

Effect of Fermented Ice Plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) Extracts against Antioxidant, Antidiabetic and Liver Protection

Sanghae Nam^{1*}, Seungmi Kang², Seonjeong Kim³ and Keunhee Ko³

¹Division of Food Science, Gyeongnam National University of Science & Technology, Jinju 52725, Korea

²Yakmok Food co., Andong, Gyeongsangbukdo 36618, Korea

³Gyeongnam Oriental Medicinal Herb Institute, Sancheong-gun, Gyeongsangnamdo 52215, Korea

Received July 12, 2017 / Revised July 25, 2017 / Accepted August 2, 2017

Ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) was fermented in brine in the form of mulkimchi (IPMB), and its contents of organic acid and cyclitols and biological activities were compared with those before fermentation. The pH of the IPMB continuously decreased until the sixth day of fermentation. The lactic acid yield was greatest on the fourth day. D-pinitol in ice plant mulkimchi solids (IPMS) decreased during fermentation. However, *myo*-inositol and *D-chiro*-inositol increased. The radical scavenging activities of ABTS and DPPH, in addition to the activity of FRAP, of the IPMS extract were generally higher after fermentation, with the activities highest on the fifth (79.09±0.69%), fourth (87.55±1.21%), and sixth (78.72±0.99%) days of fermentation, respectively, when treated with 1 mg/ml of the extract. As shown by a lipid/MA assay, antioxidant activity was generally higher after fermentation. The viability of BNL CL.2 cells damaged by *t*-BHP, H₂O₂, and ethanol was 14.19±0.98, 13.80±2.25, and 25.89±2.90%, respectively. When treated with 200 µg/ml of IPMS extract, the cell viability was 57.06±4.52% on the first day, and 66.06±1.36% on the fourth day, and 50.07±0.85% on the sixth day of fermentation. Hepatocyte protective effects did not increase significantly after fermentation. α-glucosidase inhibitory activity was quite high, with a range of 83.52±2.69 to 92.79±2.16%, and the activity increased gradually in all the groups over the fermentation period. There was no clear correlation between α-amylase inhibitory activity and fermentation.

Key words : Antidiabetic, antioxidant, cyclitol compounds, liver protection, *Mesembryanthemum crystallinum* L.

서 론

아이스플랜트(*Mesembryanthemum crystallinum* L.)는 번행초과(Aizoaceae)의 1년생 초목이다. 초장이 10~50 cm 정도로 자라는 포복성 식물로서 간과 신장의 질병치료에 이용되고 항산화 능력을 가지고 있으며, 성인병 예방에 탁월한 기능성 식물로 알려져 있다[1]. 발아율이 낮고 성장속도가 느린 다육 식물로 남아프리카 나미브 사막이 원산지이며, 아프리카와 오스트레일리아 남서부, 아메리카의 서쪽 건조지역에 주로 분포하고 있으며, 줄기와 잎에 블러더 세포(bladder cell)이라고 하는 얼음결정과 같은 모양이 있어 아이스플랜트(ice plant)라고 알려져 있다. 블러더 세포에는 cyclitol류의 화합물과 β-carotene과 각종 미네랄을 함유하고 있으며, 특히 혈당치를 낮추는 pinitol과 중성지방을 억제하는 *myo*-inositol을 함유하고 있

으므로 당뇨병 환자에 적합한 힐링푸드라고 알려져 있다[19]. 국내에서의 아이스플랜트에 대한 연구는 대부분이 재배기술에 대한 연구가 대부분이며, Kang 등[11]의 일반성분 및 이노시톨류 화합물의 분석과 항산화 및 항당뇨 효과를 보고한 것을 제외하고는 거의 없다. 특히 발효 아이스플랜트에 관한 연구는 찾아볼 수가 없었다. 아이스플랜트는 우리나라에 들어온 지는 10여년에 불과하지만 성장이 느리고 재배가 까다로워서 많이 생산되지 못하였다. 그러나 최근 성공적인 재배기술이 개발되어 이를 재배하는 곳이 점차 늘어나고 있는 추세이며, 재배를 희망하는 농가가 많아서 머지않아 생산량도 급격히 증가할 것으로 전망되고 있다. 본 연구는 전보에 이어서 생리활성을 향상시키고, 식생활에서도 활용가능성을 높이기 위하여 물김치 형태로 발효시켰으며 발효후의 아이스플랜트의 성분 및 몇 가지 생리활성을 발효전과 비교하였다.

