팥 앙금 제조 과정에서 발생하는 1차, 2차 및 3차 자숙액의 항산화성 및 생리활성 비교

이연지¹ · 김원석² · 전유진³ · 김용태¹

¹군산대학교 식품생명공학전공

²신라대학교 제약공학과

³제주대학교 수산생명의학전공

Comparision of Antioxidant and Physiological Activities of Processed Waters Generated during Red Bean Paste Preparation

Yeon-Ji Lee¹, Won-Suk Kim², You-Jin Jeon³, and Yong-Tae Kim¹

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University

²Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University

³Department of Marine Life Sciences, Jeju National University

ABSTRACT This study evaluated the antioxidant and physiological activities of processed water (PW) generated during the preparation of red bean paste. The three types of PW were prepared by heat treatment for 35 min at 95°C (1st PW), 35 min at 95°C (2nd PW), and 20 min at 100°C (3rd PW), sequentially. The total polyphenol and flavonoid contents of the 1st PW were 92.30 mg/g and 11.54 mg/g, respectively. The polyphenol and flavonoid content of the PW decreased as the number of heat treatments increased. The 1st PW showed the highest 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity, nitrite scavenging activity, and reducing power. The antioxidant activities of PW also significantly decreased as the number of heat treatments increased. Whitening, anti-skin-aging, and anti-diabetic activities were observed in the 1st PW. Furthermore, the highest inhibitory activities of acetylcholinesterase and β -secretase were also observed in the 1st PW. These results indicate that the 1st PW of red bean paste may be useful as an antioxidant and functional substance in food and pharmaceutical products.

Key words: antioxidant activity, physiological activity, by-product, processed water, red bean paste

서 론

식품의 가공 공정 과정에서 발생하는 농·축·수산물의 액상 및 고상의 가공부산물은 수거, 분리 및 처리의 어려움으로 인해 대부분 활용되지 못하고 사료나 퇴비와 같은 낮은 부가가치의 자원으로 활용되거나 폐기 혹은 소각 등으로 처리되는 경우가 대부분이다(Chae 등, 2004). 이러한 식품 가공부산물에는 단백질, 지질, 탄수화물을 비롯한 다양한 영양성분을 비롯한 생리 기능성 물질이 다량 함유되어 있는 것으로 보고되어 있으나 현재까지 이러한 부산물들이 산업적으로 크게 활용되지 못하고 있다. 특히, 식물성 식품 가공부산

물은 유독 성분이 없고 다양한 영양소가 풍부할 뿐만 아니라 폴리페놀, 플라보노이드 등의 항산화 물질 및 다양한 생리활성 물질이 포함되어 있어 고부가가치의 기능성 제품으로서 개발 가능성이 있어 자원 재활용, 환경오염 방지 및 새로운 유기 소재 확보 측면에서도 식품 가공부산물에 관한 연구에 관심이 높아지고 있다(Chae 등, 2004; Hwang 등, 2005; Lee 등, 2019). 한국에서 팥(small red bean, azuki bean, *Vigna angularis*)은 팥죽이나 떡, 빵, 과자 등의 부재료로 사용될 뿐만 아니라 양갱 및 빙과 제조용 앙금으로도 많이 이용되고 있다(Woo 등, 2010). 이처럼 다양한 가공식품으로 이용되는 팥 앙금은 제조 과정에서 팥의 아린 맛을 제거

Received 29 July 2021; Revised 9 September 2021; Accepted 10 September 2021

Corresponding author: Yong-Tae Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, 558, Daehak-ro, Gunsan-si, Jeonbuk 54150, Korea, E-mail: kimyt@kunsan.ac.kr

Author information: Yeon-Ji Lee (Graduate student), Won-Suk Kim (Professor), You-Jin Jeon (Professor), Yong-Tae Kim (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하고 비영양 인자들을 불활성화시키기 위해 90°C 정도의 고온에서 약 20분간 자숙한 다음 1차 자숙액을 폐기한 후, 회수한 팔을 고온 고압에서 다시 한번 자숙하여 삶은 팔을 제조한 다음 적당한 방법으로 팔 앙금을 제조한다. 대부분의 팔 앙금 제조 공정에서 가공부산물로 나오는 팔 자숙액은 재활용되지 못하고 폐수로 버려지는 실정이다(Hwang 등, 2005). 본 연구팀을 비롯한 몇몇 연구팀에서 팔 앙금 가공부산물인 자숙액의 재활용 방법을 모색하기 위하여 팔 자숙액의 이화학적 특성 및 자숙액을 이용한 음료 개발 등에 관한 연구가 보고되어 있으나(Lee 등, 2019; Lee 등, 2014; Hwang 등, 2005), 팔 자숙액의 천연 식품소재로서 활용하기 위한 구체적인 생리활성 구명이 미비한 실정이다.

팔은 장미목 콩과의 한해살이 식물로 한국을 비롯한 중국 및 일본 등 동아시아의 온대지역에서 주로 재배되고 있으며, 가늘고 긴 원통형의 꼬투리 내에 6~10개의 팔알이 들어 있어 그 형태와 구조는 콩과 비슷하나 중앙에 흰색 띠를 가지는 특징이 있다(Roh 등, 2003; Jung 등, 2015). 다른 작물에 비해 기후 및 토양에 적응성이 양호할 뿐만 아니라 생육 기간이 짧아 작부체계에 유용하게 이용되고 있으며, 우리나라에서는 콩 다음으로 생산량이 많은 중요한 두류 작물이다(Roh 등, 2003). 팔은 단백질과 탄수화물 함량이 높고 지방 함량이 낮은 영양학적으로 매우 우수한 고단백 고에너지 식품으로 팔 100 g 당 337 kcal의 열량을 내는 것으로 보고되어 있다(Hwang 등, 2005). 팔에 관한 연구로는 팔 재배, 종자 개량 및 품종에 대한 연구(Roh 등, 2003; Ologhobo와 Fetuga, 1982), 팔의 성분과 색깔에 관한 연구 및 이화학적 특성 등에 관한 연구(Roh 등, 2003; Lee 등, 2019) 등이 알려져 있다. 또한 팔 껍질의 색소는 anthocyanin계의 cyanidin으로 알려져 있으며(Yoshida 등, 1996) 이들 색소는 항산화(Arigo 등, 1988; Jung 등, 2015) 및 항종양(Koide 등, 1997) 효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다. 팔 추출물에 관한 연구로는 팔 추출물에는 발암 억제 효과(Choi 등, 1998), 구강세균에 대한 항균 활성(Kang과 Han, 2012) 및 혈압 상승 억제 효과(Mukai와 Sato, 2009) 등이 있는 것으로 알려져 있다.

