

발효 우엉 에탄올 추출물의 항산화 및 항비만 활성

†김미현 · 김종규* · 최재홍*

경일대학교 식품과학부, *(주)내추럴씨엔에프

Antioxidant and Anti-Obesity Activity of Ethanol Extracts from Fermented *Arctium lappa* L.

†Mi Hyun Kim, Jong Gyu Kim* and Jae Hong Choi*

School of Food Science, Kyungil University, Gyeongsan 712-701, Korea

*Natural C&F, Andong 760-805, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the antioxidant and anti-obesity activity of ethanol extracts from fermented *Arctium lappa* L. *Arctium lappa* fermented twice with *Phellinus linteus* (2nd FA) showed more DPPH radical scavenging activity than non-fermented *Arctium lappa* (NFA), and *Arctium lappa* fermented once (1st FA) at a concentration of 62.5 ppm. The 2nd FA showed the highest level of ABTS radical scavenging activity at concentration range of 31.5~125 ppm. The ABTS free radical scavenging activities of 1st FA and 2nd FA were similar to that of BHA, a synthetic antioxidant, at a concentration of 250 ppm. The total polyphenol content of 2nd FA was higher than those of NFA and 1st FA. The flavonoid content was significantly increased in 1st FA and 2nd FA than NFA. During adipocyte differentiation, lipid accumulation in 3T3-L1 cells was significantly decreased in the order of NFA, 1st FA, and 2nd FA at all concentrations. In conclusion, the antioxidant and anti-obesity activities of *A. lappa* were increased depending on the degree of fermentation. It is suggested that fermented *Arctium lappa*, especially 2nd FA, could be used as a natural ingredient for functional foods and medicine.

Key words: *Arctium lappa* L., antioxidant activity, polyphenol, anti-obesity activity

서 론

우엉(*Arctium lappa* L.)은 국화과에 속하는 초본식물로 우리나라, 일본, 중국을 비롯한 아시아와 유럽 및 시베리아 등지에 널리 분포하고 있다. 예로부터 우엉의 뿌리는 주로 식용으로 이용되어져 왔으며, 종자와 잎은 빈혈, 변비, 당뇨, 생리통, 신장병, 통풍, 간염 등의 증상에 효능이 있는 것으로 알려져 있다(Fuchigami 등 1990; Han & Koo 1993; Ferracane 등 2010).

우엉에 함유되어 있는 약리성분으로는 뿌리에 풍부한 이눌린과 종자 부위의 arctiin, arctigenin 및 cynarin 등이 있다(Duh PD 1998; Lin 등 2002; Matsuzaki 등 2008; Jeong 등

2011). 이눌린은 우엉 뿌리에 함유되어 있는 당질로 이노작용이 있으며, 그 외에도 항산화 및 항염증 활성, 고혈압, 동맥경화증과 당뇨병에 대한 효과가 보고되고 있다(Duh PD 1998). 또한 우엉의 종자부위에 주로 함유되어 있는 arctigenin과 arctiin은 phenolic compound의 일종으로 free radical을 소거하는 항산화 활성이 있으며, 세포증식조절인자로 최근 암유전자로 알려지고 있는 cyclin D1의 억제 및 쥐의 사구체염에 대한 효과가 있다(Chen 등 2004; Matsuzaki 등 2008; Wu 등 2009).

최근에 이루어지고 있는 우엉의 기능성에 관한 연구로는 우엉 뿌리의 항혈전 및 항산화 활성 효과를 보고한 연구(Kim 등 2014)와 우엉 뿌리 에탄올 추출물의 지질 과산화 억제 효

† Corresponding author: Mi Hyun Kim, School of Food Science, Kyungil University, Gyeongsan 712-701, Korea. Tel: +82-53-600-5741, Fax: +82-53-600-5759, E-mail: mhkim306@kiu.kr

과, malondialdehyde-bovine serum albumin conjugation 억제 효과 및 항돌연변이 활성을 검증한 연구(Lee MS 2011), 우영 뿌리 추출물의 tyrosinase 저해 활성을 분석한 연구(Im & Lee 2014) 및 내인성 염증물질인 TNF- α 에 의해 유도되는 염증반응에서 상피세포의 ICAM-1 발현조절과 NO-iNOS 유도조절능에 대한 우영 추출물의 효과에 관한 연구(Kim 등 2012)가 있다.

