

## 도라지, 울금의 *Aspergillus oryzae* 발효에 의한 항비만효과 연구

강윤환<sup>1</sup> · 김경곤<sup>2</sup> · 김태우<sup>1</sup> · 양춘수<sup>3</sup> · 최 먼<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터, <sup>2</sup>강원대학교 생명건강공학과, <sup>3</sup>철원 친환경영농조합

### Evaluation of the Anti-obesity Activity of *Platycodon grandiflorum* Root and *Curcuma longa* Root Fermented with *Aspergillus oryzae*

Yun Hwan Kang<sup>1</sup>, Kyoung Kon Kim<sup>2</sup>, Tae Woo Kim<sup>1</sup>, Chun Su Yang<sup>3</sup>, and Myeon Choe<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Well-being Bioproducts RIC, Kangwon National University

<sup>2</sup>Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University

<sup>3</sup>Cheorwon Organic Farming Union

**Abstract** In the present study, the phenolic compound level, antioxidant activity, and inhibition of lipid accumulation in *Aspergillus oryzae*-fermented water extracts of the *Platycodon grandiflorum* (PG) root and the *Curcuma longa* (CL) root were determined. Total polyphenol and flavonoid contents were decreased after fermentation. However, the flavonoid content of the fermented PG (FPG) was increased by 2.9-fold that of the PG before fermentation. In addition, the antioxidant activities were significantly decreased following fermentation. The potential anti-obesity activity was assessed by determining lipid accumulation and mRNA expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) in 3T3-L1 cells. *Aspergillus*-fermented extracts of PG and CL roots decreased lipid accumulation, and mRNA expression of SREBP-1c and PPAR $\gamma$  in 3T3-L1 cells. These results indicate that *Aspergillus* fermentation augments the anti-obesity activity of PG and CL by regulating the expression of the genes involved in lipid accumulation and cell differentiation of 3T3-L1 cells.

**Keywords:** *Platycodon grandiflorum*, *Curcuma longa*, fermentation, lipid accumulation, anti-obesity

## 서 론

비만은 지나친 에너지의 섭취, 유전적 감수성 및 육체적 활동성의 감소 등으로 인해 발생하는 에너지 불균형이 원인이 되어 체조직에 과도한 지방이 축적되어 나타나는 질병으로 지난 수십 년 동안 선진국을 위주로 그 유병률이 꾸준히 증가해 왔다(1). 비만은 그 자체적으로나 다른 질병과 연계되어 심혈관계 질환, 당뇨, 비알코올성 간염, 암, 치매, 골관절염 등과 같은 질환들을 유발시키는 결정적인 요소로 밝혀지고 있다(1,2). 지난 수십 년 동안 다양한 종류의 항비만제가 개발되었으나 현재 임상에 적용되고 있는 것은 pancreatic lipase 활성 억제제로서 장내 지방흡수를 감소시키는 orlistat가 있으며(3), 그 외에 식욕억제제로 알려진 sibutramine 등(3)이 있지만 심각한 부작용 때문에 사용이 제한되어 있어 안전성이 확보된 항비만제의 개발이 지속적으로 요구되고 있다.

비만은 또한 지방세포에서 기초 지방분해율(basal lipolysis)이 정상에 비해 매우 증가되어 많은 양의 유리지방산을 생산하게하

며, 이 유리지방산은 활성산소종 및 과산화물을 증가시켜 세포와 조직층에 독성을 유발하여 질병 발생의 원인이 된다(4-6). 활성산소종은 세포내 항산화 효소에 의해 조절되거나 식품으로 섭취된 항산화성분에 의해 소거되는 것으로 알려져 있다(7,8). 그러므로 우수한 항산화활성 소재의 발굴은 비만에 의해 발생한 활성산소종 및 과산화물의 제거를 통한 합병증 예방 및 생체안정화에 기여할 수 있을 것이다.

도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 섬유질이 풍부하고 K, Mg, Ca, Na, Zn, Fe 등이 많이 함유된 알칼리성 식품이며, 오래전부터 생채, 전, 나물 등 식용으로뿐만 아니라 약용으로도 이용되고 있다(9). 주요 약리성분으로는 triterpenoid계 saponin인 platycodin이 알려져 있으며 이외에도 stigmasterol을 비롯한 sterol 성분들이 분석된 바 있다(10). 특히, 도라지는 전통적으로 기관지 질환에 사용되어 왔는데, 효능연구를 통해 혈당강하작용(11), 콜레스테롤 대사 개선(12) 및 항비만작용(13)이 보고되었다. 이처럼 도라지는 다양한 기능성과 그와 관련된 여러 가지 생리활성 성분을 함유하고 있어 건강기능식품 소재로 개발 가능성이 높다.

울금(*Curcuma longa* Radix)은 대한약전에서 이용 부위에 따라 강황의 덩이뿌리를 울금, 뿌리줄기를 강황이라 하였으며 울금은 강황보다 좀 더 진한 황색을 나타낸다고 하였다(14). 울금의 효과로는 항산화(15), 항염증(15), 항균(16), 간기능 개선(17), 항비만(18) 등이 알려져 있으며 유효성분으로 curcumin과 그 유도체인 demethoxycurcumin과 bisdemethoxycurcumin이 알려져 있다(19). 그러나 울금 특유의 향미를 나타내는 turmerone과 zingerene 등의 정유성분이 쓴맛과 이취를 생성하여 소비자의 기호성을 떨어뜨

\*Corresponding author: Myeon Choe, Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Korea

Tel: 82-33-250-8645

Fax: 82-33-342-7368

E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr

Received October 20, 2014; revised December 9, 2014;

accepted December 11, 2014

리는 문제가 있어 이를 해결하기 위한 노력이 진행되고 있다(20).

한편 *Aspergillus oryzae*는 미국 식품의약국안전청과 WHO (World Health Organization)에서 GRAS (Generally Regarded As Safe)로 인정된 미생물(21)로 간장, 된장, 발효주, 코지 제조 등에 사용되어 왔으며 밀기울 등 곡류의 껍질을 비롯한 각종 식품가공부산물에서 잘 번식하여 활용성이 높은 미생물로 알려져 있다. 최근 연구에서는 *Aspergillus oryzae*가 *Lactobacillus* 속 미생물의 기질로 사용됨으로써 유해 세균류에 대한 항균작용을 높이고 소화를 증진하며 체내 콜레스테롤을 감소시키는 것이 보고된 바 있어 그 가치가 더욱 조명되고 있다(22).