재료 및 방법

아이스플랜트 물김치(mulkimchi)의 제조

신선한 아이스플랜트를 송이애농장(Sacheon, Korea)으로부터 구입하였으며, 각각 500 g에 대하여 10% 소금물 500 ml을 가하여 10시간 침지하였다. 이후 시료를 건져내어 표면에 묻은 소금기를 증류수로 가볍게 행구었으며, 각각의 처리구에

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3274, Fax : +82-54-751-3279

E-mail : shnam@gntech.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

끓여서 식힌 10%의 sucrose 용액을 가하여 15±1℃에서 발효 함으로서 물김치를 제조하였다. 발효 시작일부터 6일까지 매일 같은 시각에 침지액의 수소이온농도(pH)를 측정하였으며, 그 즉시 시료를 채취하였다. 즉 물김치 침지액(mulkimchi brine; liquid produced from fermentation)은 따로 채취하였고, 물김치 건더기(mulkimchi solids; solid ingredients produced from fermentation)는 발효 중인 아이스플랜트를 증류수로 가볍게 행군 후 식품건조기(LD-918TH, L'EQUIP, Seoul, Korea)로 건조하여 시료로 사용하였다. 시료는 소금물에 침지하지 않은 아이스플랜트를 그대로 건조한 것을 IP, 그리고 발효 일수에 따라 각각 IPF-0, 1, 2, 3, 4, 5, 6이라고 하였으며, 이들의 methanol 추출물을 생리활성효과의 시험에 사용하였다.

Organic acid 분석

유기산 분석을 위한 시료는 발효기간별로 각각의 물김치 침지액을 0.2 µm membrane filter (SmartPor-II Syringe filter, Woongki science, Seoul, Korea)로서 여과하여 사용하였다. 유기산 함량은 HPLC (Agilent 1260 series, Agilent Co., Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다. Analytical column은 Supelcogel C-610H column (7.8×300 mm, Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 사용하였으며, column 온도는 30℃, mobile phase는 0.1% phosphoric acid이었고, flow rate 0.5 ml/min, injection volume 10 µl이었다. 분리된 유기산은 UV 210 nm에서 검출하였다. 한편 유기산 표준물질은 농도별로 분석하였으며, 농도에 따른 peak의 면적으로 표준곡선을 작성하여 각각의 유기산을 정량하는데 적용하였다.

Cyclitols 분석

Cyclitol 화합물을 추출하기 위하여 아이스플랜트 물김치 건더기 건조분말 1 g에 40 ml의 물과 ethanol의 등량혼합액을 가하고 100℃의 water bath에서 1시간 추출하였다. 이후 4,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 cyclitol 화합물이 용출된 상등액을 취하고, 이를 vacuum concentrator (MAXI dry lyo, Heto-Holten, Gydevang, Denmark)로 추출용액을 완전히 제거하였다. 이어서 시료에 trimethyl silylimidazole (TMSI) : pyridine mixture (1:1, v/v) 200 µl를 가하고 heating block (70℃, 30 min)에서 유도체화 반응을 한 후, gas chromatograph로서 분석하였다[2]. 즉 HP-5 capillary column (0.32 mm i.d.×30 m, 0.25 µm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)과 불꽃이온화검출기(FID)가 장착된 gas chromatograph (Model 6890, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였고, injector 및 detector의 온도는 각각 280과 300℃로 설정하였으며, column oven의 온도는 150℃에서 7.5 °C/min으로 하여 300℃까지 상승시켰다. Carrier gas는 He, flow rate는 1 ml/min, split ratio는 1:50, 시료의 주입량은 1 µl로 하였다.

DPPH free radical 소거활성

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 자유 라디칼 소거활성은 Heo 등[9]의 방법을 변형하여 실험하였다. 아이스플랜트 물김치 건더기 건조분말 추출물(이하 추출물)을 농도별(0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml)로 희석한 다음, 아이스플랜트 추출물 0.2 ml와 사용 직전 만든 0.2 mM DPPH 용액 0.1 ml를 96-well plate에 넣고 혼합한 후, 실온에서 30분간 반응시켰다. 흡광도는 microplate reader (EL800, BioTek, Winooski, PA, USA)를 사용하여 520 nm에서 측정하였다. 양성대조군으로는 BHA를 사용하였다. 전자공여능은 아래의 식으로 계산하였으며, 각 실험은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

$$\text{DPPH free radical 소거활성(\%)} = [1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{음성대조구의 흡광도})] \times 100$$

ABTS cation radical 소거활성

ABTS [2,2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid diammonium salt)] cation radical 소거활성은 Re 등의 방법 [27]을 변형하여 측정하였다. ABTS (7 mM)와 potassium persulfate (2.45 mM)를 1:1로 혼합한 다음 어두운 실온에서 24시간 넣어두어 ABTS radical (ABTS^{•+})을 만들었다. 이를 732 nm에서 측정하여 대조구의 흡광도 값이 0.7±0.02가 되도록 PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4) buffer를 가하여 ABTS 용액으로 사용하였다.