기존의 연구들에서 우영의 생리활성을 검증하기 위한 연구는 다소 이루어지고 있으나, 모두 단순 우영 추출물의 효능에 대한 연구이며, 미생물을 이용하여 발효한 우영의 생리활성에 관한 연구는 거의 없다. 발효는 미생물의 대사 작용을 거쳤기 때문에 식품에 함유된 성분들이 고분자에서 저분자로 전화되어 우리 몸에서 소화 및 흡수를 용이하게 한다. 또한 발효를 통해 생성된 2차 대사산물과 유효성분의 증가로 인해 식품의 기능성이 향상된다. 따라서 본 연구에서는 상황버섯 균사체(*Phellinus linteus*)를 이용한 우영 발효산물의 항산화 활성, 세포독성 및 항비만 활성을 분석하여 기능성 식품 신소재로서의 가능성을 확인해 보고자 하였다. 또한 1차 발효와 동일한 공정으로 2차 발효를 반복하여 발효횟수에 따른 활성의 변화를 비교해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

실험 시료로 2014년 안동 부용농산 영농조합법인에서 재배·수확한 건조 우영뿌리(*Arctium lappa* L.) 슬라이스를 구입하였다. 우영 슬라이스는 증류수로 세척하여 이물질을 제거한 후 70°C 열풍건조기(ECOF-150A, EMS, Korea)로 5시간 동안 건조하여 수분율이 7% 이하가 되도록 하였다. 건조한 우영은 121°C에서 15분간 고온멸균(WASCS-1060, Daihan, Korea)한 다음 실험 재료로 사용하였다.

2. 발효균주 및 발효 우영 제조

우영 발효에 사용한 균주인 상황버섯 균사체(*Phellinus linteus* KCTC 6190)는 3회 계대배양을 반복하면서 균주의 변이를 확인한 후 사용하였다. 발효균주는 PDA(potato dextrose broth, Becton Dickinson) 배지에 접종하여 28°C의 배양기(BSD68-1-17, Busung system, Korea)에서 5일 동안 배양한 후 cork borer로 절취하였다. 균사체는 증류수 1 L, glucose 20 g, sugar 10 g을 포함하는 균사체 배양배지에 5~10%(v/v)로 접종하여 25~30°C의 배양기에서 7일간 배양하였다. 이후 균주를 분쇄기로 균질화하여 액체배양기에 1 L 접종하고, 28°C에서 5일간 배양하여 종균으로 사용하였다.

멸균된 우영에 발효균주 배양액을 수분율 30%가 되도록

혼합하고, 30°C, 습도 90%에서 7일간 1차 발효하였다. 1차 발효가 끝난 우영은 65°C에서 6시간 열풍건조하여 수분율이 7% 이하가 되도록 하였다. 이 후 1차 발효물은 121°C에서 15분 동안 멸균한 다음, 동결건조(PVTFD20R, Ilshin, Korea)하여 냉동보관하였다. 2차 발효 우영은 1차 발효와 동일한 공정을 반복하여 제조하였다. 발효가 끝난 2차 우영 발효산물은 121°C에서 15분 동안 멸균하여 미생물과 효소를 불활성화하고, 동결건조하여 -20°C에서 냉동보관하였다.

3. 추출

동결건조한 비발효 및 발효 우영을 blender로 마쇄한 후, 시료 80 g에 70% 에탄올 800 mL를 가하여 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출 후 5,000 rpm, 5분 동안 원심분리하여 상층액을 수집하였다. 상층액은 여과지(Whatman No. 4)로 여과하여 회전감압농축기(EYELA, Rikakikai, Co., Japan)로 농축하였다. 이후 시료는 동결건조하여 -20°C에서 냉동보관하며 실험에 사용하였다. 시료의 에탄올 추출물의 최종 수율은 비발효 우영, 1차 발효 우영 및 2차 발효 우영이 각각 34.6%, 39.6% 43.5%이었다.

4. DPPH radical 소거능 측정

비발효 우영과 발효 우영 에탄올 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해 Blois MS(1958)의 방법에 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. 추출물을 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)에 용해하여 7.5×10^{-5} M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich Co., LLC, USA) 2 mL를 혼합하였다. 혼합액은 37°C에서 30분간 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer(HS 3300, Humas Co., Korea)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 합성항산화제인 BHA를 사용하였으며, 시료의 전자공여능(%)은 $[1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료무첨가구의 흡광도})] \times 100$ 의 계산식에 의해 구하였다.

5. ABTS radical 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등(1999)의 방법에 따라 측정하였다. ABTS⁺를 형성시키기 위해 7 mM 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS, Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)와 2.45 mM K₂S₂O₈을 1:1로 혼합하여 암소에서 14시간 반응시켰다. 반응액은 413 nm에서 흡광도가 0.7~1.0이 되도록 0.005 M PBS buffer(pH 7.4)로 희석하였다. 이후 ABTS 용액 4 mL를 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)로 농도별로 희석한 시료 40 μ L에 혼합하여 1분간 반응시키고, 413 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 ABTS 라디칼 소거능(%)은 $[1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료무첨가구의 흡광도})] \times 100$ 으로 계산하였다.

6. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

Folin-Ciocalteu 법에 의해 비발효 및 발효 우유의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다(Pellegrini 등 1999). 시료 1 mL에 증류수 5 mL, Folin-Ciocalteu reagent(Sigma-Aldrich Co., LLC, USA) 0.5 mL를 혼합하여 8분간 반응시킨 후 10 mL의 7% Na₂CO₃를 첨가하고, 증류수로 최종 부피를 25 mL로 맞추었다. 혼합액은 상온에서 2시간 방치한 후 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질 gallic acid(Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)를 사용하여 표준 검량선을 구하고, 시료추출물의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

플라보노이드 함량은 Moreno 등(2000)의 방법에 의해 구하였다. 100 µL의 10% aluminum nitrite와 100 µL의 1 M potassium acetate 및 4.3 mL의 80% 에탄올을 혼합한 용액에 시료 0.5 mL를 첨가하여 실온에서 40분간 반응시켰다. 이후 510 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 quercetin(Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)를 사용하였으며, 표준 검량선을 구하여 추출물의 플라보노이드 함량을 구하였다.

7. 세포독성 측정

발효 우유의 항비만 활성을 평가하기 위해 먼저 3T3-L1 지방세포에 대한 추출물의 세포독성을 XTT[2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxy-anilide] assay kit를 사용하여 측정하였다. 1×10⁵ cell 농도로 3T3-L1 지방세포를 96 well plate에 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 1 mL XTT reagent와 20 µL PMS reagent를 혼합하여 working solution을 만들고, 각 well에 배지 부피의 20%에 해당하는 양을 혼합하였다. 반응액을 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 배양하여 UV/Vis spectrophotometer(Milton Roy, Inc., Rochester, NY, USA)로 450 nm 흡광도를 측정할 값에서 690 nm의 흡광도 측정값을 제하여 세포독성 값을 산출하였다.

8. 지방세포 분화 및 지방 축적량 측정

한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받은 3T3-L1 세포는 DMEM 배지에 10% BCS와 1% penicillin-streptomycin(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 배양하였다. 3T3-L1 세포 배양 배지에 분화유도물질인 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin, 1 µM dexamethasone, 5 µg/mL insulin과 에탄올 추출물을 처리하여 지방세포로의 분화를 유도하였다. 이후 2일마다 지속적으로 10% FBS, 5 µg/mL insulin 및 여러 농도의 시료에탄올 추출물이 포함된 DMEM 배지로 배양하면서 지방세포 분화 중에 지방축적량의 변화를 살펴 보았다.

지방세포의 지방축적량은 Blumberg 등(2006)의 방법에 따라 측정하였다. 3T3-L1 세포를 12 well plate에 분화한 후 배지

를 제거하고, PBS로 세척하였다. 세포에 10% formaldehyde를 처리하고, 5분 간 상온에서 방치한 후 PBS로 세척하였다. 세척된 세포에 10% formaldehyde를 넣고 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 10% formaldehyde를 제거하고, PBS로 2번 세척하여 세포를 건조시켰다. 건조된 세포에 지방질에 특이적으로 반응하는 Oil red O working solution 500 µL를 첨가하고, 30분 간 실온에서 배양하여 세포 내 축적된 지방성분을 염색시켰다. 세포 내 염색된 Oil red O working solution은 100% isopropanol을 첨가하여 제거하고, 증류수로 3회 세척하여 UV/Vis spectrophotometer(Milton Roy, Inc., Rochester, NY, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. 통계처리

실험결과는 Statistical Package for the Social Science Program (SPSS, version 21)으로 산출하였다. 실험 결과값은 3회 반복 측정하여 평균±표준편차로 나타내었다. 시료별 결과값의 유의성 검정은 일원분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 다음, Duncan's multiple range test로 사후검정하였다.

결과 및 고찰

1. 발효에 따른 DPPH 라디칼 소거능 변화

비발효 및 발효 우유 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과는 Fig. 1에 제시하였다. 비발효와 1차 및 2차 발효 우유 모두 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능이 증가하였다. 모든 측정농도에서 비발효와 발효 우유 추출물의 전자공여능은 합성비타민인 BHA에 비해 낮았다. 비발효 우유(6.6%)와 1차 발효 우유 추출물(10.1%)은 62.5 ppm의 농도에서는 전자공여능의 차이가 없었으나, 2차 발효 우유 추출물의 전자공여능은 17.6%로 유의적으로 항산화 활성이 증가하였다. 추출물의 농도 125 ppm에서는 비발효 우유(17.8%), 1차 발효 우유(27.4%), 2차 발효 우유 추출물(36.3%)의 순으로 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가하였다. 그러나 250 ppm의 농도에서는 발효와 발효 횟수에 따른 소거 활성에 유의한 차이가 없어, 측정 농도별로 다른 양상을 나타내었다.