본 연구에서는 항비만효능이 알려진 도라지, 울금을 이용하여 항비만 활성을 확인하고 *Aspergillus oryzae*를 이용한 발효과정이 도라지, 울금의 활성에 어떤 영향을 미치는지 확인하고자한다. 또한 연구의 결과는 도라지와 울금의 기능성 식품개발에 기초자료로 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 물 추출 시료 제조

본 실험에 사용된 도라지, 울금의 추출물은 국내산 재료로 구입하여 수세한 후 건조하여 분쇄하고 10배 증류수를 가하여 60°C에서 24시간 교반하여 추출하였다. 추출한 소제는 3,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 분리하고 Whatman filter paper (Whatman International, Maidstone, UK)로 여과한 후 실온에서 방냉한 뒤, 감압농축기(Eyela SB-1000, Eyela Co., Tokyo, Japan)로 농축하고 동결건조기(FD 8508, Ilshin, Dongducheon, Korea)를 이용하여 건조한 후 필요한 농도로 증류수에 희석하여 실험에 사용하였다. 또한 *Aspergillus oryzae*를 이용한 발효 도라지, 울금 추출물은 Fig. 1에 정리한 바와 같이 분말화한 후 sample양과 수분을 동일량 혼합하고 살균하고 0.2%의 *Aspergillus starter*를 처리하여 30°C에서 50시간 발효하고 최종 8%이하 수분함량으로 건조하여 준비하였다. 발효가 완료된 소제는 분쇄하여 발효 전 도라지, 울금 추출방법과 동일하게 물 추출하여 실험에 사용하였다.

### 3T3-L1 세포배양 및 소재 처리

분화 전 3T3-L1 세포를 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양 받았으며 세포의 분화유도는 Oh 등(23)의 방법을 응용하여 수행하였다. 3T3-L1세포는 10% calf serum을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 100 U/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양, 유지하였다. 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 위해 6 well plate에 5×10<sup>5</sup> cell/well의 세포를 분주하여 세포가 완전히 밀집되게 배양하고, 2일을 더 배양한 후 MDI (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1 µM dexamethasone, 10 µg/mL insulin) solution, 및 10% FBS 을 포함하는 DMEM 배지에서 3일 동안 배양함으로써 분화를 개시하였다. 그 다음 10 µg/mL insulin 및 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지로 교환하여 4일 동안 분화를 진행시켰다. 지방축적을 확인하기위한 실험에서는 분화시작단계에서부터 0.25 mg/mL의 소재를 처리하였으며, RNA 발현 확인을 위한 실험에서는 분화가 완료된 7일째부터 6시간 동안 0.25 mg/mL 소재를 처리하였다.

### 도라지 및 울금의 3T3-L1 세포에 대한 독성시험

도라지 및 울금의 세포독성은 Cell Counting Kit (CCK)-8

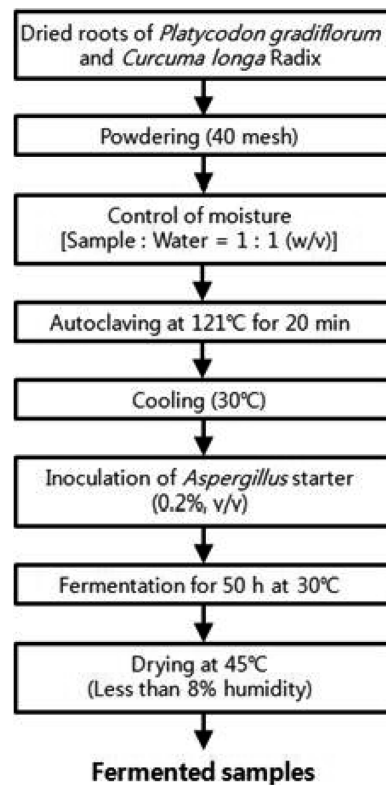


Fig. 1. Preparation and fermentation procedures for *Platycodon grandiflorum* (PG) and *Curcuma longa Radix* (CL).

(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 통해 확인하였다(24). 3T3-L1세포를 받아 각각 96 well에 1.5×10<sup>5</sup> cell/well로 분주한 후 24시간 부착시켰다. FBS가 첨가되지 않은 배지에서 도라지와 울금을 각각 0.1-5 mg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 24시간 후 배양 중인 배지(100 µL)에 CCK-8 reagent를 10 µL씩 가해주고 3시간 동안 37°C에서 배양한 후 microplate reader (EL808; BioTek, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)의 흡광도 값을 기준(100%)으로 세포독성을 비교 하였다.

### 총 polyphenol 및 flavonoid 함량 측정

도라지 및 울금의 발효 전·후 총 polyphenol 및 flavonoid의 함량은 Lee 등(24)이 사용한 동일한 조건에서 수행하였다. 즉, total polyphenol은 Folin-Ciocalteu's phenol을 이용한 비색법을 응용하여 측정하였는데, 증류수에 희석시킨 시료 0.04 mL에 증류수 0.96 mL, 50% Folin-Ciocalteu' phenol 0.1 mL을 넣고 3분간 방치시켰다. 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.2 mL을 넣은 후 1시간 동안 방치 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 total polyphenol 함량을 도출하였다.

Total flavonoid는 시료 0.1 mL에 10% aluminum nitrate 0.02 mL, 1M potassium acetate 0.02 mL와 80% ethanol 0.86 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 방치 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 quercetin (Wako, Osaka, Japan)를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 total flavonoid 함량을 도출하였다.

