

발효옷 추출물의 항산화 및 지방세포 분화 억제 효과

나영아¹⁾ · 최미숙¹⁾ · 박성진^{2)¶}

을지대학교 식품산업외식학과¹⁾ ·

한림성심대학교 관광외식조리과/ 한림성심대학교 생물소재연구소^{2)¶}

Antioxidant and Anti-adipogenic Effects of Fermented *Rhus verniciflua*

Young-Ah Rha¹⁾ · Mi-Sook Choi¹⁾ · Sung-Jin Park^{2)¶}

Dept. of Food Technology and Services, Eulji Univrsity, Seongnam, Gyeonggi-do, 461-713, Korea¹⁾
Dept. of Tourism Food Service Cuisine, Hallym Polytechnic University Research Institute of Biomaterial,
Hallym Polytechnic University, Chuncheon 200-711, Korea^{2)¶}

Abstract

This study investigates the antioxidant and anti-adipogenic effects of fermented *Rhus verniciflua*., evaluating the total phenol, total flavonoids contents and antioxidant activity of the fermented *Rhus verniciflua* as well as assessing the lipid accumulation during adipogenesis of 3T3-L1 cells. Our results demonstrate that the total phenolic and flavonoids contents of fermented *Rhus verniciflua* were 29.2±0.12 GAE mg/g and 20.4±1.52 RE mg/g, respectively. The antioxidative activities of fermented *Rhus verniciflua* were significantly increased in a dose dependent manner on DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging, ABTS(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonic acid) diammonium salt) radical scavenging, FRAP(feric reducing antioxidant power)activity, reducing power. In addition, the fermented *Rhus verniciflua* did not show any cytotoxicity up to 300 ug/mL. However, the anti-adipogenic effect of fermented *Rhus verniciflua* extract was barely detectable.

Key words: *Rhus verniciflua*, antioxidant activity, anti-obesity, lipid accumulation

I. 서 론

체내에서 발생하는 활성산소는 일반적으로 체내에 존재하는 항산화 시스템으로 인해 저해와 방어가 가능하다. 그러나 최근 산업화로 인한 각종 매연, 환경호르몬, 알콜 및 흡연 등과 같은 환경적 요인은 활성산소의 양을 증가시켜서 체내의 항산화 시스템만으로는 산화적 스트레스에 의해 발생하는 손상을 적절히 방어하지 못할 수 있다

(Gutteridge JMC & Halliwell B 1994). 이와 같은 현상으로 인해 생성되는 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 불안정하고 반응성이 매우 높아서 고분자 단백질과 DNA의 변형 및 생체막을 손상시키며, 조직이나 기관들을 손상시켜 암과 같은 질병을 야기한다(Fridovich I 1989; Lee OH *et al* 2009). ROS를 제거하기 위해서 과거에는 효과와 경제성이 뛰어난 합성 항산화제인 BHT (butylated hydroxytoluene) 및 BHA (butylated

¶ : 박성진, 010-3219-0100, sjpark@hsc.ac.kr, 강원도 춘천시 동면 장학길 48 한림성심대학교 관광외식조리과

hydroxyanisole)가 많이 사용되어 왔으나, 최근 이러한 합성물질들의 인체에 대한 독성과 안정성의 문제가 많이 알려지면서 법적으로 규제되고 있으며 그 사용이 점점 감소하고 있다(Kim HK *et al* 2004; Kim TK *et al* 2003). 이와 함께 안전성이 확보된 천연물을 이용한 새로운 천연 향산화제 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Kalt W 2006).

최근 연구에 의하면 지방세포내 생성된 ROS는 지방세포 분화 (adipogenesis)와 밀접한 연관을 갖는다고 한다(Lee OH *et al* 2009; Furukawa S *et al* 2004; Yamashita A *et al* 2008). 3T3-L1 전지방세포는 지방세포로 분화하는 과정에서 세포내로 유입되는 포도당을 저장하기 위하여 지방 합성과 관련된 에너지대사 경로를 작동하게 된다. 특히, pentose phosphate pathway (PPP)는 지방 합성에 반드시 필요한 cofactor인 NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)를 제공해 주는 중요한 pathway이다. 이렇게 생성된 NADPH는 NADPH Oxidase (NOX)에 의하여 NADP⁺로 전환되며, 이때 세포내 superoxide를 생성하게 되어 세포내 ROS가 발생한다. 지방세포에서 과도하게 생성된 ROS는 전지방 세포의 분화를 촉진시켜 주거나 지방세포 주변에 위치한 macrophage를 자극하여 또 다른 활성산소종을 생성하는 악순환의 연결고리로 비만의 주요 원인 중에 하나라고 보고 된 바 있다(Yamashita A *et al* 2008). 따라서 지방세포의 ROS 생성과 소거에 관여하는 NOX 및 항산화효소의 발현에 영향을 미치는 항비만 소재에 대한 연구가 진행 중에 있다(Lee OH *et al* 2009; Furukawa S *et al* 2004; Yamashita A *et al* 2008).