본 연구결과는 한국산 생우유 에탄올 추출물의 항산화 활성을 측정된 Lee MS(2011)의 연구에서 추출물의 농도가 증가할수록 소거 활성이 증가한 것과 유사하다. 그러나 이는 발효하지 않은 우유에 대한 결과로 본 연구에서의 비발효 우유에서와는 유사한 경향이거나, 측정된 시료 농도가 달라 정량적인 비교는 어려운 점이 있다. 국내 자생식물 135종의 추출물을 대상으로 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정된 Kim 등(2014)의 연구 결과, 추출물들의 소거능이 0.41~94.84%로 다양하게 나타났다. 그중에서 가장 효과가 좋은 꽃향유가 94.84%이었

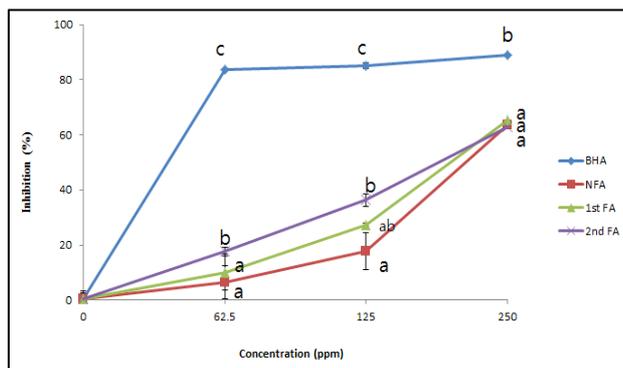


Fig. 1. The electron donating ability of ethanol extract from non-fermented and fermented *Arctium lappa* L. using the DPPH assay. NFA: Non-fermented *Arctium lappa* L., 1st FA: Fermented *Arctium lappa* L., 2nd FA: Fermented *Arctium lappa* L. twice, Values represent the mean±S.D. (n=3), Mean with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

고, 우엉 추출물은 80.55%로 두 번째로 높은 DPPH 소거능을 나타내었다. 천마 에탄올 추출물의 발효 횟수에 따른 항산화 활성을 확인한 연구(Kim 등 2014)에서 추출물의 농도 500, 1,000 ppm의 범위에서는 비발효 천마와 1차 발효 천마 사이에는 활성에 유의한 차이가 없었으나, 3차로 반복 발효함에 따라 라디칼 소거능이 증가하였다. 현재 기존에 발표된 연구 중에서 우엉을 발효시킨 후 DPPH 라디칼 소거능의 변화에 대해 보고한 연구는 없다. 이와 같은 결과로 볼 때 우엉은 식용 식물 중에서 항산화 활성이 비교적 우수하며, 이러한 항산화 효과는 발효에 의해 더 증대되는 것으로 보인다. 발효에 따라 우엉의 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가하는 가능한 기전으로 발효균주인 상황버섯 균사체 성장 시 분비되는 여러 가지 효소에 의해 항산화성이 낮은 화합물이 활성이 높은 물질로 전환되는 것과, 항산화 활성과 관련된 화합물이 버섯균 사체로부터 유출되고 발효 과정 중에 생성된 유기산, 비타민 C 및 펩타이드 등의 물질들이 라디칼 소거 활성을 증대시키는 것 등이 있다(Yoon JM 2014).

2. 발효에 따른 ABTS 라디칼 소거능 변화

우엉 에탄올 추출물의 발효에 따른 ABTS 라디칼 소거능을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 추출물의 농도 31.25 ppm에서는 비발효 우엉(13.8%)에 비해 1차 발효 우엉(24.3%) 및 2차 발효 우엉(24.3%)의 ABTS 라디칼 소거능이 유의적으로 높게 나타났다. 추출물의 농도 62.5와 125 ppm에서는 비발효 우엉(25.9%, 53.4%), 1차 발효 우엉(41.9%, 71.7%), 2차 발효 우엉(46.5%, 77.0%) 순으로 ABTS 소거 활성이 유의하게 증가하였다. 또한 1차 발효 우엉과 2차 발효 우엉의 라디칼 소