팔 앙금 제조 과정 중 발생하는 부산물인 팔 자숙액의 영양성분을 구명할 목적으로 우리는 팔 가공부산물인 팔의 1차, 2차 및 3차 자숙액의 수율, 일반성분 및 이화학적 성분을 분석하여 본 학회지에 보고하였다(Lee 등, 2019). 그 결과 팔의 자숙 과정에서 폐기되는 자숙액에는 건조 중량 대비 약 11%의 다양한 성분이 함유되어 있고, 그 성분 중에는 단백질, 지질, 탄수화물 및 무기질을 포함한 다양한 영양물질이 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 팔 가공부산물인 팔 자숙액에 포함되어 있는 항산화 및 생리활성 물질의 특성을 구명하기 위하여 각 자숙액의 다양한 항산화 활성 및 생리활성을 측정하여 팔의 1차, 2차 및 3차 자숙액의 식·의약품 소재로서의 활용 가능성을 비교·검토하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 실험에서 사용한 팔은 2018년 중국산 팔으로 (주)대두식품(Gunsan, Korea)에서 수입하여 제품 생산에 사용하는 것을 분양받아 사용하였다. 항산화 활성 및 생리활성을 측정하기 위하여 실험에 사용한 Folin-Ciocalteu's reagent, gallic acid, quercetin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, vitamin C, mushroom tyrosinase, porcine pancreatic elastase, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine(L-DOPA), kojic acid, captopril, acetylcholinesterase(AChE), acetylthiocholine iodide(ATC), 5,5'-di-thio-bis-2-nitrobenzoic acid(DTNB) 등은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Yeast α -glucosidase, *p*-nitrophenol- α -glucopyranoside 등은 Wako Chemical Co.(Kanagawa, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖의 모든 시약은 분석용 특급시약을 구입하여 사용하였다.

팔 자숙액의 제조

팔 자숙액의 제조방법은 (주)대두식품의 팔 앙금 제조공정과 동일한 Lee 등(2019)의 방법에 따라 제조하였다. 팔 1 kg을 냄비 속에 넣고 여기에 0.15% NaHCO₃가 함유된 증류수 4 L를 가하여 95°C에서 35분간 가열(1차 삶음)하여 데칸테이션으로 상층액을 분리하였다(1차 자숙액: 1st PW). 1차 삶은 팔에 그 무게의 2배 증류수(w/v)를 가하여 95°C에서 35분간 가열(2차 삶음)하여 데칸테이션으로 상층액을 분리하였다(2차 자숙액: 2nd PW). 2차 삶은 팔에 그 무게의 2배 증류수(w/v, 0.02% 폴리인산나트륨 함유)를 가하여 100°C의 autoclave에서 20분간 자숙(3차 삶음)하여 데칸테이션으로 상층액을 분리하였다(3차 자숙액: 3rd PW). 이와 같이 제조한 1차, 2차 및 3차 팔 자숙액을 동결건조한 후 -20°C 냉동고에 보관하면서 항산화 활성 및 생리활성 분석 실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

팔 자숙액의 총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis 법을 약간 변형한 Shetty 등(1995)의 방법에 준하여 수행하였다. 각 시료(1 mL)에 95% 에탄올 용액 1 mL와 증류수 5 mL를 넣어 혼합한 후 50% Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL를 넣고 5분간 반응시켰다. 여기에 5% Na₂CO₃ 용액 1 mL를 가한 후 실온·암소에서 1시간 동안 반응시킨 후 분광광도계(Optizen Pop, KLAB, Seoul, Korea)를 이용하여 파장 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준검량곡선은 gallic acid를 표준물질로 사용하여 시료의 총 폴리페놀 함량을 산출하였고 gallic acid equivalents(mg GAE/g extract)로

나타내었다.

총 플라보노이드 함량은 Lee 등(2020b)의 방법으로 측정하였다. 각 시료 용액(0.5 mL)에 1.5 mL, 95% 에탄올을 혼합한 다음 0.1 mL, 10% aluminum nitrate와 0.1 mL, 1 M potassium acetate를 차례로 가하여 혼합한 후 실온에서 3분간 반응시킨 다음 증류수 2.8 mL를 가하여 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 파장 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 사용하여 동일한 방법으로 작성된 표준곡선으로부터 총 플라보노이드 함량으로 환산하였고, quercetin equivalents(mg QE/g extract)로 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거능은 ABTS⁺ radical decolorization assay(Re 등, 1999) 방법을 이용하여 측정하였다. 7.4 mM의 ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 동량 혼합하여 실온·암소에서 24시간 동안 방치하여 라디칼을 형성시킨 다음 실험 직전에 ABTS 용액을 734 nm에서 흡광도가 1.000 ± 0.030 (mean $\pm$ SD)가 되도록 phosphate-buffered saline(pH 7.4)으로 희석하여 사용하였다. 각 시료용액 50 μ L에 ABTS 용액 950 μ L를 첨가하여 암소에서 10분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하여 계산식, ABTS⁺ radical scavenging ability(%) = $[(\text{Control}_{734} - \text{Sample}_{734}) / \text{Control}_{734}] \times 100$ 에 의하여 활성을 산출하였다. IC₅₀ value(half maximal inhibitory concentration value)(mg/mL)는 50%의 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성을 나타내는 시료의 농도(mg/mL)로 정의하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 측정

시료의 산화 방지 활성을 측정하기 위하여 자유라디칼인 DPPH를 사용한 라디칼 소거 활성의 측정은 Lee 등(2017)의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료액(1.5 mL)에 동량의 0.4 mM DPPH radical ethanolic solution(1.5 mL)과 혼합하고, 37°C에서 30분간 반응시킨 후 파장 516 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 아래의 계산식, DPPH radical scavenging ability(%) = $[(\text{Control}_{517} - \text{Sample}_{517}) / \text{Control}_{517}] \times 100$ 에 의하여 활성을 산출하였으며, IC₅₀ value(mg/mL)는 50%의 DPPH 소거 활성을 나타내는 시료의 농도(mg/mL)로 정의하였다. 이때 대조구는 (Control₅₁₇)는 시료액 대신 탈 이온수를 가하여 측정한 흡광도를 나타내었다.