세계적으로 옷나무과(Anacardiaceae)에 속하는 식물은 600여종이 존재하고 있는 것으로 알려져 있으나 이중 옷나무속으로 분류되는 식물은 200여종 정도이며(Fernald ML 1950) 우리나라에는 참옷나무(*Rhus verniciflua* Stokes)를 포함한 6종의 옷나무가 분포하고 있다(Kim *et al.*, 2002). 옷

은 혈액순환 촉진, 위장질환, 심장질환, 부인과 질환(Namba T 1980) 등에 효과가 있으나 urushiol을 함유하고 있어 수포, 가려움, 발진 등을 동반한 접촉성피부염을 유발하기 때문에(Epstein WL 1974) 그 사용에 주의를 기울여 왔다. 옷나무 피(껍질)는 당뇨병(Kim IT *et al* 2004) 및 위 관련질환(Jung NC 1998)을 치료하기 위한 한약재로 이용되어 왔으며 민간에서는 옷닭이나 옷오리 등의 형태로 섭취하여 왔다. 최근에 들어 한약재를 이용한 약선 음식의 기능성 연구(Jeong SH *et al* 2012, Shin SJ & Yoon HH 2011) 및 옷에 대한 항산화(Lee JC *et al* 2001; Lim KT *et al* 2001), 항돌연변이성(Park KT *et al* 2004), 항종양(Yang J *et al* 2005; Kitts DD & Lim KT 2001), 항혈전(Jeon WK *et al* 2006) 활성 등의 다양한 생리활성이 있는 것으로 밝혀지면서 건강기능성 식품 및 의약품 소재로서 많은 주목을 받고 있다. 충북 옥천군과 강원도 원주시는 각각 2005년과 2006년에 지식경제부로부터 옷 산업 특구로 지정받았으며, 옷을 고부가가치 산업으로 인식하고 연관 산업을 활성화시키기 위해 노력을 기울이고 있다.

따라서 본 연구에서는 발효옷을 건강기능성식품 소재로 활용 시 기초자료를 제공하고자 발효옷의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였으며, 다양한 항산화 모델(DPPH radical scavenging, ABTS radical scavenging, FRAP activity, reducing power)을 통하여 항산화 활성을 측정하였다. 또한, 3T3-L1 지방세포의 분화과정 중 발효옷에 의한 세포내 지방 축적 억제활성을 평가하여 항비만 활성에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시약

본 실험에 사용된 발효옷 추출물은 원주 옷산업 명품화 사업단에서 제공받아 추출액을 면포로 여과한 후 감압농축 (CCA-1100, Eyela, Tokyo, Japan)하여 -70℃에서 급속동결건조 (PVTF)

10AT, ILSIN, Korea)과정을 거쳐 분말 상태로 준비하여 각종 생리활성 물질 함량분석 실험에 사용하였다. 마우스 유래 3T3-L1 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, CL-173, Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받아 사용하였다. 본 연구에 사용된 시약인 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Oil Red O (ORO), dexamethasone (DEX), isopropanol, quercetin, ascorbic acid, gallic acid, 1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl radical(DPPH), N-acetyl-L-cysteine (NAC), trichloroacetic acid (TCA), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS), folin & ciocalteu's phenol reagent, potassium ferricyanide, sodium carbonate, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ), potassium persulfate, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid(trolox), insulin, acetic acid, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), sodium nitrite(NaNO₂) 등은 sigma (sigma-aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), bovine serum (BS), fetal bovine serum (FBS), phosphate-buffered saline (PBS), penicillin-streptomycin (P/S), 및 trypsin-EDTA는 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하였으며, fluorescein sodium salt는 Junsei(Tokyo, Japan)로부터 사용하였다.

2. 총 페놀 함량 분석

발효옷 추출물의 총 페놀 함량(Total Polyphenol Content, TPC)의 측정은 Folin-Ciocalteu의 방법을 변형하여 측정하였다(Sato M *et al* 1996). 0.1 mg/mL의 농도로 제조된 발효옷 추출물 1 mL, 2% sodium carbonate 용액 1mL 및 10% Folin-Ciocalteu's reagent 1 mL을 혼합하여 1시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 로 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량 분석은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선($y=12.66x+0.0035$, $R^2=0.9979$)으로 부터

함량을 구하였다.

3. 총 플라보노이드 함량 분석

발효옷 추출물의 총 플라보노이드 함량 측정은 Moreno 등의 방법을 응용하여 실시하였다(Moreno MIN *et al* 2000). 0.1 mg/mL의 농도로 제조한 발효옷 추출물 0.5 mL, 95% 에탄올 1.5 mL, 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL 및 증류수 2.8 mL를 각각 섞어 상온에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량 분석은 rutin을 이용하여 작성한 표준곡선($y=3.011x+0.0375$, $R^2=1.0000$)으로 부터 함량을 구하였다.

4. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH assay는 free radical에 대한 시료의 항산화 활성을 평가하기 위한 방법으로 Kim 등(Kim JH *et al* 2002)의 방법을 변형하여 측정하였다. Ethanol에 용해시킨 0.4 mM DPPH 용액 0.8 mL과 시료를 각각 0.2 mL 첨가하여 vortex로 5초간 진탕하고 암소에서 10분 동안 방치 후 microplate reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 다음 식에 의하여 DPPH free radical 소거능을 나타내었으며, 대조군으로 0.1 mg/mL의 ascorbic acid를 이용하였다.

DPPH 라디칼 소거능 (%) =

$$\left\{ 1 - \left[\frac{A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100$$

5. ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능 측정은 Roberta 등(1999)의 방법으로 측정하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulphate를 제조하여 섞은 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온 라디칼(ABTS^{•+})을 형성시킨 후, 734 nm에서 흡광도의 값이 1.5 이하가 되도록 희석하였다. 희석된

ABTS⁺ 용액 1 mL에 농도별로 제조된 시료 20 μ L를 첨가한 뒤 30분 후 흡광도의 변화를 측정하였다. 항산화활성은 시료를 녹인 용매인 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 대조군으로 사용하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다.

ABTS radical scavenging activity

$$= \left(1 - \frac{A_{\text{Test}}}{A_{\text{Control}}}\right) \times 100$$

6. FRAP 활성 측정

Benzie와 Strainin의 방법(Benzie *et al* 1996)을 변형하여 발효옷 추출물의 FRAP activity를 측정하였다. Acetate buffer(pH 3.6, 300 mM) : TPTZ (10mM): FeCl₃·6H₂O (20mM) 를 10:1:1의 비율로 섞어 시료와 혼합한 후 10분간 상온에서 보관한 뒤 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 환원력 측정

환원력의 측정은 Oyaizu의 방법(Oyaizu M 1986)을 변형하여 측정하였다. 시료 1 mL에 200 mM 인산 완충액(pH 6.6) 및 1%의 potassium ferricyanide를 각각 1 mL씩 차례로 가하여 교반한 후 50°C의 수욕상에서 20분간 반응시켰다. 여기에 10% TCA 용액 1 mL 가하여 13,500Xg에서 15분간 원심분리 하였다. 그 후 상등액 증류수 및 ferric chloride를 각각 1 mL씩 혼합하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원력은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 %값으로 환산하였다.

8. XTT assay를 이용한 세포 독성 평가

3T3-L1 지방세포에 대한 발효옷추출물의 세포 독성평가는 XTT(2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide innersalt) assay kit를 이용하여 측정하였다. 3T3-L1 세포는 실험 전날 1×10⁶ cell 농도로 96-well plate에 seeding하고 50, 100 및 200 μ g/mL 농도의 발효옷추출물을 96-well medium 부피의 1% 되는 양을 처리

하여 24 시간 동안 배양하였다. XTT 및 PMS (N-Methylphenazonium methyl sulfate) reagent를 37°C에서 완전히 해동시킨 후, 1 mL의 XTT reagent와 20 μ L의 PMS reagent를 혼합하여 working solution을 조제하여 96-well medium 부피의 20% 되는 양 만큼 각각의 well에 첨가하여 혼합하였다. Plate는 CO₂ incubator에서 4시간 동안 배양한 후, microplate reader를 이용하여 450nm 흡광도 값에서 690 nm의 흡광도 값을 뺀 결과 값으로 세포독성을 계산하였다(Furukawa S *et al* 2004; Blumberg JM *et al* 2006).

9. 3T3-L1 세포 배양 및 분화

3T3-L1 전지방세포를 실험목적에 따라 24-well plate에 각각 1×10⁶ seeding한 후, BS(10%) 및 P/S(1%)를 함유한 DMEM(89%)에서 100% confluence 될 때까지 배양하였다. 그로부터 2일 후, 지방세포 분화유도 물질(10 μ g/mL insulin, 1 μ M DEX, 0.5 mM IBMX)과 FBS(10%) 및 P/S(1%)를 함유한 medium으로 전지방세포를 지방세포로 분화유도 하였다. 지방세포 분화 시 medium에 발효옷 추출물을 50, 100 및 200 μ g/mL의 농도로 처리하였고, 이때 시료의 효과를 관찰하기 위하여 negative control(음성 대조군)에는 아무것도 처리하지 않았으며, positive control(양성 대조군)에는 항산화제인 NAC(10 mM 1.63 mg/mL)를 처리하여 효능을 비교하였다. 지방세포의 분화는 분화유도 물질을 처리한 후, 2일마다 지속적으로 10 μ g/mL insulin, 1% P/S, 10% FBS가 함유된 배지에 각각의 시료를 처리하여 배양하였다.