**항산화 활성측정**

도라지 및 울금의 발효 전·후 항산화활성은 Lee 등(24)이 사용한 동일한 조건과 방법으로 수행하였다. 즉, 유리 라디칼의 소거능은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용하여 측정하였다. 각 농도별 시료 0.05 mL에 DPPH 0.15 mL를 첨가하여 압조건에서 30분간 반응시킨 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 positive control로 사용하여 비교하였다. 다음 계산식에 의거하여 라디칼 소거능을 계산 하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = 1 - \left( \frac{\text{sample 532 nm}}{\text{control 532 nm}} \right) \times 100$$

환원력(reducing power)은 각 농도별 시료 0.25 mL에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 0.25 mL, 1% potassium ferricyanide 0.25 mL를 혼합하여 50°C에서 20분 동안 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 0.25 mL를 가하였다. 이 반응액을 350×g에서 10분간 원심분리한 후 상층액 0.5 mL에 증류수 0.5 mL, 1% ferric chloride 0.1 mL를 혼합 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Oil Red O 염색**

도라지 및 울금의 발효 전·후 소재의 지방세포 분화억제 및 지방축적억제 활성을 확인하기위해 Park 등(25)의 방법에 따라 oil red O staining을 실시하였다. Oil red O staining은 중성지방 염색을 통해 지방 세포 내 중성지방 축적정도를 시각화 할 수 있다. 3T3-L1 지방전구세포를 6일 동안 분화 시킨 후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척하여 10% formaldehyde 용액으로 세포를 고정시켰다. 1시간 동안 충분히 고정시킨 후 다시 PBS로 3회 세척하고 oil red O 염색시약(Sigma)을 첨가하여 4시간동안 실온에서 염색하였다. Oil red O 시약을 제거한 후 PBS로 3회 세척한 다음 현미경을 이용하여 관찰하였다. 흡광도 측정을 위해 100% isopropyl alcohol로 염색된 염료를 용출시켜 microplate reader (EL808; BioTek)를 이용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**mRNA 발현확인**

분화완료한 3T3-L1 지방세포에 6시간 동안 0.2 mg/mL 농도의 도라지와 울금의 발효 전·후 소재를 처리한 후 배양배지를 제거하고 QIAzol lysis reagent (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 제조사에서 제공하는 방법에 따라 total RNA를 분리하였다. 260 nm에서 흡광도를 측정하여 total RNA양을 정량하고 first strand cDNA를 합성하기 위하여 AmfiRivert Platinum cDNA synthesis Master Mix (GenDEPOT, Barker, TX, USA)를 이용하였으며 제공된 방법에 따라 추출한 RNA 2 µg를 RNase free

water로 9 µL을 맞추고 70°C에서 5분간 반응시킨 후 2×cDNA synthesis buffer 10 µL, cDNA synthesis enzyme mix 1 µL를 섞어 11 µL씩 각 PCR tube에 더한 후 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 Go Tag Green Master (Promega, Madison, WI, USA) 10 µL, 10 pmole의 forward primer와 reverse primer를 각각 1 µL, nuclease free water 7 µL, 합성한 first-stand cDNA 1 µL를 첨가하여 잘 섞은 후 실행하였으며 각각의 primer는 Table 1와 같으며, PCR조건은 Table 2과 같다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1% agarose gel에 100 V에서 30분간 전기영동 후 UV 광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도는 imageJ (National institutes of health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다.

**통계분석**

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (statistical package for social sciences, Version 10.0, Chicago, IL, USA) program을 이용하여 독립적인 3회 반복 실험값을 mean±SD로 표시하였고, 두 그룹간의 차이는 unpaired two-tailed t-test로 분석하였으며 p<0.05 수준 에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**도라지, 울금의 세포독성 및 total phenolic compound 측정**

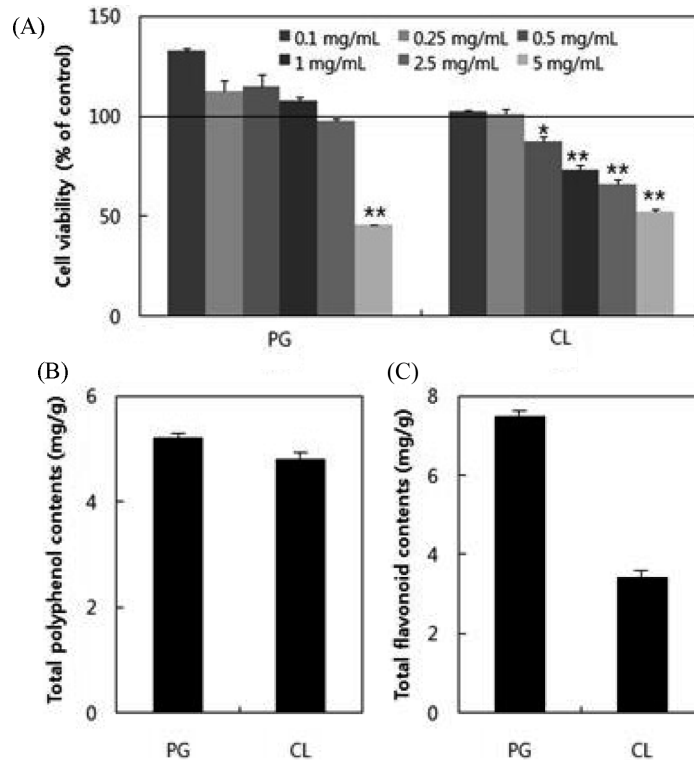
먼저 도라지, 울금 추출물의 실험농도를 결정하기위해 3T3-L1 세포에 대한 세포독성을 CCK-8 assay kit를 이용하여 평가하였다. 평가결과 세포의 생존율은 Fig. 2A와 같다. 식품으로 많이 쓰이는 도라지의 경우 5 mg/mL에서 독성을 나타내기 시작했으며 울금의 경우 0.5 mg/mL의 농도에서 독성이 나타나기 시작했다. 3T3-L1 세포에 대한 도라지의 세포독성시험은 아직 보고된 자료를 찾을 수 없었으며, 울금의 세포독성은 에탄올 추출물의 경우 Ho 등(26)의 연구결과에서 0.14 mg/mL에서 독성이 나타났으며, 물 추

**Table 1. PCR primer sets and expected sizes of the PCR products used in the experiment**

Gene	Primer (5'→3')	Size (bp)
PPAR $\gamma$	forward GGT GAA ACT CTG GGA GA	195
	reverse CAA CCA TTG GGT CAG C	
SREBP-1c	forward GIA GCC CCT TGI CTT TTG GC	244
	reverse CGG TGT GIA CCC GTA GCA TC	
GAPDH	forward GGA GCC AAA AGG GTC ATC AT	203
	reverse GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT	