ABTS 용액 0.2 ml와 농도별(0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml)로 희석한 아이스플랜트 추출물 0.1 ml를 96-well plate에 넣고 1분간 정치시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 BHA를 사용하였으며, 아이스플랜트 추출물에 대한 ABTS radical 소거활성은 아래의 식으로 계산하였으며, 각 실험은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

$$\text{ABTS cation radical 소거활성(\%)} = [1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{음성대조구의 흡광도})] \times 100$$

FRAP (ferric reducing antioxidant power)

아이스플랜트 추출물의 환원력은 Benzie와 Strain의 방법 [3]에 따라 측정하였다. FRAP 용액은 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 40 mM HCl에 녹인 10 mM TPTZ [2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine] 및 20 mM iron (III) chloride를 각각 37℃로 가온한 후 실험직전에 혼합(10:1:1, v/v)하여 사용하였다. FRAP 용액 0.2 ml와 농도별(0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml)로 희석된 아이스플랜트 추출물 50 µl를 96-well plate에 혼합한 다음 37℃에서 15분간 반응시키고 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 trolox의 환원력과 비교하였으며, 각 실험은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

Lipid/MA assay에 의한 항산화 활성 측정

불포화 지방산의 산화생성물인 malonaldehyde (MA)는 반응성이 매우 크고 불안정하여 그 자체로는 정확한 측정이 어렵다. 따라서 생성된 MA를 N-methylhydrazine (NMH)와 반응시켜 1-methyl pyrazole (1-MP)로 변환시키고 이를 NPD가 장착된 GC로서 측정하는 방법이다. 이 방법은 천연물질의 항산화 효과를 측정하는 데 많이 사용되어 온 방법이다[3, 13, 18, 22]. 즉 0.5 M trizma buffer (pH 7.4), 1 M potassium chloride, 1% SDS, 0.01 M ferrous chloride, 0.3% hydrogen peroxide, 30 μ l cod liver oil과 농도별(10, 50, 100 및 500 μ g/ml)로 희석된 아이스플랜트 추출물을 screw cap tube에 넣고 증류수를 가하여 부피를 5 ml로 정용하였다. 그리고 shaking incubator (37°C, 17 hr)에 둔 후에 50 μ l의 4% BHT를 가하여 10분 동안 방치함으로써 산화를 정지시켰다. 그 후 각각의 screw cap tube에 NMH 30 μ l를 가하고 상온에서 1시간 동안 반응시켜 1-MP로 유도체화하였다. 이 1-MP는 SPE (solid phase extraction)법으로 분리·정제하였다. 즉 SPE cartridge (MEGA BE-C₁₈, Varian, Harbor, CA, USA)에 ethyl acetate, methanol, 증류수의 순으로 각각 10 ml씩을 서서히 통과시키고 유도체화 된 시료를 가한 후, 증류수 5 ml와 ethyl acetate 10 ml를 통과시켜 반응생성물인 1-MP를 용출하였다. 여기에 내부 표준물질로 20 μ l의 2-methyl pyrazine (2-MP)을 가하고 부피를 ethyl acetate로서 10 ml로 정용하였다. 1-MP의 분석은 DB-wax capillary column (0.32 mm i.d.×30 m, 0.25 μ m film thickness)과 NPD가 장착된 GC (Model 6890, Agilent Technologies)를 사용하였고, 분석조건으로 injector 및 detector의 온도는 모두 250°C, column oven 온도는 60°C에서 4°C/min으로 하여 160°C까지 상승시킨 후 2분간 더 유지하도록 하였다. Carrier gas는 He, flow rate는 1.5 ml/min, split ratio는 1:20, 시료의 주입량은 1 μ l로 하였다.