10. Oil red O staining을 이용한 지방 측정 억제 효과 관찰

분화 과정에 따른 3T3-L1 세포 내 지방축적량을 측정하고자 medium을 제거한 후, 10% formalin 용액 500 μ L를 첨가하여 5분간 실온에서 방치한 뒤 제거하였다. 그 후 동량의 formalin 용액으로 분화된 3T3-L1 세포를 1시간 이상 실온에서

방치한 후, 제거하고 60% isopropanol 용액 500 μ L로 세척하여 세포를 완전히 건조시켰다. 완전히 건조된 세포들은 미리 제조해 둔 Oil red O working solution(Oil red O:DW=6:4)으로 세포 내 축적된 지방성분들을 충분히 염색 한 후, 증류수를 이용하여 세포를 3-4회 세척하고 완전히 건조시켰다. 세포 내 축적된 지방 성분과 결합한 Oil red O는 100% isopropanol을 이용하여 모두 용출시킨 후, microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(Furukawa S *et al* 2004; Blumberg JM *et al* 2006).

11. 통계분석

실험결과는 SAS(ver. 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 one-way ANOVA 분석을 하였으며, 평균값의 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 총 페놀 및 플라보노이드 함량

식물성 식품에는 많은 폴리페놀성 분자들이 함유되어 있는데 이러한 페놀성 화합물은 체내에서 항산화, 항비만 및 항염증 등과 같은 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 그 중 플라보노이드는 식물에서 합성되는 폴리페놀류의 가장 큰 부류에 속하며 구조에 따라 6가지로 분류되며 각 구조별로 여러 가지 생리활성을 나타낸다(Cho YJ *et al* 2007; Shin DB *et al* 2006). 발효옷 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 29.2 ± 0.12 GAE mg/g 및 20.4 ± 1.52 RE mg/g으로 나타났다 <Table 1>. 이러한 결과는 Choi *et al*(2012)의 발

효 옷나무를 80~120°C에서 추출시 폴리페놀 함량이 6.65~13.94 mg/g이었고, 플라보노이드는 3.04 mg/g~3.99 mg/g이었다는 보고에 비해서는 높았으며, Kim *et al*(2010)이 옷나무 분말을 실온에서 80%의 에탄올로 추출한 경우 총 페놀과 플라보노이드 함량이 각각 597 mg/g와 201 mg/g이었다는 결과에 비해서는 낮은 값이었다.

2. 발효옷 추출물의 항산화 활성 측정 (DPPH, ABTS, FRAP, reducing power)

시료의 항산화 활성을 평가하는 시험법은 여러 가지가 존재한다. 특히 식품의 항산화물질의 경우, 대부분 환 구조의 형태로 hydroxyl기를 하나 이상 함유하여 수소공여를 하는 특징을 가진다(Szabo MR *et al* 2007). Fig 1은 항산화 측정 모델을 통하여 다양한 농도(0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 0.1 mg/mL)에서 발효옷 추출물의 항산화 활성을 측정한 결과이다.

그 중 DPPH assay는 수소 공여체를 측정 할 수 있는 방법으로 페놀성 화합물, 방향족 아민류 및 아스코르빈산 등에 의해 수소나 전자를 받아 환원되어 보라색이 탈색 되는 원리를 이용한 방법으로 항산화 물질을 탐색하기 위해 많이 이용되며 비교적 간단하고 짧은 시간 내에 항산화 활성을 측정할 수 있어 널리 사용되고 있는 방법이다(Szabo MR *et al* 2007). 발효옷 추출물의 DPPH radical 소거능은 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 0.1 mg/mL에서 각각 26.20 ± 1.24 , 30.30 ± 1.52 , 34.41 ± 0.38 , 37.87 ± 1.41 및 $43.34 \pm 1.41\%$ 를 나타내었으며, 각 농도별로 유의적으로 DPPH radical 소거능이 증가하는 것으로 나타났다<Fig. 1A>. Choi *et al*(2002)

<Table 1> Total polyphenolic and flavonoid contents of fermented *Rhus verniciflua*

	Total phenol contents	Total flavonoid contents
Fermented <i>Rhus verniciflua</i>	29.2 ± 0.12 GAE ¹⁾ mg/g	20.4 ± 1.52 RE ²⁾ mg/g

All values are mean \pm SD of triplicate determination.