**Table 2. PCR condition of each primer set**

Gene	Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension
PPAR $\gamma$	95°C, 5min	95°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min
			28 cycle		
SREBP-1c	95°C, 5min	95°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min
			28 cycle		
GAPDH	95°C, 5min	95°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min
			28 cycle		



**Fig. 2.** Effect of water extracts of *Platycodon grandiflorum* (PG) and *Curcuma longa Radix* (CL) on the cell viability (A), total polyphenol content (B), and total flavonoid content (C) of 3T3-L1 preadipocytes. The values are expressed as the mean $\pm$ SD of triplicate analyses. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01

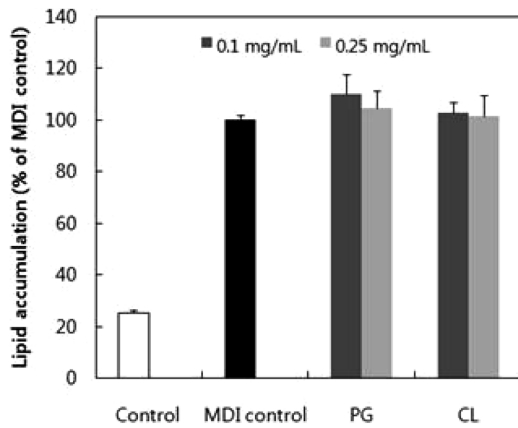
출물의 경우 Park 등(27)의 연구결과에서 0.04 mg/mL에서 독성이 나타나는 것을 확인하였다. 본 실험의 도라지와 울금 물 추출물의 3T3-L1 세포에 대한 독성시험결과와 차이가 발생한 것은 소재의 추출방법 차이가 영향을 미친 것으로 판단되며, 향후 실험은 두 소재가 공동으로 독성을 나타내지 않는 0.25 mg/mL 이하의 농도에서 실험을 수행하였다.

식물은 많은 양의 페놀화합물 분자를 함유하고 있는데 이는 식물체의 고유 색깔을 부여하고 생리작용에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그 중 폴리페놀의 함량을 많이 함유하고 있는 식물이 항산화 활성이 높은 것(28)으로 알려져 있으며 이 페놀화합물들은 항암, 항염, 항비만 등에도 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다(29,30). 본 실험에서 도라지와 울금의 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량을 gallic acid와 quercetin을 폴리페놀과 플라보노이드의 표준물질로 각각 사용하여 측정된 결과 폴리페놀은 도라지에서 5.2 $\pm$ 0.41 mg/g, 울금에서는 4.8 $\pm$ 0.62 mg/g이 측정되었고 플라보노이드는 도라지에서 7.57 $\pm$ 0.55 mg/g, 울금에서는 3.87 $\pm$ 0.66 mg/g이 측정되었다(Fig. 2B, C). 이는 Lee 등(31)이 측정된 도라지의 폴리페놀 9.84 $\pm$ 0.09 mg/g, 플라보노이드 2.06 $\pm$ 0.13 mg/g과 다소 차이가 있지만 근사한 값이라 판단되며 이런 측정값의 차이는 Hwang 등(32)의 결과에서 보고된 바와 같이 추출농도에 따라 급격한 폴리페놀 함량의 차이가 나타나는 것을 바탕으로 본 실험과의 추출조건의 차이에 의한 것으로 판단된다. 특이한 것은 본 실험의 결과에서 폴리페놀보다 플라보노이드의 함량이 더 높게 관찰된 점이다. 이는 Kim 등(33)의 연구에서 사용된 감초, 인삼, 삼칠인삼(중국삼)에서도 관찰되는 특징이지만 Yang 등(34)의 결과에서는 인삼의 폴리페놀함량이 플라보노이드보다 높게 측정되는 것으로 보아 추출방법 또는 조건에 따라 나타나는 현상이라 판단된다. 울금의 경우 Park 등(27)이 보고한 페놀

화합물은 약 36.8 mg/g, 플라보노이드는 약 12.2 mg/g이며, Park 등(35)은 폴리페놀함량을 11.29 $\pm$ 1.05 mg/g으로 보고하여 역시 추출방법에 따라 함량차이가 크게 나는 것을 확인할 수 있어 본 실험결과와의 차이 이유인 것으로 판단된다.

#### 도라지, 울금의 지방축적 억제 활성

3T3-L1세포를 지방세포로 분화시키는 과정에서 분화억제 소재를 처리하고 oil red O 염색을 통해 중성지방의 축적량을 시각화함으로써 지방세포분화 억제능을 확인할 수 있다. 본 실험에서는 도라지와 울금 물 추출물이 3T3-L1 세포의 분화 및 지방축적에 미치는 영향을 확인하기 위해 지방세포 분화과정동안 0.1, 0.25 mg/mL 농도의 소재를 처리하고 분화가 완료된 후 oil red O 염색을 통해 세포내 지방축적량을 확인하였다. 그 결과 두 물 추출물은 분화억제 및 지방축적에 유의한 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 도라지는 Roh 등(36)의 연구에서 pancreatic lipase 억제효과가 잘 관찰되지 않아 항비만 효과가 낮은 것으로 평가되었으며, Lee 등(37)의 연구에서도 도라지 에탄올 추출물의 장기간 복용이 비만에 효과를 보인다는 결과와 3T3-L1 세포에서도 0.05 mg/mL에서부터 유의한 효과가 관찰되었지만 0.4 mg/mL에서 뚜렷한 지방축적억제효과가 관찰된 바가 있고, Lee 등(31)의 연구에 의하면 에탄올 추출물 보다 물 추출물의 폴리페놀함량이 낮은 것으로 확인되어 본 실험에서 사용된 도라지의 물 추출물은 0.25 mg/mL에서 충분한 효능을 나타내지 못하는 것으로 판단된다. 울금은 Park 등(27)의 연구결과에서 물 추출물의 3T3-L1 지방세포 분화 억제능이 거의 관찰되지 않으며 에탄올 추출물에서 유의하게 측정되는 것으로 보고하였다. 실험결과와 문헌자료를 통해 도라지와 울금 물 추출물의 지방세포분화 억제능이 우수하지는 않은 것을 확인할 수 있었다.