Nitrite 소거 활성 측정

각 시료의 아질산염 소거 활성은 1 mM NaNO₂ 용액 1 mL에 소정 농도의 시료 1 mL를 첨가하고 여기에 0.1 N HCl (pH 1.2) 용액을 사용하여 반응용액의 pH를 각각 1.2로 조정하는 다음 반응용액의 부피를 10 mL로 하였다. 이렇게 한 다음 37°C에서 1시간 반응시켜 얻은 반응용액을 각각 1 mL

씩 취하고 여기에 2% 초산용액 5 mL를 첨가한 다음 Griess 시약(30% 초산으로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1로 혼합) 0.5 mL를 가하여 잘 혼합시킨 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염을 구하였다. 대조구는 Griess 시약 대신 증류수를 0.5 mL 가하여 상기와 동일하게 행하였다. 아질산염 소거작용은 시료를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 백분율로 나타내었다{아질산염 소거 활성(%) = $[1 - (A - C) / B] \times 100$, (A: 1 mM nitrite 용액에 시료를 첨가한 흡광도, B: 1 mM nitrite 용액의 흡광도, C: 시료의 흡광도)}. IC₅₀ value(mg/mL)는 50%의 아질산염 소거 활성을 나타내는 시료의 농도(mg/mL)로 정의하였다.

환원력(reducing power) 측정

환원력은 Lee 등(2020c)의 방법으로 측정하였다. 각 시료용액(1 mL)에 1 mL의 0.2 M sodium phosphate 완충액(pH 6.6)과 1 mL의 1%(w/v) potassium ferricyanide를 차례로 가하여 혼합한 후 50°C의 항온수조에서 20분 동안 반응시켰다. 이 반응액에 1 mL의 10%(w/v) trichloroacetic acid를 가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리(1,890 $\times$ g, 10분)하였다. 상층액 1.5 mL에 1.5 mL의 증류수와 0.3 mL의 0.1%(w/v) FeCl₃ 용액을 혼합하여 10분 동안 실온에서 정지한 후 파장 700 nm에서 흡광도를 측정하여 환원력으로 나타내었으며, 흡광도가 높을수록 환원력이 큰 것을 의미한다. EC₅₀ value(half maximal effective concentration value)는 흡광도 값이 0.5를 나타내는 시료의 농도(mg/mL)로 정의하였다.

Tyrosinase 저해 활성

각 시료용액의 tyrosinase 저해 활성은 Iida 등(1995)의 방법을 다소 수정한 Lee 등(2020a)의 방법에 따라 측정하였다. 300 μ L의 시료용액은 900 μ L의 mushroom tyrosinase(50 Unit/mL)와 1.5 mL의 50 mM phosphate buffer(pH 6.8)를 혼합하여 실온에서 30분 동안 전 단계 반응을 실시한 후, 300 μ L의 10 mM L-DOPA 용액을 가하여 파장 475 nm에서 20분 동안 1분 간격으로 생성되는 dopachrome의 흡광도를 모니터링하면서 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성(%)은 다음 식, Tyrosinase inhibitory activity(%) = $[(\text{Control}_{475} - \text{Sample}_{475}) / \text{Control}_{475}] \times 100$ 을 통하여 계산하였다. 여기서 대조구(Control₄₇₅)는 시료 대신 탈 이온수를 가하여 측정한 흡광도를 의미하였다.

Elastase 저해 활성

각 시료의 elastase 저해 활성은 Kraunsoe 등(1996)의 방법을 다소 수정한 아래의 방법에 따라 측정하였다. Porcine pancreatic elastase를 반응용액(50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.2)에 녹여 1 U/mL로 제조하여 효소용액으로

사용하였고, 기질용액은 N-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroline(0.5 mM)을 동일한 반응용액에 녹여서 제조하였다. 10 µL의 시료용액은 50 µL의 elastase(1 Unit/mL)와 90 µL의 반응용액을 혼합하여 실온에서 10분 동안 전 단계 반응을 실시한 후, 50 µL의 0.5 mM 기질용액을 가하여 405 nm에서 0분일 때 흡광도를 측정한 후 다시 25°C에서 10분간 반응한 후의 흡광도를 측정하였다. 대조군(C)은 시료 대신 buffer 용액을 사용하였다. Elastase 저해 활성도의 계산식은 Elastase inhibitory activity(%) = $[1 - \{S(OD\ 10\ min - OD\ 0\ min) / C(OD\ 10\ min - OD\ 0\ min)\}] \times 100$ 에 의하여 산출하였다.

α-Glucosidase 저해 활성 측정

각 시료의 α-glucosidase 저해 활성은 Watanabe 등(1997)의 chromogenic assay법에 따라 *p*-nitrophenol glucoside를 이용하여 측정하였다. Yeast α-glucosidase를 반응용액(100 mM phosphate buffer, pH 7.0, 0.2% bovine serum albumin 및 0.02% Na₂CO₃)에 녹여 0.7 U/mL로 제조하여 효소용액으로 사용하였고, 기질용액은 *p*-nitrophenyl-α-glucopyranoside(5 mM)를 동일한 반응용액에 녹여서 제조하였다. 반응은 효소용액 100 µL와 시료용액 20 µL를 well에 넣고 혼합하여 405 nm에서 흡광도(time zero)를 측정하였다. 실온에서 5분간 incubation한 다음 기질용액 100 µL를 첨가하여 실온에서 5분간 incubation한 후 흡광도를 측정하여 증가된 흡광도 변화를 계산하였다. 이때 실험의 대조군으로는 α-glucosidase 저해제로 알려진 acarbose를 사용하였다. 효소 활성의 저해 정도는 다음 식, α-Glucosidase inhibitory activity(%) = $[1 - (Sample_{405} / Control_{405})] \times 100$ 에 따라 산출하였으며 control은 시료 무첨가구의 흡광도 변화 값을 나타내었다.