¹⁾Gallic acid equivalent

²⁾Rutin equivalent

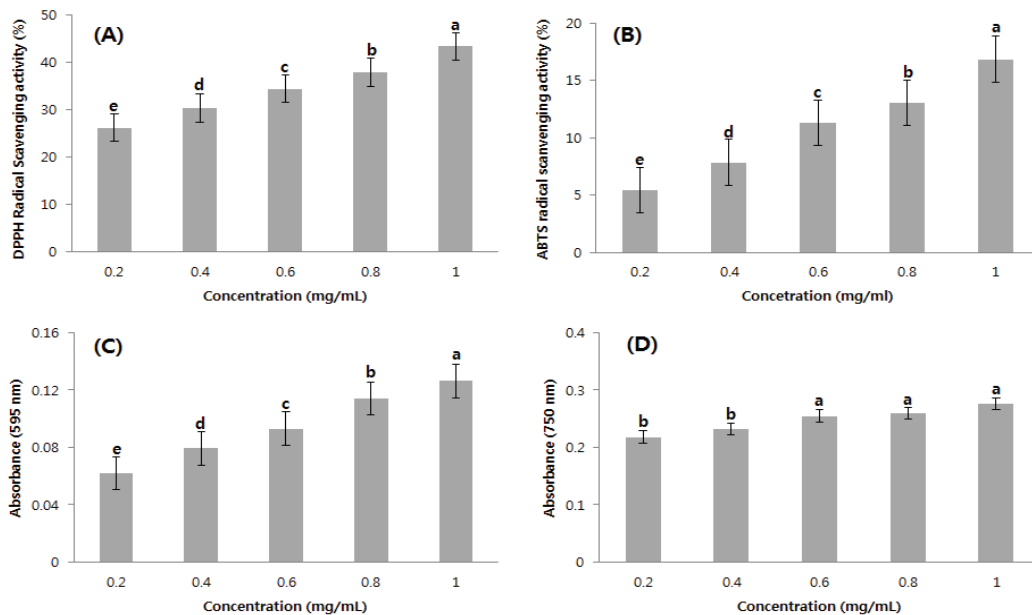
은 옷나무 메탄올 추출물을 정제하여 얻은 분획이 합성 항산화제인 BHA보다 월등히 우수한 전자공여능을 나타내었다고 보고하였다.

옷 추출물에 대한 항산화 활성을 ABTS cation decolorization assay에 의해 검토한 결과는 <Fig. 1B>와 같다. ABTS radical을 이용한 항산화능의 측정에는 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS free radical이 추출물 내의 항산화물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법이다(Van den Berg *et al* 1999). DPPH에 의한 전자공여능의 결과와 같이 발효옷 추출물의 농도가 증가하면서 ABTS radical 소거활성이 유의적으로 증가하였는데 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 0.1 mg/mL에서 각각 5.47±1.27, 7.87±0.57, 11.35±0.52, 13.04±1.81 및 16.87±0.45%를 나타내었으며, 각 농도별로 유의적으로 DPPH radical 소거능이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 열풍 건조한 옷나무 열수추출물의 항산

화 활성을 연구한 결과(Lee SH *et al* 2013)와 유사한 결과를 나타내었다.

FRAP 방법은 비교적 최근에 개발되어진 항산화 활성 측정 방법으로 시료의 전자공여능을 측정하지 않고 산화 및 환원 반응을 측정방법으로 항산화 물질인 페놀성 화합물이 Fe^{3+} 을 Fe^{2+} 으로 환원시키는 원리를 이용하였으며, 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에서 착안하여 만들어진 방법이다(Jeong JW *et al* 1994). 발효옷 추출물의 FRAP activity는 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 0.1 mg/mL의 농도에서 각각 0.06±0.01, 0.08±0.01, 0.10±0.01, 0.11±0.01 및 0.13±0.01의 값을 가지며 농도별로 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다 <Fig. 1C>.

환원력은 700 nm에서 ferric-ferricyanide (Fe^{3+}) 혼합물이 수소를 공여하여 유리라디칼을 안정화시켜 ferrous(Fe^{2+})로 전환하는 환원력을 흡광도 값으로 나타낸 것으로 결과는 <Fig. 1D>와 같이



<Fig. 1> DPPH radical scavenging activity (A), ABTS radical scavenging activity (B), FRAP activity (C) and reducing power (D) of fermented *Rhus verniciflua* at various concentration. Each value shows the means±SD of samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

발효옷 추출물의 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0 mg/ml의 농도에서의 환원력은 0.22 ± 0.01 , 0.23 ± 0.01 , 0.25 ± 0.01 , 0.26 ± 0.01 및 0.28 ± 0.01 의 값을 나타내 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이상의 항산화활성 측정에 의한 항산화 활성의 결과로부터 발효옷 추출물은 항산화 활성을 보유하고 있어 앞으로 발효옷의 추출 조건에 따른 항산화 활성에 대한 면밀한 검토의 필요성이 있는 것으로 판단되었다.

3. XTT assay를 이용한 세포 독성 평가

3T3-L1 지방세포에 대한 발효옷 추출물의 세포 독성은 <Fig. 2>와 같다. 100 및 300 µg/mL의 발효옷 추출물 처리 시 세포 독성을 나타내지 않았으며, 현미경 상에서의 morphology의 변화도 관찰되지 않았다. 따라서 3T3-L1 지방세포에 처리하는 발효옷 추출물의 농도는 300 µg/mL로 결정하였다.