**Fig. 3. Effect of water extracts of *Platycodon grandiflorum* (PG) and *Curcuma longa* Radix (CL) on intracellular lipid accumulation.** Lipid accumulation was measured using oil red O staining. The values are expressed as the mean±SD of the experimental determinations made in triplicate. Control: preadipocyte, MDI control: adipocyte

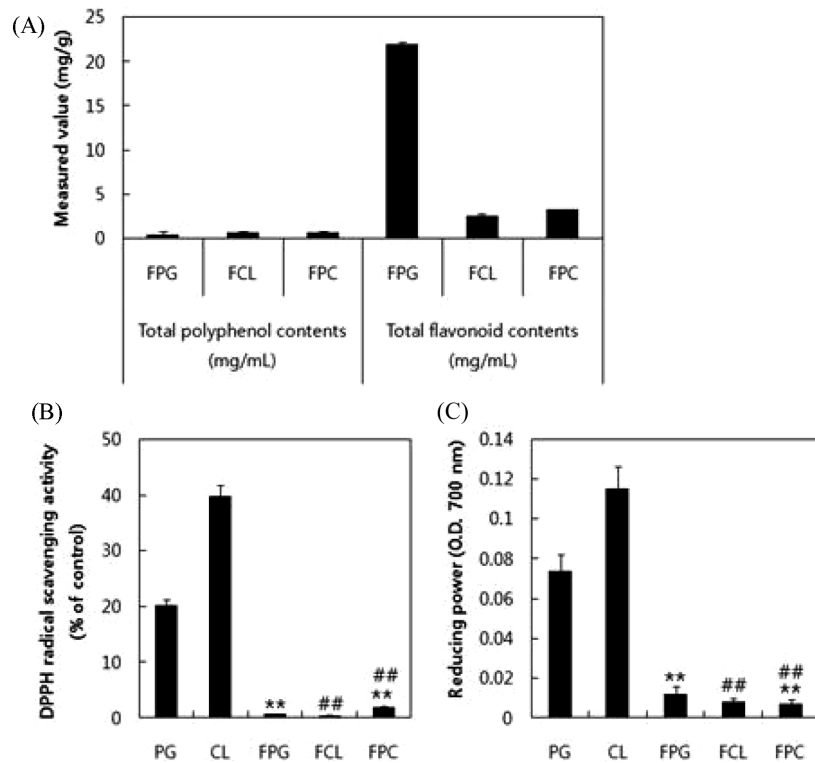
**도라지, 울금의 *Aspergillus oryzae* 발효에 의한 total phenolic compound 및 항산화 활성 변화**

발효는 색상의 변화와 함께 부드러운 맛과 소화성을 향상시키는 목적으로 주로 이용되며, 또한 발효 중 수용성의 새로운 성분을 생성하는 효과가 있다(38,39). 발효과정에 의한 도라지, 울금

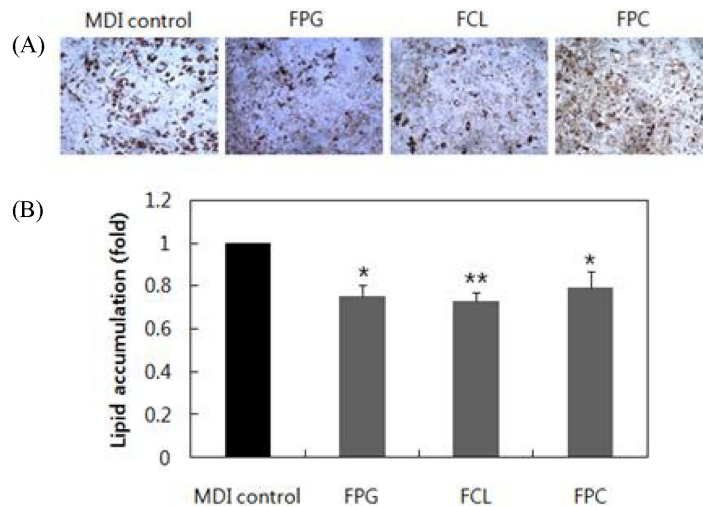
의 phenolic compound 및 생리활성의 변화를 확인하기 위해, 본 실험에서는 도라지와 울금에 *Aspergillus oryzae*를 처리하여 발효한 후 Fig. 4와 같이 페놀화합물의 함량과 항산화 활성의 변화를 측정하였다. 그 결과 발효단계 후 폴리페놀과 플라보노이드의 함량 및 항산화 활성이 발효전보다 감소하였으며, 도라지 발효물에서만 플라보노이드 함량이 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4A). 발효 후 폴리페놀의 함량은 1 mg/g 이하로 크게 감소하였으며, 플라보노이드는 도라지 발효물에서 21.95±0.02 mg/g으로 발효 전 7.57 mg/g보다 크게 증가하였으며 울금 발효물은 2.60±0.03 mg/g으로 발효 전 3.87 mg/g보다 감소한 것이 확인되었다. 도라지와 울금을 같은 양 혼합한 소재의 발효물에서도 도라지 발효물보다 크게 감소한 3.15±0.02 mg/g의 함량이 확인되었다. 이는 Lee 등(38)의 *Aspergillus oryzae*를 이용한 청미래덩굴 발효에서도 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 감소한 것을 확인할 수 있어 발효과정을 통해 폴리페놀과 플라보노이드가 새로운 물질로 전환된 것을 예측할 수 있다. DPPH 라디칼 소거능과 환원력을 측정된 결과 발효 전 소재의 항산화 활성에 비해 발효 후 크게 감소한 것을 Fig. 4B, C를 통해 확인할 수 있다. 이는 Kim 등(28)이 보고한 바와 같이 항산화 활성에 주요한 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량감소가 원인으로 판단된다.

**도라지, 울금의 *Aspergillus oryzae* 발효에 의한 지방세포분화 억제능 변화**

발효과정을 통해 새로운 유효성분이 생성되고 그로인해 소재의 효능이 개선되는 예는 많은 연구를 통해서 확인된 바 있다.