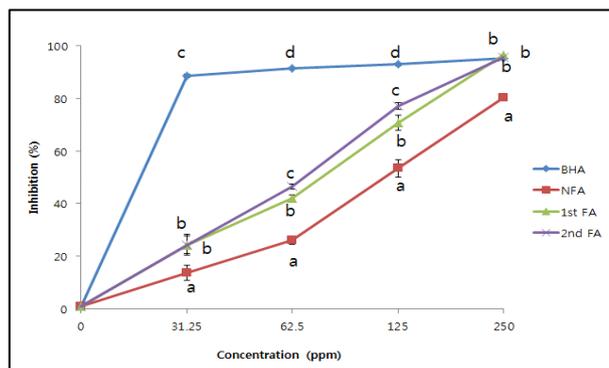


Fig. 2. The electron donating ability of ethanol extract from non-fermented and fermented *Arctium lappa* L. using the ABTS assay. NFA: Non-fermented *Arctium lappa* L., 1st FA: Fermented *Arctium lappa* L., 2nd FA: Fermented *Arctium lappa* L. twice, Values represent the mean±S.D. (n=3), Mean with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

거 활성이 250 ppm에서는 각각 96.6%, 95.7%로 합성항산화제인 BHA의 라디칼 소거능(95.1%)과 유사하였다.

우엉 뿌리를 에탄올로 추출한 후 n-hexane, ethylacetate 및 butanol 분획물을 얻어 항산화 활성을 측정한 Kim 등(2014) 연구에서는 우엉 에탄올 추출물, hexane 분획물, 물 잔류물에서는 미약한 소거능을 보였으나, ethylacetate 분획물에서는 50 µg/mL 농도에서 비타민 C의 34%에 해당하는 환원력을 나타내어 우수한 ABTS 소거능을 가진다고 보고하였다. 이와 같이 시료의 추출용매와 분획 및 시료 농도 등에 따라 항산화 활성에 차이가 나므로, 향후 연구에서는 우엉의 추출조건과 활성 물질의 정제 등에 따른 다양한 기능성 평가가 이루어져야 할 것이다. 본 연구에서 발효 우엉 추출물의 ABTS 라디칼 소거능이 DPPH 라디칼 소거 활성에 비해 더 높은 것으로 나타났다. 이에 대한 이유로 Wang 등(1998)은 라디칼의 종류 및 라디칼과의 결합물질에 따른 차이로 설명하고 있다. 즉, DPPH는 자유 라디칼이, ABTS는 양이온 라디칼이 시료추출물의 항산화 성분에 의해 소거되는 정도를 평가하게 되는데, 두 종류의 라디칼에 결합하는 페놀성 물질이 다르기 때문에 소거능에 차이가 나는 것으로 보았다. 또한 본 연구에서 발효 횟수가 증가함에 따라 라디칼 소거능이 증대되어 다중발효에 의한 항산화 활성 증대 효과를 확인할 수 있었다. 특히, 250 ppm의 측정농도에서는 1차 발효 우엉 및 2차 발효 우엉의 소거 활성이 합성항산화제인 BHA와 유사하여 천연항산화제로서의 활용 가능성을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

3. 발효에 따른 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량

발효 우엉 에탄올 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드

함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 비발효 우영, 1차 발효 우영 및 2차 발효 우영의 총 폴리페놀 함량은 각각 118.0 mg/g, 144.0 mg/g, 183.1 mg/g이었다. 비발효 우영과 1차 발효 우영에 비해 2차 발효 우영의 총 폴리페놀 함량이 증가하였다. Lim & Lee(2014) 연구에서는 우영 뿌리 메탄올 추출물의 폴리페놀 함량이 14.9 mg/g, ethylacetate 분획물이 818.29 mg/g, n-butanol 분획물이 203.18 mg/g으로 나타나, 본 연구의 비발효 우영 에탄올 추출물은 n-butanol 분획물과 유사한 수준의 폴리페놀을 함유하고 있는 것을 알 수 있다. 또한 본 연구결과는 Kim 등(2014)의 연구에서 비발효천마 에탄올 추출물(95.8 mg/g)과 1차 발효천마 에탄올 추출물(143.5 mg/g)의 총 폴리페놀 함량과 유사하였으며, 발효 가시오가피 에탄올 추출물(29.5 mg/g), 토사자 에탄올 추출물(20.1 mg/g)에 비해 높았다(Jeon 등 2008; Kim 등 2014).

우영 추출물의 플라보노이드 함량은 비발효 우영이 65.0 mg/g이었다. 1차 및 2차 발효 후에는 플라보노이드 함량이 각각 395.1 mg/g, 401.1 mg/g으로 발효 전에 비해 유의적으로 증가하였으나, 발효횟수에 따른 유의한 차이는 없었다. Park 등(2012)의 연구에서는 발효 후에 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 증가하는 가능한 기전으로 천연물에 함유되어 있는 주된 항산화 물질인 phenolic compound와 flavonoid 화합물이 유산균 발효 과정 중에 protease, amylase 및 lipase 등의 효소에 의해 가용성 페놀성 물질로 전환되어 함량이 증가하는 것으로 보았다. 또한 Yoon JM(2014)은 발효주 균사체에 의한 발효가 진행됨에 따라 결합된 고분자 페놀화합물이 저분자로 분해 또는 파괴되어 새로운 페놀화합물들이 생성되어 총 폴리페놀 함량이 증가하는 것으로 설명하였다. 이와 같이 본 연구에서도 상황버섯 균사체 발효에 의해 발효 우영의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 증가하였으며, 여기에 기인하

Table 1. Contents of total polyphenols and flavonoids of ethanol extracts from non-fermented and fermented *Arctium lappa* L.