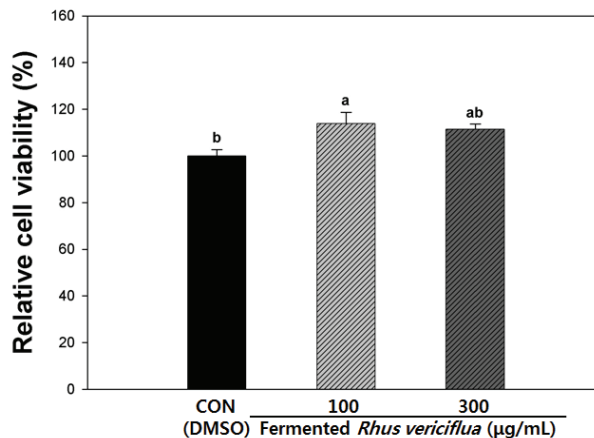
4. Oil red O staining을 이용한 지방 축적 억제 효과 관찰

3T3-L1 지방세포 분화 억제 효과를 확인하기 위하여 지질을 붉은색으로 염색시키는 Oil red O

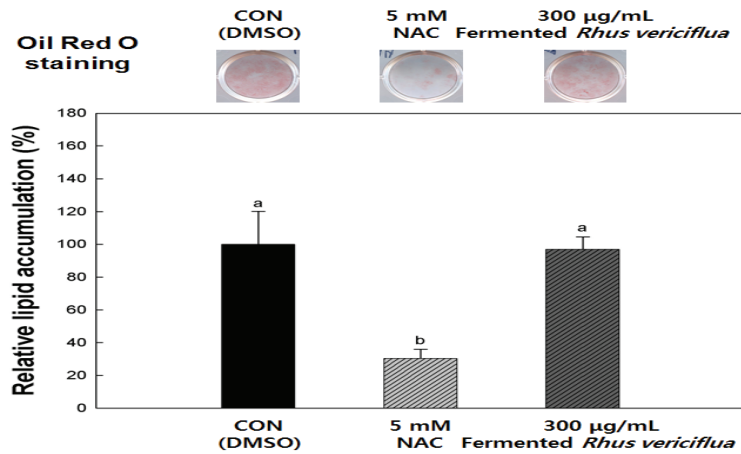
시약을 통해 3T3-L1 지방세포 내 생성된 중성지방의 양을 측정된 결과는 <Fig. 3>과 같다. 음성대조군(CON)에 비해 300 µg/mL 발효옷 추출물 처리군에서 세포 내 지질 축적량이 감소하였으나 큰 영향은 없는 것으로 판단된다. 양성대조군으로 사용된 NAC는 대표적인 항산화제로 3T3-L1의 분화과정 중 처리하면 중성지방의 축적을 억제시키고, 또한 지방세포의 분화를 조절하는 전사인자인 PPAR γ 의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있어 양성대조군으로 사용하였다(Blumberg JM *et al* 2006).

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 발효옷을 건강기능식품 소재로 활용 시 기초자료를 제공하고자 발효옷의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였으며, 다양한 항산화 모델(DPPH radical scavenging, ABTS radical scavenging, FRAP activity, reducing power)을 통하여 항산화 활성을 측정하였다. 또한, 3T3-L1 지방세포의 분화과정 중 발효옷에 의한 세포내 지방 축적 억제활성을 평가하여 항비만 활성에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다. 발



<Fig. 2> Effects of fermented *Rhus verniciflua* on cell viability. Cell viability was measured by MTT assay. Each value shows the means±SD of samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at p<0.05 by one-way ANOVA.



〈Fig. 3〉 Effects of fermented *Rhus verniciflua* on the lipid accumulation during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. at various concentration. Lipid accumulation determined by absorbance at 490 nm(Abbreviation: CON; Control, NAC; N-acetyl cysteine). Each value shows the mean±SD of the samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

효소 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 29.2 ± 0.12 GAE mg/g 및 20.4 ± 1.52 RE mg/g으로 나타났다. 발효소 추출물의 DPPH radical 소거능은 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 0.1 mg/mL에서 각각 26.20 ± 1.24 , 30.30 ± 1.52 , 34.41 ± 0.38 , 37.87 ± 1.41 및 $43.34 \pm 1.41\%$ 를 나타내었으며, 각 농도별로 유의적으로 DPPH radical 소거능이 증가하는 것으로 나타났다. 발효소 추출물의 농도가 증가하면서 ABTS radical 소거활성이 유의적으로 증가하였는데 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 0.1 mg/mL에서 각각 5.47 ± 1.27 , 7.87 ± 0.57 , 11.35 ± 0.52 , 13.04 ± 1.81 및 $16.87 \pm 0.45\%$ 를 나타내었다. 발효소 추출물의 FRAP activity는 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 0.1 mg/mL의 농도에서 각각 0.06 ± 0.01 , 0.08 ± 0.01 , 0.10 ± 0.01 , 0.11 ± 0.01 및 0.13 ± 0.01 의 값을 가지며 농도별로 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 발효소 추출물의 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0 mg/mL의 농도에서의 환원력은 0.22 ± 0.01 , 0.23 ± 0.01 , 0.25 ± 0.01 , 0.26 ± 0.01 및 0.28 ± 0.01 의 값을 나타내 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효과를 확인하기 위하여 지질을 붉은 색으로 염색시키는 Oil red O 시약을 통해 3T3-L1