**Fig. 4. The total polyphenol and flavonoid contents, as well as the antioxidant activity of the fermented water extracts of *Platycodon grandiflorum* and *Curcuma longa* Radix.** (A) Total polyphenol and flavonoid contents of the fermentation products of *Platycodon grandiflorum* (FPG), *Curcuma longa* Radix (FCL), and the mixture of *Platycodon grandiflorum* and *Curcuma longa* Radix (FPC). (B, C.) DPPH radical scavenging activity and reducing power of the extracts obtained from the fermentation product. The values are expressed as the mean±SD of triplicate analyses. \*\* $p < 0.01$  compared with PG, ## $p < 0.01$ , compared with CL. PG: *Platycodon grandiflorum*, CL: *Curcuma longa* Radix



**Fig. 5. Effect of fermented water extracts of *Platycodon grandiflorum* (FPG) and *Curcuma longa* Radix (FCL) on intracellular lipid accumulation.** (A) Effects of FPG, FCL, and a fermented mixture of *Platycodon grandiflorum* and *Curcuma longa* Radix (FPC) on lipid droplet formation in 3T3-L1 cells. (B) Quantification of the relative lipid content using oil red O staining. The values are expressed as the mean $\pm$ SD of the experimental determinations made in triplicate. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, relative to the MDI control. MDI: 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX), 1  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/mL insulin

Jeon 등(40)의 연구에서는 글썽질의 *Aspergillus oryzae* 발효를 통해 항비만 효능이 향상되었으며, Kim 등(41)의 연구는 도라지의 유산균 발효가 항아토피효능을 개선하는 것으로 보고하였다. 본 실험에서는 Fig. 4의 결과에서 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량과 항산화활성의 감소에서 불구하고 Fig. 5에서 보는 바와 같이 3T3-L1 세포의 분화가 도라지, 울금, 도라지 및 울금 혼합물의 *Aspergillus oryzae* 발효물 0.25 mg/mL 처리에 의해 유의하게 억제되는 것이 관찰되었다. Adipocyte로의 분화가 완료된 MDI control과 비교하여 발효도라지(FPG)는 약 25%, 발효울금(FCL)은 약 27%, 도라지와 울금 혼합 발효물(FPC)은 약 21%의 유효한 분화억제능을 나타내었다. 이는 Fig. 3의 결과와 달리 *Aspergillus oryzae*에 의한 발효과정이 3T3-L1 세포의 분화를 억제할 수 있는 유효성분의 생성을 유도한 것으로 판단할 수 있으며, 또한 Ho 등(42)이 보고한 *Aspergillus oryzae*에 의해 발효된 울금의 항비만 효과와 동일한 결과임을 확인할 수 있다. 본 실험 결과를 통해 *Aspergillus oryzae* 발효공정이 도라지와 울금의 효능을 증대시키며, 기능성 소재로의 개발에 활용이 가능함을 알 수 있다.

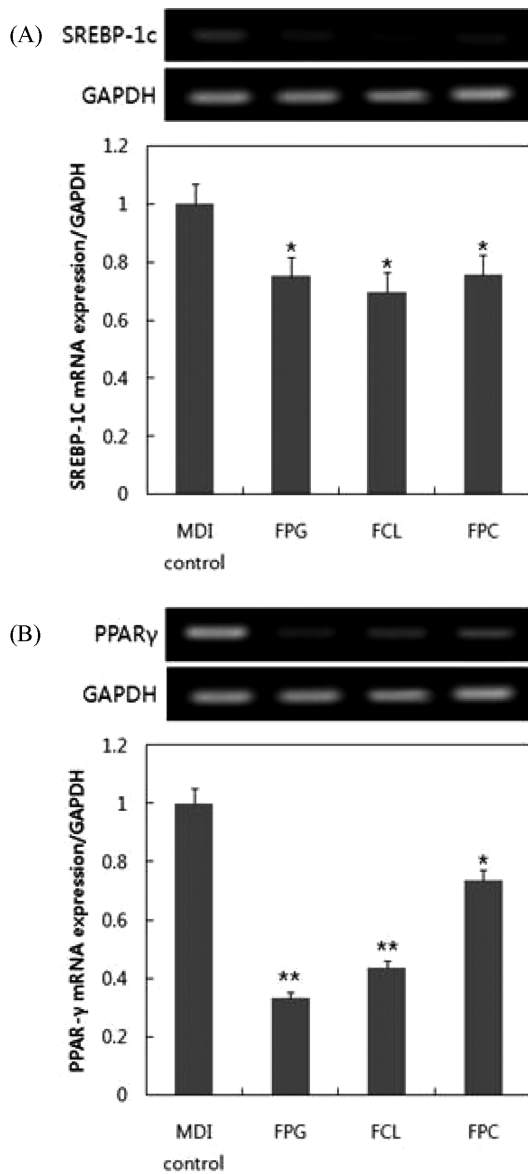
#### 도라지, 울금 처리에 의한 지방대사관련 유전자의 발현 변화

Preadipocyte는 insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine의 유도인자를 필요로 하며, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ )는 지방세포분화의 핵심적인 기능을 담당하고 있다(43). PPAR $\gamma$ 는 sterol regulatory element-binding proteins-1c (SREBP-1c) 전사인자에 의해 조절되며, 섭취된 잉여 에너지원으로부터 중성지방의 합성을 촉진하여 지방과 간 조직에 저장한다(44). 지방생성 및 비만관련 대사질환의 효과적인 예방을 위해서 이들 유전자의 제어가 필요하다. 본 실험에서는 분화가 완료된 3T3-L1 세포에 발효 전·후 소재 0.25 mg/mL를 6시간 동안 처리한 후 SREBP-1c와 PPAR $\gamma$ 의 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 분화 후(MDI control) 확인된 SREBP-1c와 PPAR $\gamma$ 의 발현량이 소재 처리에 따라 유의하게 감소하는 것이 관찰되었다. SREBP-1c의 경우 MDI control 대비 발효도라지(FPG) 추출물 처리에 의해 약 25%, 발효울금(FCL) 추출물 처리에 의해 약 31%, 도라지, 울금 혼합 발효물 처리에 의

해 약 25%의 발현감소가 확인되었으며, PPAR $\gamma$ 의 경우 MDI control 대비 발효도라지(FPG) 추출물 처리에 의해 약 67%, 발효울금(FCL) 추출물 처리에 의해 약 57%, 도라지, 울금 혼합 발효물 처리에 의해 약 27%의 발현감소가 확인되었다. 이는 도라지와 울금이 *Aspergillus oryzae* 발효에 의해 3T3-L1 분화 억제능력이 향상되었음을 의미하며, 도라지와 울금을 이용한 기능성식품의 개발에서 그 기능향상을 유도할 수 있는 공정개발의 기초자료를 제공하는 것이라 할 수 있다. 그러나 도라지에 함유된 platycosides (45)와 울금에 함유된 curcuminoid(19,40)가 항비만 물질로 보고되어있지만 *Aspergillus oryzae* 발효에 의한 함량의 변화 또는 새로운 유효물질로의 전환 등에 대한 물질탐색에 관한 연구와 구체적인 분화억제 및 지방축적억제 메커니즘에 대한 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것으로 판단된다.