AChE 저해 활성 측정

AChE 저해 활성 측정은 Ellman 등(1961)의 방법을 변형하여 측정하였다. AChE와 ATC는 100 mM phosphate buffer(pH 8.0)에 녹여 각각 0.25 U/mL와 75 mM을 제조하였으며, 발색시약은 39.6 mg의 DTNB와 15 mg sodium bicarbonate를 100 mM phosphate buffer(pH 8.0) 10 mL에 녹여 제조하였다. AChE(0.25 U/mL) 25 µL, 0.1 M phosphate buffer(pH 8.0) 50 µL와 시료(5 mg/mL) 25 µL를 잘 혼합하여 25°C에서 10분간 preincubation을 한 다음, 기질 ATC 25 µL와 발색시약 DTNB 125 µL를 첨가하여 412 nm에서 5분간 흡광도(microplate reader)를 연속적으로 측정하여 초기 반응속도를 계산하였다. 대조구로는 시료 대신 0.1 M phosphate buffer(pH 8.0) 25 µL를 첨가하여 측정하였으며 저해 활성의 계산은 다음 식, AChE inhibitory activity(%) = $[100 - (SV / CV)] \times 100$ 과 같이 산출하였다(SV: 시료 존재 하의 초기 반응속도, CV: 대조구의 초기 반응속도).

BACE1(β-secretase) 저해 활성 측정

각 시료의 BACE1 효소 활성은 Lee 등(2020a)의 방법에 따라 측정하였다. 본 실험에 사용한 BACE1 효소는 Lee(2017)의 방법에 따라 정제한 효소를 사용하였고, 기질(MOCac-SEVNLDAEFRK(Dnp)RR)은 Pepton Co.(Daejeon, Korea)에서 합성 및 정제하여 사용하였다. 일반적인 저해 활성은 black 96-microwell plate에 0.1 M sodium acetate buffer(pH 4.0) 225 µL, BACE1 10 µL 및 각 시료(5 mg/mL) 10 µL를 순서대로 첨가하고 잘 혼합하여 37°C에서 30분간 preincubation을 한 다음, 0.5 mM 기질 5 µL를 첨가하여 37°C에서 15분간 효소 반응을 측정하였다. 효소 반응은 기질 첨가로 시작되고 효소 활성은 microplate reader(Infinite F200, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 Ex 328/Em 393 nm 파장에서 연속적으로 형광 강도를 측정하여 초기 반응속도를 분석하였다. 대조구로는 시료대신 0.1 M sodium acetate buffer(pH 4.0) 10 µL를 가하여 측정하였으며 저해 활성의 계산은 다음 식, BACE1 inhibitory activity(%) = $[100 - (SV / CV)] \times 100$ 과 같이 산출하였다(SV: 시료 존재 하의 초기 반응속도, CV: 대조구의 초기 반응속도).

통계처리

실험 결과는 SPSS 22 package program(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)으로 통계처리 하여 3회 측정한 값의 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료 간의 유의성 검정은 분산분석(ANOVA)을 한 후 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 따라 분석하여 시료 간 유의적 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

팔 자숙액의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

팔 양금 제조 과정에서 발생하는 가공부산물인 1차, 2차 및 3차 자숙액(가공 처리수)의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 팔 1차 자숙액의 총 폴리페놀 함량은 92.30 mg GAE/g이고, 2차 자숙액은

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents of the processed waters generated during red bean paste preparation

Sample ¹⁾	Total polyphenol (mg GAE/g) ²⁾	Total flavonoid (mg QE/g) ³⁾
1st PW	92.30±4.01 ^{a4)5)}	11.54±2.40 ^a
2nd PW	23.96±0.60 ^b	3.62±0.01 ^b
3rd PW	17.56±0.25 ^c	4.83±0.70 ^b

¹⁾1st PW, 1st processed water; 2nd PW, 2nd processed water; 3rd PW, 3rd processed water.

²⁾GAE: gallic acid equivalent mg/g.

³⁾QE: quercetin equivalent mg/g.

⁴⁾Value are means±SD (n=3).

⁵⁾Means with different letters in a column are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

23.96 mg GAE/g, 3차 자숙액은 17.56 mg GAE/g으로 확인되었다. 즉, 팔 자숙액의 총 폴리페놀 함량은 1차> 2차> 3차 자숙액 순으로 폴리페놀 함량이 높게 나타났고, 팔 1차 자숙액은 2차 및 3차 자숙액과 비교하여 총 폴리페놀 함량이 약 4~5배 높은 것으로 확인되었다. Woo 등(2010)의 연구에서 품종별 생팔 메탄올 추출물을 제조하여 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과 19.00~34.75 mg/g으로 팔의 품종에 따라 폴리페놀 함량이 약 50% 정도 차이가 나는 것으로 보고하였다. 또한 Jung 등(2015)은 생팔과 증자팔의 열수 추출물의 폴리페놀 함량을 측정된 결과 각각 19.61 mg/g 및 7.94 mg/g으로 보고하여 팔에 함유된 폴리페놀은 추출 용매 및 추출 방법에 따라 폴리페놀 함량의 차이가 크게 발생하는 것으로 생각된다.

한편, 팔 자숙액의 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과 1차 자숙액은 11.54 mg QE/g이고, 2차 자숙액은 3.62 mg QE/g, 3차 자숙액은 4.83 mg QE/g으로 1차 자숙액은 2차 및 3차 자숙액과 비교하여 플라보노이드 함량이 2~3배 높은 것으로 나타났다. Woo 등(2010)은 팔 분말의 총 플라보노이드 함량은 12.97~28.95 mg/g으로 품종에 따라 다소 차이가 나는 것으로 보고하였다. 한편, Jung 등(2015)의 연구에서 생팔 및 삶은팔의 열수 추출물의 플라보노이드 함량은 각각 4.16 mg/g 및 1.96 mg/g으로 팔 분말의 플라보노이드 함량에 비교하여 약 1/3 이하의 플라보노이드가 함유되어있는 것으로 나타났다. 본 연구결과 1차 자숙액의 플라보노이드 함량은 Woo 등(2010)의 팔 분말의 플라보노이드 함량과 유사하고 2차 및 3차 자숙액은 Jung 등(2015)의 생팔 및 삶은팔 열수 추출물의 플라보노이드 함량과 유사한 것으로 확인되었다.

