에서 전통적인 방법으로 제조한 황칠 식초는 기능성 건강 음료로서 활용 가능성이 높은 것으로 생각된다.