BNL CL.2 세포배양

본 실험에 사용된 흰쥐 정상 간세포(mouse liver normal cell, BNL CL.2)는 한국세포주은행으로부터 구입하였으며, 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% P/S (penicillin-streptomycin)가 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)배지에 배양하였다. 배양된 BNL CL.2 세포가 80% 정도 배양플라스크 바닥에 유착되었을 때 PBS로 세척한 후 0.5% trypsin-EDTA를 처리하여 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 정지하여 세포를 떼어내어 1,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 모든 세포를 8×10⁴ cell/well이 되도록 희석하여 T-75 flask에 분주하여 2일 간격으로 계대배양하였다[21].

세포 독성 측정(MTT assay)

세포의 생존율은 Mosmann의 MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] 환원 방법을 약간 변

형하여 측정하였다[21]. BNL CL.2 세포를 7×10⁴ cells/ml가 되도록 24-well plate에 분주한 뒤 24시간 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 예비 배양하고 아이스플랜트 추출물을 최종 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mg/ml)가 되도록 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 200 μ l의 MTT (5 mg/ml) 용액을 가하고 CO₂ incubator에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에 떨어져 나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하고 PBS로 2회 세척하였다. 그 후 DMSO를 1 ml씩 가하여 20분 동안 녹여낸 다음 96-well plate에 200 μ l씩 옮겨 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

t-BHP에 의하여 손상된 간세포의 보호효과

t-BHP (tert-butyl hydroperoxide)에 의한 산화적 손상에 대한 간세포보호효과를 관찰하기 위하여, BNL CL.2 세포를 7×10⁴ cells/ml가 되도록 24-well plate에 분주한 뒤 24시간 동안 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 배양하고 아이스플랜트 추출물을 최종농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml)가 되도록 세포에 한 시간 전에 처리한 후 t-BHP (최종농도 80 μ M)를 첨가하고 24시간 더 배양하였다. 이후 MTT assay로서 세포의 생존율을 측정하였다[12]. 세포 생존율은 540 nm에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

H₂O₂에 의하여 손상된 간세포의 보호효과

H₂O₂처리에 따른 산화적 손상에 대한 간세포보호효과를 관찰하기 위하여, BNL CL.2 세포를 5×10⁴ cells/ml가 되도록 24-well plate에 분주하여 24시간 동안 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 예비 배양한 후 배지를 제거하고 PBS (phosphate buffered saline)로 2회 세척한 다음 배지를 교환하였다. 그 후 아이스플랜트 추출물을 최종농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml)가 되도록 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 0.4 mM H₂O₂를 처리한 후, 2시간 동안 배양한 다음 이후 MTT assay로 세포생존율을 측정하였다[12]. 세포 생존율은 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

Ethanol에 의하여 손상된 간세포의 보호효과

Ethanol 처리에 따른 산화적 손상에 대한 간세포보호효과를 관찰하기 위하여, BNL CL.2 세포를 5×10⁴ cells/ml가 되도록 24-well plate에 분주하여 20시간 동안 배양하고, 3% FBS를 함유한 DMEM 배지로 교환하여 아이스플랜트 추출물을 최종 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml)가 되도록 처리하고 1시간 후, 300 mM alcohol 100 μ l 처리하여 24시간 배양하였다. 5일간 같은 방법으로 간세포에 시료와 alcohol을 처리한 다음 이후 MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다. 세포생존율은 540 nm에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

α-Glucosidase 저해 활성

α-Glucosidase 저해 활성은 Tibbot과 Skadsen의 방법을 변형하여 수행하였다[28]. 1 mg/ml로 농도를 맞춘 아이스플랜트 추출물 50 μl, α-glucosidase (1 unit/ml) 50 μl, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) 50 μl와 혼합하여 37°C에서 3분간 pre-incubation 한 후, potassium phosphate buffer에 녹인 12 mM p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside 200 μl를 가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 1 N NaOH 50 μl를 가하여 반응을 정지시키고 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구는 동량의 증류수로 실험하였으며 양성대조군으로 acarbose를 사용하였다. 효소 활성의 저해 정도는 아래의 식에 의하여 산출하였으며, 각 실험은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

$$\alpha\text{-Glucosidase 저해 활성}(\%) = [1 - (\text{시료 처리구의 흡광도} / \text{음성대조구 흡광도})] \times 100$$