Sample ¹⁾	Total polyphenols ²⁾ (mg GAE/g)	Flavonoids ³⁾ (mg QCE/g)
NFA	118.0±0.1 ^{4)a5)}	65.0±0.4 ^a
1 st FA	144.0±0.3 ^a	395.1±0.2 ^b
2 nd FA	183.1±0.1 ^b	401.1±0.3 ^b

NFA: Non-fermented *Arctium lappa* L., 1st FA: Fermented *Arctium lappa* L., 2nd FA: Fermented *Arctium lappa* L. twice, ²⁾ mg of total polyphenol content/g of non-fermented and fermented *Arctium lappa* L. based on hesperitin as standard, ³⁾ mg/of flavonoids content/g of non-fermented and fermented *Arctium lappa* L. based on quercetin as standard, ⁴⁾ Date are expressed as Mean±S.D. (n=3), ⁵⁾ Mean with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

여 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성이 증대된 것으로 사료된다. 또한, 각 발효 단계 중 균사체에 의해 분비되는 여러 가지 효소의 작용으로 페놀성 물질의 함량이 증대되어 1차 발효보다 2차로 반복발효 시 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 증가하는 것으로 유추되므로, 추후 상황버섯 균주의 생장량에 따른 항산화 물질의 함량에 대한 분석연구가 필요할 것으로 보인다.

4. 세포독성 및 발효에 따른 지방세포 분화 억제 활성

발효 우영 에탄올 추출물의 3T3-L1 지방세포에 대한 세포독성을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 추출물의 농도 범위 1, 10, 100, 300, 500 및 1,000 µg/mL에서 세포독성을 측정하였으며, 추출물 대신 DMSO를 사용한 대조구의 cell viability에 대한 백분율로 결과를 나타내었다. 비발효 우영 및 발효 우영 추출물의 농도 300 µg/mL까지는 3T3-L1 지방세포의 cell viability가 83% 이상으로 지방세포의 생장에 영향을 미치지 않았다. 따라서 1, 10, 100, 300 µg/mL의 시료추출물을 세포에 처리하여 지방세포 분화 억제능을 측정하였다.

발효 우영 에탄올 추출물의 지방세포 분화 억제 활성에 대한 결과는 Fig. 4에 제시하였다. 세포 내의 중성지방과 콜레스테롤 에스터만 염색하여 adipogenesis 과정 중 지방 축적을 평가하는 가장 일반적인 방법인 Oil red O 염색 방법을 이용하여 3T3-L1 지방세포에 우영 추출물을 첨가하고, 분화 7~10 일째에 축적된 지방 함량을 측정된 결과, 모든 시료에서 농도의 의존적으로 지방 축적량이 감소하였다. 또한 추출물의 농도 10, 100 및 300 µg/mL에서 비발효 우영(97.3%, 91.1%, 83.4%)>1차 발효 우영(94.8%, 81.8%, 74.4%)>2차 발효 우영 추출물

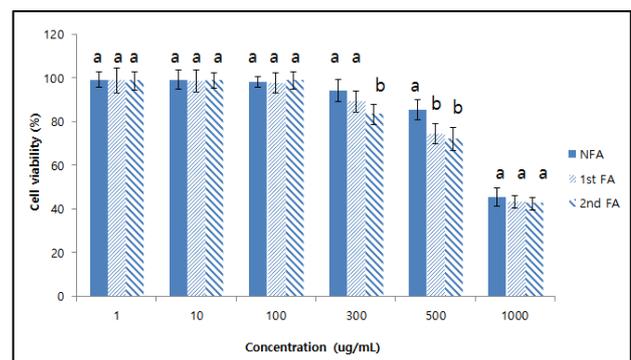


Fig. 3. Cell viability of ethanol extracts from non-fermented and fermented *Arctium lappa* L. on 3T3-L1 by XTT assay. NFA: Non-fermented *Arctium lappa* L., 1st FA: Fermented *Arctium lappa* L., 2nd FA: Fermented *Arctium lappa* L. twice, Values represent the mean±S.D. (n=3), Mean with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