지방세포 내 생성된 중성지방의 양을 측정된 결과, 음성대조군(CON)에 비해 300 µg/mL 발효소 추출물 처리군에서 세포 내 지질 축적량이 감소하였으나 큰 영향은 없는 것으로 판단된다. 발효에 따른 옷나무의 allergy성분을 제거하고 이를 식품소재화 하는 연구는 산업적으로 많은 잠재력을 지닌 것으로 생각된다. 그러나 안전성 및 기능성 구명에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

한글 초록

본 연구에서는 발효소의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였으며, 다양한 항산화 모델(DPPH radical scavenging, ABTS radical scavenging, FRAP activity, reducing power)을 통하여 항산화 활성을 측정하였다. 또한, 3T3-L1 지방세포의 분화과정 중 발효소에 의한 세포내 지방 축적 억제활성을 평가하여 항비만 활성에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다. 발효소 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 29.2 ± 0.12 GAE mg/g 및 20.4 ± 1.52 RE mg/g으로 나타났다. 다양

한 항산화 평가 모델(DPPH, FRAP, 환원력, ABTS)을 통하여 발효옷 추출물의 항산화 활성을 측정 한 결과, 발효옷 추출물의 농도가 증가함에 따라 항산화능이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효과를 확인 하기 위하여 지질을 붉은색으로 염색시키는 Oil red O 시약을 통해 3T3-L1 지방세포 내 생성된 중성지방의 양을 측정 한 결과, 음성대조군에 비해 300 µg/mL 발효옷 추출물 처리군에서 세포 내 지질 축적량이 감소하였으나 큰 영향은 없는 것으로 판단된다. 발효에 따른 옷나무의 allergy성분을 제거하고 이를 식품소재화 하는 연구는 산업적으로 많은 잠재력을 지닌 것으로 생각된다. 그러나 안전성 및 기능성 구명에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 원주 옷산업 명품화 사업단에서 시행한 2013년도 원주 옷장류 브랜드화사업에 의하여 수행된 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Blumberg JM, Tzamelis I, Astapova I, Lam FS, Flier JS, Hollenberg AN (2006). Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol. Chem* 281(16): 11205-11213.
- Cho YJ, Ju IS, Kim BC, Lee WS, Kim MJ, Lee BG, An BJ, Kim JH, Kwon OJ (2007). Biological activity of omija (*Schizandra chinensis Baillon*) extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 50(3): 198-203.
- Choi HS, Yeo SH, Jeong ST, Choi JH, Park HS, Kim MK (2012). Preparation and characterization of urushiol free fermented *Rhus verniciflua* stem bark(FRVSB) extracts. *Korean J Food Sci Technol* 44(2): 173-178.
- Choi WS, Kim DK, Lee YH, Kim JE, Lee SE (2002). Antioxidative and cytotoxicity activities of compounds isolated from Korean *Rhus verniciflua* S. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 45(3): 168-172.
- Epstein WL (1974). Poison oak and poison ivy dermatitis as an occupational problem. *Cuits* 13(4): 544-548.
- Fernald, ML (1950). Gray's Manual of Botany 8th ed., American Book Company, New York, USA. pp. 976-979.
- Fridovich I (1989). Superoxide dismutase. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 264(14): 7761-7764.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114(12): 1752-1761.
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71(1-2): 109-114
- Gutteridge JMC, Halliwell B (1994) Antioxidants In nutrition, Health, and Disease. Oxford University Press. London, UK. pp. 1-62.
- Jeon WK, Lee JH, Kim HK, Lee AY, Lee SO, Kim YS., Ryu SY, Kim SY, Lee YJ, Ko BS (2006). Anti-platelet effects of bioactive compounds isolated from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes. *J Ethnopharm* 106(1): 62-69.
- Jeong JW, Lee YC, Jung SW, Lee KM (1994). Flavor components of citron juice as affected by the extraction method. *Korean J Food Sci*