α-Amylase 저해 활성

α-Amylase 저해 활성은 Xu 등[30]의 방법을 응용하여 효소 활성을 측정하였다. 1 mg/ml로 농도를 맞춘 아이스플랜트 추출물 500 μl, α-amylase (5 unit/ml) 500 μl, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) 500 μl를 혼합하여 37°C에서 3분간 pre-incubation한 후 1% starch 500 μl를 가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응물에 48 mM 3,5-dinitrosalicylic acid 발색 시약과 30% Na-K-tartrate가 포함된 0.5 M NaOH 1.5 ml를 넣고 100°C에서 5분간 끓여 발색시킨 후 충분히 냉각하였다. 이어서 2.5 mL의 물을 가하고 잘 섞은 후 200 μl씩 96 well plate에 옮겨 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구는 동량의 증류수로 실험하였으며 양성대조군으로 acarbose를 사용하였다. 효소 활성의 저해 정도는 아래의 식에 의하여 산출하였으며, 각 실험은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

$$\alpha\text{-Amylase 저해 활성}(\%) = [1 - (\text{시료 처리구의 흡광도} / \text{음성대조구 흡광도})] \times 100$$

성대조구 흡광도] ×100

통계처리

실험결과는 SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS inc, Chicago IL, USA) program Ver. 21.0을 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하여 유의성이 있는 경우에 Duncan의 다중범위검정(Duncan's multiple range test)으로 시료 간의 유의차를 검정하였다(p<0.05).

결과 및 고찰

pH 변화 및 organic acid 함량

본 연구를 위하여 제조한 아이스플랜트 물김치의 발효일수에 맞춰 침지액(mulkimchi brine)과 건더기(mulkimchi solids) 건조분말을 준비하였다. 발효의 진행 정도를 확인하기 위하여 침지액의 수소이온농도(pH)를 측정하였으며, 최적 발효시기를 결정하기 위하여 침지액에 생성된 유기산의 함량을 분석하였다. Table 1에 나타난 침지액 중의 수소이온 농도는 발효시작일(IPF-0)부터 최종발효일인 6일째(IPF-6)까지 계속 증가하여 발효가 진행되고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 발효기간 중 생성된 유기산은 oxalic acid, malic acid 및 ascorbic acid는 3일째에 가장 생성량이 많았으나, lactic acid는 4일째에, citric acid는 2일째에 가장 많이 생성되었다. 한편 acetic acid는 발효 6일째까지 지속적으로 증가하여 pH를 낮추는 주요인이 되었을 것으로 생각되었다. 그러나 전체적으로 유기산의 생성량은 발효 4일째에 가장 많았다.

Cyclitols 함량

Table 2에는 아이스플랜트 물김치 건더기로부터 cyclitol 화합물들의 변화를 분석하였다. D-pinitol을 비롯한 myo-inositol, D-chiro-inositol은 아이스플랜트의 항당뇨효과를 나타

Table 1. Changes of pH and organic acid composition of mulkimchi brine produced from *Mesembryanthemum crystallinum* during fermentation periods

Organic acids	Organic acid contents (mg/g) during fermentation periods								
	IP	IPF-0	IPF-1	IPF-2	IPF-3	IPF-4	IPF-5	IPF-6	
pH	NT ¹⁾	5.80	5.36	5.28	4.61	4.12	4.10	3.90	
Oxalic acid	8.04±0.34 ²⁾³⁾	8.24±0.45 ^f	376.19±18.08 ^{A4)d}	468.59±46.75 ^{ABb}	506.89±18.49 ^{Ba}	424.87±9.66 ^{Bc}	351.14±12.80 ^{Cd}	249.45±12.20 ^{Ce}	
Citric acid	8.09±4.35 ^c	8.32±2.07 ^c	387.11±20.07 ^{Aa}	393.48±45.50 ^{ABa}	49.20±2.11 ^{Eb}	60.68±6.36 ^{Db}	58.48±9.38 ^{Db}	ND	
Malic acid	ND ⁵⁾	ND	315.84±33.43 ^{Bb}	382.39±32.24 ^{ab}	401.91±48.51 ^{Ca}	365.34±15.50 ^{Cab}	333.34±72.66 ^{Cab}	213.59±18.39 ^{Cc}	
Ascorbic acid	10.18±0.02 ^c	10.18±0.03 ^c	10.44±0.03 ^{Dc}	29.86±2.35 ^{Db}	47.42±10.37 ^{Ea}	45.33±3.22 ^{Da}	34.56±1.09 ^{Db}	29.76±3.07 ^{Db}	
Lactic acid	ND	ND	96.73±24.49 ^{Cf}	512.50±141.91 ^{Ae}	2,430.29±93.18 ^{Ad}	4,870.01±242.80 ^{Aa}	3,853.40±174.04 ^{Ab}	2,882.69±220.59 ^{Ac}	
Acetic acid	ND	ND	ND	174.01±28.16 ^{Ce}	307.81±30.18 ^{Dd}	416.57±39.88 ^{Bc}	483.92±34.55 ^{Bb}	670.53±42.14 ^{Ba}	

¹⁾Not test.