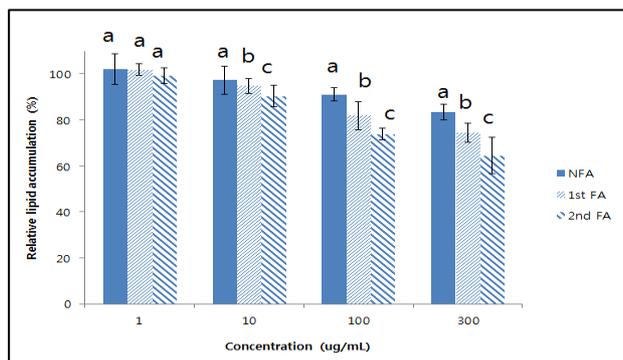


Fig. 4. Effect of ethanol extract obtained from *Arctium lappa* L. on adipose conversion during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. NFA: Non-fermented *Arctium lappa* L., 1st FA: Fermented *Arctium lappa* L., 2nd FA: Fermented *Arctium lappa* L. twice, Values represent the mean±S.D. (n=3), Mean with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

(90.4%, 73.8%, 64.5%)의 순으로 지방 축적량이 유의적으로 감소하여, 발효가 진행됨에 따라 유의적으로 비만 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 따라서 3T3-L1 지방세포의 중성지방 생성 억제 효과는 2차 발효 우엉 추출물이 가장 높았으며, 측정된 농도 이내에서는 지방세포에 대한 독성도 없으므로 발효 우엉은 항비만 활성을 갖는 소재로 활용 가능성이 있는 것으로 사료된다. 본 연구에서 발효 우엉 추출물의 지방 생성 억제는 기와층버섯 메탄올 추출물 및 차가버섯 ethylacetate 분획물과 유사하였으며(Kang 등 2007), 천년초 에탄올 추출물(Kim 등 2011)보다는 낮았다. 본 연구결과, 발효에 의해 adipogenesis 과정 중 우엉의 지방 축적 억제 활성이 증가되었으며, 이러한 효과는 다중발효를 통해 더 증대되는 것으로 보인다. 향후 우엉의 추출조건과 항비만 활성에 대한 작용기전 등이 규명된다면 기능성식품 및 의약품의 천연물 신소재로서 활용 가치가 높을 것으로 생각된다.

요약 및 결론

본 연구는 식용미생물인 상황버섯 균사체로 발효시킨 우엉의 항산화 활성 및 항비만 활성의 변화를 분석하였다. 비발효 우엉 및 발효 우엉 추출물은 DPPH 라디칼 소거에 의한 항산화 활성을 가지며, 일부 농도에서 발효 횟수가 증가함에 따라 증대되는 것으로 나타났다. ABTS 라디칼 소거능은 추출물의 농도 62.5와 125 ppm에서 비발효<1차 발효<2차 발효 우엉 순으로 증가하였다. 특히 1차 발효 및 2차 발효 우엉의 소거 활성은 250 ppm의 농도에서 합성항산화제인 BHA와 유사하였다. 총 폴리페놀 함량은 발효에 의해 증가하여 비발효

<1차 발효<2차 발효 우엉 에탄올 추출물 순으로 나타났다. 비발효 우엉에 비해 1차 발효 우엉과 2차 발효 우엉의 플라보노이드 함량이 유의적으로 높았으나, 발효횟수에 따른 유의한 차이는 없었다. 총 폴리페놀과 플라보노이드는 라디칼 소거 작용에 의해 항산화 활성을 나타내므로, 본 연구의 DPPH 라디칼과 ABTS 라디칼 소거 활성의 증가는 발효에 의해 증대된 폴리페놀과 플라보노이드에 기인하는 것으로 보인다. 3T3-L1 지방세포의 분화 중 지방 축적량은 추출물의 농도 10, 100 및 300 $\mu\text{g/mL}$ 에서 비발효 우엉>1차 발효 우엉>2차 발효 우엉 추출물의 순으로 유의적으로 감소하여, 발효에 따라 항비만 활성이 증가되었다. 따라서 우엉의 항산화 및 항비만 활성이 발효에 의해 증가됨을 알 수 있으며, 이러한 효과는 2차 발효에 의해 더 증대되어 기능성식품 및 의약품 신소재 개발 시 다중발효의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 산학협력선도대학(LINC) 육성사업의 연구결과입니다.