- Technol* 26(6): 709-712.
- Jeong SH, Kim SI, Sim KH, Jin SY, Kim NH (2012). Antioxidant and antidiabetic Activity of Jehotang according to Different Cooking Methods. *Korean J Culinary Research* 18(5): 233-242
- Jung NC (1998) Biological activity of urushiol and flavonoids from Lac tree(*Rhus verniciflua* Stokes). Ph.D. Thesis, Chonnam National University, Kwang-ju, Korea
- Kalt W (2006). Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidant. *J Food Sci* 70(1): 11-19.
- Kim HK, Kwon YJ, Kim YE, Nahmgang B (2004). Changes of total polyphenol content and antioxidant activity of aster scaber thub extracts with different microwave assisted extraction conditions. *Korean J Food Preserv* 11(1): 88-95.
- Kim IT, Park YM, Shin KM, Ha J, Choi J, Jung H J, Park HJ, Lee KT (2004). Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the extract from *Kalopanaxictus*, *Pueraria thunbergiana* and *Rhus verniciflua*. *J Ethnopharm* 94(1):165-173.
- Kim JH, Park JH, Park SD, Choi SY, Seong JH, Hoon KD (2002). Preparation and antioxidant activity of health drink with extract powders from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. *Korean J Food Sci Technol* 34(4): 617-624.
- Kim TK, Shin HD, Lee YH (2003) Stabilization of polyphenolic antioxidants using inclusion complexation with cyclodextrin and their utilization as the fresh-food preservative. *Korean J Food Sci Technol* 35(2): 266-272.
- Kim TH, Lee KM, Kwon KR, Choi SM (2002). A literature study on lacquer poison. *J Korean pharmacopuncture institute* 5(1): 159-169.
- Kitts DD, Lim KT (2001). Antitumorigenic and cytotoxic properties of an ethanol extract derived from *Rhus verniciflua* Stokes(RVS). *J Toxicol Environ Health* 64(4): 357-371.
- Lee JC, Kim J, Lim KT, Yang MS, Jang YS (2001). Ethanol eluted extract of *Rhus verniciflua* Stokes showed both antioxidant and cytotoxic effects on mouse thymocytes depending on the dose and time of the treatment. *Biochem Mol Biol* 34(3): 250-258.
- Lee OH, Lee BY, Lee J, Lee HB, Son JY, Park CS, Shetty K, Kim YC (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresour Technol* 100(23): 6107-6113.
- Lee OH, Kwon YI, Hong HD, Park CS, Lee BY, Kim YC (2009). Production of reactive oxygen species and changes in antioxidant enzyme activities during differentiation of 3T3-L1 adipocyte. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 52(1): 70-75.
- Lee SH, Jeong HS, Kang TS (2013). Antimicrobial and Antioxidative Activities of Hot Water Extracts from Heat-Air Dried *Rhus verniciflua* Stokes. *Food Engineering Progress* 17(1): 1-7.
- Lim KT, Chun H, Kitts DD (2001). Antioxidant activity of a *Rhus verniciflua* Stokes ethanol extract. *Food Chem Toxicol* 39(3): 229-237.
- Moreno MIN, Isla MIN, Sampietro AR, Vattuone MA (2000). Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71(1-2): 109-114.
- Namba, T (1980). Coloured illustrations of Wakan-Yaku. Hoikusha Publishing Co., Ltd., Osaka, Japan. p. 215.
- Oyaizu M (1986). Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of

- browning reaction products prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44(6): 307-315.
- Park KY, Jung GO, Lee KT, Choi JW, Choi MY, Kim GT, Jung JJ, Park HJ (2004). Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *J Ethnopharm* 90(1): 73-79.
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Anath P, Min Y, Catherine RE (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 26(9-10): 1231-1237.
- Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H (1996). Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J Agr Food Chem* 44(1): 37-41.
- Shin DB, Lee DW, Yang R, Kim JA (2006). Antioxidative properties and flavonoids contents of matured Citrus peel extracts. *Food Sci Biotechnol* 15(3): 357-362.
- Shin SS, Yoon HH (2011). Quality characteristics of Sansapyun with various amounts of *Crataegi fructus* concentrate. *Korean J Culinary Research* 17(3): 181-190.
- Szabo MR, Idioiu C, Chambre D (2007). Lupea AX. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chem Pap* 61(3): 214-216.
- Van den Berg R, Haenen GR, Van den Berg H, Bast A (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem* 66(4): 511-517.
- Yamashita A, Soga Y, Iwamoto Y, Asano T, Li Y, Abiko Y, Nishimura F (2008). DNA microarray analyses of genes expressed differentially in 3T3-L1 adipocytes co-cultured with murine macrophage cell line RAW264.7 in the presence of the toll-like receptor 4 ligand bacterial endotoxin. *Int J Obesity* 32(11): 1725-1729.
- Yang J, Du, Y, Huang R, Sun L, Liu H, Gao X, Kennedy JF (2005). Chemical modification and antitumor activity of Chinese lacquer polysaccharide from lac tree *Rhus vernicifera*. *Carbohydr Polym* 59(3): 101-107.

2014년 04월 17일 접수

2014년 05월 10일 1차 논문수정

2014년 05월 20일 2차 논문수정

2014년 05월 30일 3차 논문수정

2014년 06월 10일 논문게재확정