팔 자숙액의 항산화 활성

팔 양금 제조 과정에서 발생하는 가공부산물인 팔 자숙액의 항산화 활성을 비교하기 위하여 1차, 2차 및 3차 자숙액의 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거 활성, nitrite 소거 활성과 환원력을 측정된 결과는 Table 2에 나타내었다. 팔 자숙액의 ABTS 라디칼 소거 활성(IC₅₀)을 측정된 결과 1차 자숙액은 0.18 mg/mL, 2차 자숙액은 1.01 mg/mL, 3차 자숙액은

1.68 mg/mL로 나타나 ABTS 라디칼 소거 활성은 1차> 2차> 3차 자숙액 순으로 높은 것으로 확인되었다. 특히, 1차 자숙액은 positive control인 ascorbic acid(IC₅₀, 0.08 mg/mL)와 비교하여 약 45%의 ABTS 라디칼 소거 활성을 내포하고 있는 것으로 확인되었다. Jung 등(2015)은 생팔과 삶은팔의 열수 추출물에 대한 ABTS 라디칼 소거 활성의 IC₅₀은 각각 0.25 및 0.47 mg/mL라고 보고하였고, Lee 등(2014)은 생팔과 삶은팔의 에탄올 추출물에 대한 ABTS 라디칼 소거 활성의 IC₅₀은 각각 0.08 및 0.33 mg/mL라고 보고하였다. 따라서 본 연구결과와 기존에 보고된 팔 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성을 비교해보면 생팔 에탄올 추출물> 1차 팔 자숙액> 생팔 열수 추출물 순으로 높은 것으로 나타나 팔의 종류, 재배지, 추출 용매 및 추출 방법에 따라 ABTS 라디칼 소거 활성의 차이가 나는 것으로 확인되었다.

팔 1차, 2차 및 3차 자숙액의 DPPH 라디칼 소거 활성(IC₅₀)은 1차 자숙액이 1.24 mg/mL이고, 2차 자숙액은 20.17 mg/mL, 3차 자숙액은 62.35 mg/mL 순으로 나타나 DPPH 라디칼 소거 활성도 1차> 2차> 3차 자숙액 순으로 높은 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 이전에 보고된 생팔과 증자팔 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성(IC₅₀)이 각각 1.0 및 2.44 mg/mL라는 보고(Jung 등, 2015)와 비교하여도 1차 자숙액의 DPPH 라디칼 소거 활성은 생팔의 열수 추출물과 유사한 것으로 나타났다.

팔 자숙액의 nitrite 소거 활성을 측정된 결과는 1차 자숙액에서는 nitrite 소거 활성이 확인되었으나 2차 및 3차 자숙액에서는 활성이 없는 것으로 나타났다. 팔 1차 자숙액의 nitrite 소거 활성(IC₅₀)은 1.84 mg/mL로 positive control인 ascorbic acid의 nitrite 소거 활성(IC₅₀, 0.47 mg/mL)에 비하여 약 25%의 소거 활성이 존재하는 것으로 확인되었다. Jung 등(2015)은 생팔 및 삶은팔 열수 추출물의 nitrite 소거 활성(IC₅₀)은 각각 1.37 및 1.07 mg/mL라고 보고하여 본 연구결과와 유사한 것으로 나타났다.

팔 1차, 2차 및 3차 자숙액의 환원력(EC₅₀)을 분석한 결과, 1차 자숙액은 0.08 mg/mL이고, 2차 자숙액은 0.49 mg/mL, 3차 자숙액은 0.98 mg/mL로 나타났다. 팔 1차 자숙액은 ascorbic acid의 환원력(EC₅₀, 0.014 mg/mL)에 비

Table 2. Antioxidant activities of the processed waters generated during red bean paste preparation

Sample ¹⁾	ABTS ²⁾ (IC ₅₀ , mg/mL) ³⁾	DPPH (IC ₅₀ , mg/mL)	NO (IC ₅₀ , mg/mL)	Reducing power (EC ₅₀ , mg/mL) ⁴⁾
1st PW	0.18±0.01 ^{c5)6)}	1.24±0.32 ^c	1.84±0.12 ^a	0.08±0.00 ^c
2nd PW	1.01±0.01 ^b	20.17±1.04 ^b	ND ⁷⁾	0.49±0.00 ^b
3rd PW	1.68±0.16 ^a	62.35±3.50 ^a	ND	0.98±0.01 ^a
Ascorbic acid	0.08±0.00 ^d	0.28±0.00 ^d	0.47±0.01 ^b	0.01±0.00 ^d

¹⁾Refer to Table 1.

²⁾ABTS: ABTS radical scavenging activity, DPPH: DPPH radical scavenging activity, NO: nitrite scavenging activity.

³⁾The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values (mg/mL) were calculated from a log dose inhibition curve.

⁴⁾EC₅₀ value for reducing power is expressed as the effective concentration at which the absorbance is 0.5.

⁵⁾Value are means±SD (n=3).

⁶⁾Means with different letters in a column are significantly different at *P*<0.05 by Duncan's multiple range test.

⁷⁾ND: Not detected.

하여 약 18%에 해당하는 낮은 활성을 보였으나 팔 자숙액 중에서는 가장 높은 환원력을 내포하고 있는 것으로 확인되었다. 이상의 항산화 활성 결과를 종합해보면 3가지 팔 자숙액 중 1차 자숙액은 2차 및 3차 자숙액과 비교하여 월등히 높은 항산화 활성을 가지고 있을 뿐만 아니라 생팔 및 증자팔의 추출물과 비교하여도 유사한 항산화 활성을 지니는 것으로 확인되었다. 따라서 팔의 1차 자숙 과정(95°C, 35분간 가열)에서 폴리페놀을 포함하는 대부분의 항산화 물질 및 생리활성 물질들이 자숙액으로 용출되므로 팔 양금 제조 시 발생하는 가공부산물인 팔 1차 자숙액의 이용 가능성은 높은 것으로 생각된다.