References

- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Blumberg JM, Tzamei I, Astapova I, Lam FS, Flier JS, Hollenberg A. 2006. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cell. *J Biol Chem* 28: 11205-11213
- Chen FA, Wu AB, Chen CY. 2004. The influence of different treatment on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. *Food Chem* 86:479-484
- Duh PD. 1998. Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): Its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *J Am Oil Chem Soc* 75:455-461
- Ferracane R, Graziani G, Gallo M, Fogliano V, Ritieni A. 2010. Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. *J Pharm and Biomed Anal* 51:399-404
- Fuchigami M, Kishigami Y, Sasaki A. 1990. Pectic polysaccharides in edible burdock root. *J Home Economics Japan* 41:947-962

- Han SJ, Koo SJ. 1993. Study on the chemical composition in bamboo shoot, lotus root and burdock. *Korean J Soc Food Sci* 9:82-87
- Im DY, Lee KI. 2014. Antioxidative activity and tyrosinase inhibitory activity of the extract and fractions from *Arctium lappa* roots and analysis of phenolic compounds. *Kor J Pharmacogn* 45:141-146
- Jeon YH, Kim MH, Kim MR. 2008. Antioxidative and anti-mutagenic activity of ethanol extracts from *Cuscutae semen*. *Korean J Food Cookery Sci* 24:46-51
- Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. 2011. Arctigenin induces cell cycle arrest by blocking the phosphorylation of Rb via the modulation of cell cycle regulatory proteins in human gastric cancer cells. *In Immunopharmacol* 11:1573-1577
- Kang EH, Lee IK, Hwang MH, Choi JY, Chang ZQ, Rhee MH, Yun BS, Jiang CZ, Kim KS, Park SC. 2007. Anti-obesity activity, anti-cancer activity and single oral dose toxicity of *Inonotus xeranticus* extracts. *J Toxicol Pub Health* 23:253-261
- Kim DB, Shin GH, Lee JS, Lee OH, Park IJ, Cho JH. 2014. Antioxidant and nitrite scavenging activities of *Acanthopanax senticosus* extract fermented with different mushroom mycelia. *Korean J Food Sci Technol* 46:205-212
- Kim DJ, Jung JH, Kim SG, Lee HK, Lee SK, Hong HD, Lee BY, Lee OH. 2011. Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from *Cheomyuncho* (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Preserv* 18:366-373
- Kim HS, Ahn JJ, Choi TH, Hwang TY. 2014. Screening of DPPH radical scavenging and antimicrobial activity of extracts from local some native plants. *Korean J Food Preserv* 21:593-599
- Kim MH, Kim JG, Choi JH. 2014. Antioxidant activity and changes in major functional components of fermented *Gastrodia elata* Blume. *Korean J Food & Nutr* 27:684-691
- Kim MS, Lee YS, Sohn HY. 2014. Anti-thrombosis and anti-oxidative activity of the root of *Arctium lappa* L. *Korean Soc Food Preserv* 21:727-734
- Kim YJ, Kang SC, Namkoong S, Choung MG, Sohn EH. 2012. Anti-inflammatory effects by *Arctium lappa* L. root extracts through the regulation of ICAM-1 and nitric oxide. *Korean J Plant Res* 25:1-6
- Lee MS. 2011. Antioxidative and antimutagenic effects of *Arctium lappa* ethanol extract. *Korean J Food & Nutr* 24:713-719
- Lim DY, Lee KI. 2014. Antioxidative activity and tyrosinase inhibitory activity of the extract and fraction from *Arctium lappa* roots and analysis of phenolic compounds. *Kor J Pharmacogn* 45:141-146
- Lin SC, Lin CH, Lin CC, Lin YH, Chen CF, Chen IC, Wang LY. 2002. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride. *J Biomed Sci* 9: 401-409
- Matsuzaki Y, Koyama M, Hitomi T, Yokota T, Kwawanaka M, Nishikawa A, Germain D, Sakai T. 2008. Arctiin induces cell growth inhibition through the down-regulation of cyclin D1 expression. *Oncol Rep* 19:721-727
- Moreno MI, Isia MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentinian. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114
- Park MR, Yoo C, Chang YN, Ahn BY. 2012. Change of total polyphenol content of fermented *Gastrodia elata* Blume and radical scavenging. *Korean J Plant Res* 25:379-386
- Pellegrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Meth Enzymol* 299:379-389
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231-1237
- Wang MF, Shao Y, Li JG, Rngarajan M, Lavoie EJ, Huang TC, Ho CT. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J Agr Food Chem* 46:4869-4873
- Wu JG, Wu JZ, Sun LN, Han T, Du J, Ye Q, Zhang H, Zhang YG. 2009. Ameliorative effects of arctiin from *Arctium lappa* on experimental glomerulonephritis in rats. *Phytomedicine* 16:1033-1041
- Yoon JM. 2014. Development of process technology for the nutrient fortification and health promoting of *Biji*. Master Thesis, Andong National Univ. Andong. Korea

Received 30 June, 2015

Revised 7 September, 2015

Accepted 10 September, 2015