## 요 약

본 연구는 항비만 소재로 연구된 도라지와 울금 소재를 대상으로 발효 전과 후 3T3-L1 지방세포의 분화 억제효능을 확인하고자 하였다. 그 결과 발효 전 도라지와 울금은 3T3-L1 세포의 분화에 영향을 미치지 못하는 것을 확인할 수 있었다. *Aspergillus oryzae* 발효를 통해 만들어진 소재들은 도라지 발효물의 플라보노이드 증가를 제외하면 모든 소재에서 폴리페놀과 플라보노이드의 함량 및 항산화 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 발효 전과 다르게 발효 후 도라지, 울금 및 도라지와 울금 혼합물의 발효물에서 3T3-L1 세포의 분화억제능이 oil red O 염색법을 통해 관찰되었으며, mRNA 발현 확인을 통해 SREBP-1c와 PPAR $\gamma$ 의 발현을 억제하여 분화를 억제할 수 있음을 확인하였다. 이는 *Aspergillus oryzae* 발효과정이 도라지와 울금의 항비만효과를 개선할 수 있으며, 발효과정을 통해 새로운 항비만 유효성분이 생성되었음을 예측할 수 있었다. 본 연구결과를 통해 *Aspergillus oryzae* 발효공정이 도라지와 울금의 기능을 향상시켜 우수한 기능성 제품의 개발에 유용하게 활용될 수 있음을 확인할 수 있었으며, 개발공정의 기초자료를 제공할 것으로 사료된다.



**Fig. 6. The mRNA expression levels of SREBP-1c and PPAR $\gamma$  by treatment of the fermented *Platycodon grandiflorum* (FPG), *Curcuma longa* Rhizoma (FCL) and mixture of *Platycodon grandiflorum* and *Curcuma longa* Rhizoma (FPC). (A) SREBP-1c mRNA expression resulting from the water extracts treatment of FPG, FCL, and FPC. (B) PPAR $\gamma$  mRNA expression following treatment with water extracts of FPG, FCL, and FPC. The values are expressed as the mean $\pm$ SD of triplicate analyses. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 relative to the MDI control. MDI: 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX), 1  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/mL insulin.**

**감사의 글**

본 결과물은 산업통상자원부 지역특화산업육성사업(R0002738), 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터(B0009702) 및 강원대학교 생명공학연구소(320130015)의 일부 지원으로 수행한 연구 결과로 이에 감사드립니다.

**References**

1. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-

643 (2000)  
 2. Grundy SM. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 563S-572S (1998)  
 3. Yun JW. Possible anti-obesity therapeutics from nature-a review. *Phytochemistry* 71: 1625-1641 (2010)  
 4. Park MJ. Recent advances in regulating energy homeostasis and obesity. *Korean J. Pediatr.* 48: 126-137 (2005)  
 5. Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Imaizumi K. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci. Rep.* 2: 799 (2012)  
 6. Schleicher E, Friess U. Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. *Kidney Int. Suppl.* 72: S17-S26 (2007)  
 7. Kim TK, Shin HD, Lee YH. Stabilization of polyphenolic antioxidants using inclusion complexation with cyclodextrin and their utilization as the fresh-food preservative. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 266-271 (2003)  
 8. Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, Mo H, Shastri A, Su R, Bapat P, Kwun I, Shen CL. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J. Nutr. Biochem.* 25: 1-18 (2014)  
 9. Shon MY, Seo JK, Kim HJ, Sung NJ. Chemical compositions and physiological activities of *doraji* (*Platycodon grandiflorum*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 717-720 (2001)  
 10. Chung JH, Shin PG, Ryu JC, Jang DS, Cho SH. Pharmaceutical substances of *Platycodon grandiflorus* (jacquin) *A. De Candolle*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 40: 152-156 (1997)  
 11. Seo JK, Chung YC, Chun SS, Lee YY, Lee SJ, Shon MY, Sung NJ. Effect of physiologically active compounds isolated from *Platycodon grandiflorum* on streptozotocin induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 981-986 (2004)  
 12. Seo EK, Kim KS, Lee TK, Woo DY, Kim CH, Lee YC. Effect of dietary *Platycodon grandiflorum* on plasma glucose and lipid metabolism in KK- $A^y$  mice and streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Oriental Med.* 1: 14-20 (2000)  
 13. Byun BH. Antiobesity effects of *Platycodon grandiflorum* extract on body weight changes and serum lipid profiles of obese rat induced high fat diet. *Korean J. Life Sci.* 13: 896-902 (2003)  
 14. Kim KS, Choung MG, Park SH. Quantitative determination and stability of curcuminoid pigments from turmeric (*Curcuma longa* L.) root. *Korean J. Crop Sci.* 50: 211-215 (2005)  
 15. Oh H, Park H, Ju MS, Jung SY, Oh MS. Comparative study of anti-oxidant and anti-inflammatory activities between *Curcuma longae* Radix and *Curcuma longae* Rhizoma. *Korean J. Herbolgy* 25: 83-91 (2010)  
 16. Cho HR, Park UY, Chang DS. Studies on the shelf-life extension of *jeotkal*, salted and fermented seafood. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 652-660 (2002)  
 17. Salama SM, Abdulla MA, AlRashdi AS, Ismail S, Alkiyumi SS, Golbabapour S. Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Curcuma longa* on thioacetamide induced liver cirrhosis in rats. *BMC Complement. Altern. Med.* 13: 56 (2013)  
 18. Shon MS, Kim GN. Anti-oxidant and anti-obese activities of turmeric (*Curcuma longa* L.) extract in 3T3-L1 cells. *Korean J. Aesthet. Cosmetol.* 12: 169-175 (2014)  
 19. Revathy S, Elumalai S, Benny M, Antony B. Isolation, purification and identification of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) by column chromatography. *J. Exp. Sci.* 2: 21-25 (2011)  
 20. Choi SN, Choi EH, Yoo SS. Quality characteristics and antioxidative activities of *Majakgwa* added with fermented turmeric powder. *Korean J. Food Cook. Sci.* 29: 223-231 (2013)  
 21. Machida M, Yamada O, Gomi K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of koji mold and exploration of its future. *DNA Res.* 15: 173-183 (2008)  
 22. Lee KW, Lee SK, Lee BD. *Aspergillus oryzae* as probiotic in poultry-a review. *Int. J. Poultry Sci.* 5: 1-3 (2006)  
 23. Oh SD, Kim M, Min BI, Choi GS, Kim SK, Bae H, Kang C, Kim DG, Park BJ, Kim CK. Effect of *Achyranthes bidentata* Blume on 3T3-L1 Adipogenesis and rats fed with a high-fat diet. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2014: Article ID 158018 (2014)  
 24. Lee SM, Kang YH, Kim DJ, Kim KK, Lim JG, Kim TW, Choe M. Comparison of antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibition activi-