팔 자숙액의 tyrosinase, elastase 및 α -glucosidase 저해 활성

팔 자숙액의 tyrosinase 및 elastase 저해 활성에 대한 비교·분석 결과는 Table 3과 같다. 팔 1차, 2차 및 3차 자숙액의 tyrosinase 저해 활성을 다양한 농도에서 측정된 결과, 1차 자숙액의 tyrosinase 저해 활성(IC₅₀)은 0.40 mg/mL이고, 2차 자숙액은 2.28 mg/mL, 3차 자숙액은 0.90 mg/mL로 확인되어 tyrosinase 저해 활성은 1차 > 3차 > 2차 자숙액 순으로 높은 것으로 측정되었다. 팔의 3차 자숙액의 tyrosinase 저해 활성이 2차 자숙액보다 높은 저해 활성을 보이는 것은 팔의 1차 및 2차 자숙 과정에서 용출되지 않은 화합물이 100°C의 autoclave에서 20분간 삶는 과정에서 용출되어 tyrosinase 저해 활성이 높게 나온 것으로 생각된다. Baik(2012)과 Lee(2015)는 팔의 ethyl acetate(EA) 분획물과 팔 껍질 추출물을 각각 1 mg/mL 농도에서 tyrosinase 활성을 측정된 결과, 팔 EA 분획물은 51.1%, 팔 껍질 추출물은 76.4% tyrosinase 활성을 저해한다고 보고하여 본 연구결과의 팔 1차 자숙액의 tyrosinase 저해 활성(65.1%, 1 mg/mL)과 유사한 것으로 확인되었다. Tyrosinase는 피부의 표피 기저층에 존재하는 멜라노 사이트에서 tyrosine을 산화시켜 멜라닌의 생성을 촉진시키는 효소로서 이들의 활성 억제는 피부 미백과 노화 방지에 매우 중요하다(Choi 등, 2011). 피부의 멜라닌 색소 침착 제어 및 억제

와 밀접한 관련이 있는 tyrosinase inhibitor는 의학 및 화장품 분야에서 관심이 증가하는 추세이다. 따라서 팔 자숙액의 tyrosinase 저해 활성을 이용한 미백 관련 기능성 물질로서 이용 가능성이 있다고 추정된다.

팔 양금 제조 과정에서 부산물로 생산되는 팔 자숙액의 elastase 저해 활성(IC₅₀)을 측정한 결과, 1차 자숙액에서는 0.85 mg/mL의 활성을 보였으나 2차 및 3차 자숙액에서는 elastase 저해 활성이 검출되지 않았다. Baik(2012)과 Lee(2015)는 팔의 EA 분획물과 팔 껍질 추출물의 elastase 활성을 측정된 결과, 팔 EA 분획물은 0.4 mg/mL에서 55.6%, 팔 껍질 추출물은 0.5 mg/mL에서 50% 이상의 elastase 활성을 저해한다고 보고하여 본 연구의 팔 1차 자숙액 0.5 mg/mL 농도의 elastase 저해 활성(43.1%)과 유사한 것으로 나타났다. Elastase는 피부의 진피 내 피부 탄력을 유지하는 기질 단백질인 elastin의 분해에 관여하며, 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 이상 조직에서는 활성이 높아져 조직 파괴의 직접적인 원인이 되며 피부의 주름 및 탄력성 소실 등을 유발시키는 단백질 가수분해 효소이다(Lee, 2015). Elastase 저해 활성 물질은 피부의 주름을 개선하는 효과가 있어 기능성 화장품 원료로 주목받고 있다. 따라서 팔 양금 제조 과정에서 발생하는 팔 1차 증자액에는 피부 미백 및 주름 개선에 유용한 물질이 함유되어 있는 것으로 생각된다.

α -Glucosidase는 음식물 중의 전분을 포도당과 같은 단당으로 분해하는 역할을 담당하는 효소로 당뇨병의 핵심적인 효소이다(Ali 등, 2017; Lee 등, 2020a). 팔 1차, 2차 및 3차 자숙액을 다양한 농도에서 α -glucosidase 저해 활성을 측정된 결과, 1차 자숙액의 α -glucosidase 저해 활성(IC₅₀)은 4.41 mg/mL의 농도에서 α -glucosidase 효소 활성을 50% 저해하는 것으로 확인되었으나 2차 및 3차 자숙액에서는 α -glucosidase의 저해 활성이 나타나지 않았다. 이러한 결과는 이전에 보고된 생팔과 증자팔의 에탄올 및 열수 추출물에서 α -glucosidase 저해 활성이 당뇨병 치료제로 사용되고 있는 acarbose에 비해 그 활성이 미미하다는 결과와 유사한 것으로 확인되었다(Lee 등, 2014; Jung 등, 2015).

팔 자숙액의 AChE 및 BACE1의 저해 활성

팔 자숙액의 뇌의 acetylcholine 농도 유지 관련 연관성을 확인하기 위하여 팔 1차, 2차 및 3차 자숙액의 AChE 저해 활성을 측정하여 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 각 팔 자숙액의 반응액 중 최종 농도 0.5 mg/mL에서 AChE 저해 활성을 측정된 결과, 팔 1차 자숙액의 AChE 저해 활성은 35.81%이고, 2차 자숙액은 1.86%, 3차 자숙액은 4.19%로 검출되어 1차 자숙액에서는 AChE 저해 활성이 확인되었으나 2차 및 3차 자숙액에서는 AChE 저해 활성이 미미한 것으로 확인되었다. Song 등(2010)은 수수, 기장, 율무, 참깨, 적색미 등의 메탄올 추출물(1 mg/mL)은 AChE 활성을 40~

Table 3. Tyrosinase, elastase, and α -glucosidase inhibitory activities of the processed waters generated during red bean paste preparation

Sample ¹⁾	Tyrosinase (IC ₅₀ , mg/mL) ²⁾	Elastase (IC ₅₀ , mg/mL)	α -Glucosidase (IC ₅₀ , mg/mL)
1st PW	0.40±0.06 ^{c3)4)}	0.85±0.06	4.41±0.49
2nd PW	2.28±0.34 ^a	ND ⁵⁾	ND
3rd PW	0.90±0.12 ^b	ND	ND

¹⁾Refer to Table 1.

²⁾The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values (mg/mL) were calculated from a log dose inhibition curve.

³⁾Value are means±SD (n=3).

⁴⁾Means with different letters in a column are significantly different at *P*<0.05 by Duncan's multiple range test.

⁵⁾ND: Not detected.

Table 4. Acetylcholinesterase (AChE) and BACE1 (β -secretase) inhibitory activities of the processed waters generated during red bean paste preparation

Sample ¹⁾	Inhibitory activity (%)	
	AChE	BACE1
1st PW	35.81±1.69 ^{a2)3)}	54.90±4.93 ^a
2nd PW	1.86±0.78 ^b	22.76±6.14 ^b
3rd PW	4.19±1.52 ^b	21.50±7.18 ^b

¹⁾Refer to Table 1.²⁾Value are means±SD (n=3).³⁾Means with different letters in a column are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

60% 저해한다고 보고하여 팔 1차 자숙액은 위의 곡류의 AChE 저해 활성과 유사한 것으로 확인되었다. 치매는 신경세포의 노화에 의한 신경퇴행성 뇌질환으로 뇌혈관성 치매와 알츠하이머병으로 분류한다. 뇌혈관성 치매는 그 원인이 명확히 밝혀져 그 진단 및 치료가 용이하지만 알츠하이머병은 정확한 발병 기전과 원인이 밝혀져 있지 않다. 알츠하이머 환자의 뇌에는 신경전달물질인 acetylcholine 함량이 정상인에 비해 50% 이하로 감소하는데, AChE의 활성이 증가하면 acetylcholine을 분해해 그 농도를 감소시키고 일련의 반응을 통해 신경세포의 손상을 초래하여 기억력 결핍을 유발한다고 알려져 있다(Talesa, 2001). 따라서 뇌에서 acetylcholine 농도 유지는 인지 기능 개선 효과와 상관관계가 있는 것으로 보고되어 있다(Son 등, 2016).

알츠하이머 질병의 원인 중 하나인 이상 단백질 축적설은 β -amyloid(A β)라는 펩타이드가 과도하게 만들어져 뇌세포에 축적되어 발생하는 신경퇴행성 뇌질환으로 A β 는 amyloid precursor protein의 베타와 감마 부위가 각각 β -secretase와 γ -secretase라는 효소에 의해 절단되어 생성되는 것으로 알려져 있다(Kim 등, 2002; Park 등, 2014; Lee, 2017). 본 연구에서는 팔 자숙액의 A β 생성 억제력을 확인하기 위하여 1차, 2차 및 3차 자숙액의 BACE1(β -secretase) 저해 활성을 측정한 결과를 Table 4와 Fig. 1에 나타내었다. 각 시료(최종 농도 0.2 mg/mL)의 반응액 중

Fig. 1. BACE1 (β -secretase) inhibitory activities of 1st, 2nd, and 3rd processed waters (PW) generated during red bean paste preparation. Each value is mean±SD (n=3).

BACE1 저해 활성을 측정한 결과, 팔 1차 자숙액은 54.90%, 2차 자숙액은 22.76%, 3차 자숙액은 21.50%로 1차>2차>3차 자숙액 순으로 BACE1 저해 활성이 높은 것으로 확인되었다(Table 4). Fig. 1에 나타난 것과 같이 1차 자숙액의 BACE1 저해 활성은 자숙액의 농도가 0.2 mg/mL까지는 농도에 비례하여 저해 활성이 증가하는 경향을 보였으나 그 이상의 농도에서는 저해 활성의 증가가 미미한 것으로 나타났다. Kim 등(2008)은 홍삼 추출물 100 mg/mL 농도에서 BACE1 효소 활성을 약 52% 저해한다고 보고하였으나 상황버섯 자실체 유래 수용성 다당류는 0.1 mg/mL에서 48%의 BACE1 활성을 저해한다고 보고하였다(Jo 등, 2012). 더구나 감태, 검둥 감태 및 톳 등의 해조류 추출물(최종 농도: 0.25 mg/mL)에서도 약 80%의 높은 BACE1 저해 활성이 검출된 것으로 알려져 있다(Son 등, 2016; Lee 등, 2020a). 따라서 팔 앙금 제조 과정의 부산물인 1차 자숙액의 BACE1 저해 활성은 홍삼보다는 우수하나 상황버섯, 감태 및 톳보다는 다소 낮은 저해 활성을 보였다. 이상과 같이 팔 1차 자숙액은 치매 예방을 위한 건강 기능성식품 소재로서의 활용 가능성이 높을 것으로 판단되며 팔 1차 자숙액의 항치매에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

본 연구에서는 팔 앙금을 제조하는 과정에서 발생하는 부산물인 1차, 2차 및 3차 자숙액(가공 처리수)의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, 항산화 활성 및 생리활성을 측정하여 팔 자숙액을 이용한 건강 기능성식품 및 의약품 소재로서의 활용 가능성을 탐색하고자 하였다. 팔 자숙액의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과, 1차 자숙액의 총 폴리페놀(92.30 mg/g) 및 플라보노이드(11.54 mg/g) 함량이 2차 및 3차 자숙액에 대비하여 2~5배 높은 경향을 나타내었다. 또한 팔의 1차 자숙액의 ABTS 라디칼 소거 활성의 IC₅₀은 0.18 mg/mL, DPPH 라디칼 소거 활성의 IC₅₀은 1.24 mg/mL, 아질산염 소거 활성의 IC₅₀은 1.82 mg/mL, 환원력의 EC₅₀은 0.08 mg/mL로 나타나 3가지 자숙액 중에서 가장 높은 항산화 활성을 내포하고 있는 것으로 확인되었다. 팔 자숙액의 생리활성을 확인하기 위하여 피부 미백, 주름 개선, 및 항당뇨 관련 효소의 활성을 측정한 결과, 1차 자숙액에서 tyrosinase(IC₅₀, 0.40 mg/mL), elastase(IC₅₀, 0.84 mg/mL) 및 α -glucosidase(IC₅₀, 4.28 mg/mL)의 저해 활성이 확인되었다. 또한 팔 자숙액의 치매 관련 효소인 AChE 및 BACE1의 활성을 측정한 결과, 1차 자숙액에서 각각 35.81% 및 54.90% 효소 활성이 저해되는 것으로 확인되었다. 본 연구결과로부터 팔 앙금 제조 과정에서 폐기되는 1차 자숙액에는 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높고 우수한 항산화 활성 및 생리활성을 내포하는 생리 기능성 물질이 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 따라서 팔 1차 자숙액은 기능성식품 및 화장품을 비롯한 식품첨가제 등의 천연 소재

로서 활용 가능하리라 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2021년도 정부(교육부) 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구사업입니다(NRF-2017 R1D1A3B03029803 & 2021R111A3043692).