- ties among water extracts and sugar immersion extracts of green pepper, purslane and shiitake. *J. East Asian Soc. Diet. Life* 24: 101-108 (2014)
25. Park YH, Choi JH, Whang K, Lee SO, Yang SA, Yu MH. Inhibitory effects of lyophilized dropwort vinegar powder on adipocyte differentiation and inflammation. *J. Life Sci.* 24: 476-484 (2014)
  26. Ho JN, Park SJ, Choue R, Lee J. Standardized ethanol extract of *Curcuma longa* L. fermented by *Aspergillus oryzae* promotes lipolysis via activation of cAMP-dependent PKA in 3T3-L1 adipocytes. *J. Food Biochem.* 37: 595-603 (2013)
  27. Park J, Lee J, Jun W. Radical scavenging and anti-obesity effects of various extracts from turmeric (*Curcuma longa* L.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1908-1914 (2013)
  28. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 333-338 (2004)
  29. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 727-747 (2004)
  30. Baret P, Septembre-Malaterre A, Rigoulet M, Lefebvre d'Hellen-court C, Priault M, Gonthier MP, Devin A. Dietary polyphenols preconditioning protects 3T3-L1 preadipocytes from mitochondrial alterations induced by oxidative stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45: 167-174 (2013)
  31. Lee SJ, Bang WS, Hong JY, Kwon OJ, Shin SR, Yoon KY. Antioxidant and antimicrobial activities of black *Doraji* (*Platycodon grandiflorum*). *Korean J. Food Preserv.* 20: 510-517 (2013)
  32. Hwang CR, Oh SH, Kim HY, Lee SH, Hwang IG, Shin YS, Lee JS, Jeong HS. Chemical composition and antioxidant activity of *Deoduk* (*Codonopsis lanceolata*) and *Doragi* (*Platycodon grandiflorum*) according to temperature. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 798-803 (2011)
  33. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 333-338 (2004)
  34. Yang SJ, Woo KS, Yoo JS, Kang TS, Noh YH, Lee J, Jeong HS. Change of Korean ginseng components with high temperature and pressure treatment. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38: 521-525 (2006)
  35. Park SW, Byun GI. Development of *Bulgogi* sauce added with concentrated *Curcuma longa* L. *Korean J. Culinary Res.* 20: 143-158 (2014)
  36. Roh C, Jung U. Screening of crude plant extracts with anti-obesity activity. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 1710-1719 (2012)
  37. Lee CE, Hur HJ, Hwang JT, Sung MJ, Yang HJ, Kim HJ, Park JH, Kwon DY, Kim MS. Long-term consumption of platycodi radix ameliorates obesity and insulin resistance via the activation of AMPK pathways. *Evid.-based Compl. Alt.* 2012: Article ID 759143 (2012)
  38. Lee SI, Lee YK, Kim SD, Yang SH, Suh JW. Sensory quality, antioxidant, and inhibitory activities of XO and AO of *Smilax china* leaf tea fermented by *Aspergillus oryzae*. *Korean J. Food Preserv.* 21: 129-139 (2014)
  39. Lee YK, Lee SI, Kim JS, Yang SH, Lee IA, Kim SD, Suh JW. Antioxidant activity of green tea fermented with *Monascus pilosus*. *J. Korean soc. Appl. Biol. Chem.* 55: 19-25 (2012)
  40. Jeon HJ, Yu SN, Kim SH, Park SK, Choi HD, Kim KY, Lee SY, Chun SS, Ahn SC. Antiobesity effect of citrus peel extract fermented with *Aspergillus oryzae*. *J. Life Sci.* 24: 827-836 (2014)
  41. Kim MS, Kim WG, Chung HS, Park BW, Ahn KS, Kim JJ, Bae H. Improvement of atopic dermatitis-like skin lesions by *Platycodon grandiflorum* fermented by *Lactobacillus plantarum* in NC/Nga mice. *Biol. Pharm. Bull.* 35: 1222-1229 (2012)
  42. Ho JN, Jang JY, Yoon HG, Kim Y, Kim S, Jun W, Lee J. Anti-obesity effect of a standardised ethanol extract from *Curcuma longa* L. fermented with *Aspergillus oryzae* in ob/ob mice and primary mouse adipocytes. *J. Sci. Food Agr.* 92: 1833-1840 (2012)
  43. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell* 4: 611-617 (1999)
  44. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol. Cell Biol.* 19: 5495-5503 (1999)
  45. Nyakudya E, Jeong JH, Lee NK, Jeong YS. Platycosides from the Roots of *Platycodon grandiflorum* and Their Health Benefits. *Prev. Nutr. Food Sci.* 19: 59-68 (2014)