REFERENCES

- Ali MY, Kim DH, Seong SH, Kim HR, Jung HA, Choi JS. α -Glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of plastoquinones from marine brown alga *Sargassum serratifolium*. Mar Drugs. 2017. 15:368. <https://doi.org/10.3390/md15120368>
- Ariga T, Koshiyama I, Fukushima D. Antioxidative properties of procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans in aqueous systems. Agric Biol Chem. 1988. 52:2717-2722.
- Baik JW. A study on anti-aging activities of *Phaseolus angularis* extracts. Master's thesis. Chung-Ang University, Seoul, Korea. 2012.
- Chae HJ, Han MS, In MJ. Study on utilization of vegetable by-product from food processing by enzyme treatment. J Korean Soc Appl Biol Chem. 2004. 47:146-148.
- Choi JH, Kim JS, Jo BS, Kim JH, Park HJ, An BJ, et al. Biological activity in functional cosmetic purple sweet potato extracts. Korean J Food Preserv. 2011. 18:414-422.
- Choi YH, Kang MY, Nam SH. Inhibitory effect of various cereal and bean extracts on carcinogenicity *in vitro*. Korean J Food Sci Technol. 1998. 30:964-969.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Feather-stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 1961. 7:88-95.
- Hwang CS, Jeong DY, Kim YS, Na JM, Shin DH. Effects of enzyme treatment on physicochemical characteristics of small red bean percolate. Korean J Food Sci Technol. 2005. 37:189-193.
- Iida K, Hase K, Shimomura K, Sudo S, Kadota S, Namba T. Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*. Planta Med. 1995. 61:425-428.
- Jo HS, Choi DJ, Chung MJ, Park JK, Park YI. Characterization and β -secretase inhibitory activity of water-soluble polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* fruiting body. Kor J Mycol. 2012. 40:229-234.
- Jung IC, Lee YS, Kang DK, Sohn HY. Evaluation of useful biological of hot-water extracts of raw-red bean and boiled-red bean (*Phaseolus radiatus* L.). J East Asian Soc Diet Life. 2015. 25:451-459.
- Kang SJ, Han YS. Studies on the anti oralmicrobial activity and selected functional component of small red bean extract. Korean J Food Cook Sci. 2012. 28:41-49.
- Kim DW, Kim YJ, Lee YJ, Min JW, Kim SY, Yang DC. Conversion of ginsenosides by 9 repetitive steamings and dryings process of Korean ginseng root and its inhibition of BACE-1 activity. Korean J Oriental Physiol Pathol. 2008. 22:1557-1561.
- Kim YT, Downs D, Wu S, Dashti A, Pan Y, Zhai P, et al. Enzymic properties of recombinant BACE2. Eur J Biochem. 2002. 269:5668-5677.
- Koide T, Hashimoto Y, Kamei H, Kojima T, Hasegawa M, Terabe K. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans *in vitro* and *in vivo*. Cancer Biother Radiopharm. 1997. 12:277-280.
- Kraunsoe JA, Claridge TDW, Lowe G. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. Biochemistry. 1996. 35:9090-9096.
- Lee RK, Kim MS, Lee YS, Lee MH, Lee JH, Sohn HY. A comparison of the components and biological activities in raw and boiled red beans (*Phaseolus radiatus* L.). Korean J Microbiol Biotechnol. 2014. 42:162-169.
- Lee SY. Analysis of skin mechanism and an application for functional cosmetic from red bean (*Phaseolus angularis*) shell extract. Dissertation. Hoseo University, Asan, Korea. 2015.
- Lee YJ, Jeon YJ, Kim YT. Comparison of antioxidant and physicochemical activities of various solvent extracts from *Hizikia fusiformis*. Korean J Fish Aquat Sci. 2020a. 53:886-893.
- Lee YJ, Kim WS, Jeon YJ, Kim YT. Physicochemical properties and antioxidant activities of yanggaeng containing *Hizikia fusiformis* powder. Korean J Fish Aquat Sci. 2020b. 53:588-596.
- Lee YJ, Kim WS, Jeon YJ, Kim YT. Physicochemical properties and antioxidant activities of yanggaeng containing *Pyropia yezoensis*. Korean J Fish Aquat Sci. 2020c. 53:672-680.
- Lee YJ, Kim WS, Jeon YJ, Kim YT. Physicochemical properties of the processed water generated during red bean paste preparation. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2019. 48:290-296.
- Lee YJ, Kim WS, Lee BJ, Jeon YJ, Kim YT. Quality characteristics and antioxidant activities of gruel Containing *Saccharina japonica* powder. Korean J Fish Aquat Sci. 2017. 50:707-713.
- Lee YJ. Expression, purification and characterization of BACE1 (β -secretase) in *E. coli*. Master's thesis. Kunsan National University, Gunsan, Korea. 2017.
- Mukai Y, Sato S. Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract attenuates blood pressure elevation and modulates nitric oxide synthase and caveolin-1 expression in rats with hypertension. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2009. 19:491-497.
- Ologhobo AD, Fetuga BL. Chemical composition of promising cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. Nutr Rep Int. 1982. 25:913-913.
- Park SJ, Tai S, Lee YJ, Jeon YJ, Kim YT. Overexpression and refolding of BACE2. Korean J Fish Aquat Sci. 2014. 47:370-375.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang Min, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999. 26:1231-1237.
- Rho CW, Son SY, Hong ST, Lee KH, Ryu IM. Agronomic characters of Korean adzuki beans (*Vigna angularis* (Wild) Ohwi & Ohashi). Korean J Plant Res. 2003. 16:147-154.
- Shetty K, Curtis OF, Levin RE, Witkowsky R, Ang V. Prevention of vitrification associated with *in vitro* shoot culture of oregano. (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp.. J Plant Physiol. 1995. 147:447-451.
- Son HJ, Um MY, Kim I, Cho S, Han D, Lee C. *In vitro* screening for anti-dementia activities of seaweed extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2016. 45:966-972.
- Song JE, Song JH, Cho SM, Min GH, Lee JS. Nutritional characteristics and physiological functionality of antidementia acetylcholinesterase inhibitor-containing methanol extract from *Sorghum bicolor*. Korean J Food Nutr. 2010. 23:226-232.

- Talesa VN. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.* 2001. 122:1961-1969.
- Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, Niki R. Isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997. 61:177-178.
- Woo KS, Song SB, Ko JY, Seo MC, Lee JS, Kang JR, et al. Antioxidant components and antioxidant activities of methanolic extract from adzuki beans (*Vigna angularis* var. *nipponensis*). *Korean J Food Sci Technol.* 2010. 42:693-698.
- Yoshida K, Sato Y, Okuno R, Kameda K, Isobe M, Kondo T. Structural analysis and measurement of anthocyanins from colored seed coats of *Vigna*, *Phaseolus*, and *Glycine* legumes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1996. 60:589-593.