²⁾The values represent the mean ± SD (n=3).

³⁾Different small letters within a same component are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

⁴⁾Different capital letters within a same sample are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

⁵⁾No detected.

Table 2. Changes of cyclitol compounds of mulkimchi solids produced from *Mesembryanthemum crystallinum* during fermentation periods

Cyclitols	Contents of cyclitol compounds (mg/g)							
	IP	IPF-0	IPF-1	IPF-2	IPF-3	IPF-4	IPF-5	IPF-6
D-Pinitol	4.916±0.096 ^{1)A2)a3)}	4.806±0.133 ^{Aa}	4.739±0.137 ^{Aa}	4.412±0.358 ^{Ab}	4.172±0.123 ^{Abc}	4.105±0.151 ^{Abcd}	4.035±0.078 ^{Acdd}	3.843±0.116 ^{Ad}
myo-Inositol	0.453±0.022 ^{Ce}	0.471±0.020 ^{Ce}	0.502±0.007 ^{Cd}	0.507±0.009 ^{Cd}	0.541±0.009 ^{Cc}	0.562±0.011 ^{Cbc}	0.582±0.017 ^{Cb}	0.630±0.029 ^{Ca}
D-chiro-Inositol	2.815±0.008 ^{Be}	2.946±0.041 ^{Bde}	2.978±0.030 ^{Bde}	3.161±0.148 ^{Bd}	3.419±0.178 ^{Bc}	3.582±0.215 ^{Bc}	3.835±0.138 ^{Bb}	4.117±0.096 ^{Ba}
Total amounts	8.183±0.108	8.222±0.157	8.220±0.125	8.079±0.361	8.132±0.194	8.249±0.232	8.452±0.177	8.590±0.084

¹⁾The values represent the mean ± SD (n=3).

²⁾Different capital letters within a same sample are significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

³⁾Different small letters within a same component are significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

내는 주요성분으로 알려져 있다[11, 15, 16]. 발효기간 중 D-pinitol은 발효 전 4.196±0.096 mg/g에서 6일째에는 3.843±0.116 mg/g으로 감소하였다. 그러나 myo-inositol과 D-chiro-inositol은 각각 발효 전 0.453±0.022와 2.815±0.008 mg/g에서 6일째에 0.630±0.029와 4.117±0.096 mg/g으로 증가하였다. 이는 D-pinitol에 결합되어 있는 methyl기가 발효가 진행됨에 따라 가수분해되어 주로 D-chiro-inositol로, 일부는 myo-inositol로 전환된 것으로 이해하였다. 이와 같은 결과들을 미루어 볼 때, 아이스플랜트 물김치의 발효는 최소한 3일 이상은 진행되어야 할 것으로 생각되었다. 그러나 발효 4일 이후에는 자극적인 신맛이 생겨나기 때문에 기호에 따라서 적절히 발효일수를

조절하여야 할 것으로 생각되었다.

항산화활성

아이스플랜트의 물김치 건더기 추출물의 항산화활성을 알아보기 위하여 DPPH, ABTS 및 FRAP 활성을 측정하였다 (Table 3). 우선 DPPH는 분자 내에 안정한 radical을 가지고 있지만 항산화성 물질과 반응하면 radical이 소거되는 원리를 이용하여 전자공여능을 측정하는 방법으로 주로 phenolic 화합물과 aromatic amine 화합물에 많이 사용된다[20]. 아이스플랜트 추출물의 농도에 따른 DPPH radical 소거능은 모든 시료에서 농도가 증가함에 따라 상승하였다. 그리고 1 mg/ml

Table 3. Antioxidant activities of extracts of mulkimchi solids produced from *Mesembryanthemum crystallinum* during fermentation periods

Treated conc. (mg/ml)	Antioxidant activities (%) during fermentation periods										
	IP	IPF-0	IPF-1	IPF-2	IPF-3	IPF-4	IPF-5	IPF-6	BHA	Trolox	
DPPH	0.03125	3.30±1.87 ^{1)E2)d5)}	5.72±1.85 ^{Ecd}	4.94±1.51 ^{Fcd}	8.03±0.82 ^{Ec}	12.92±1.25 ^{Fb}	12.85±1.29 ^{Eb}	16.71±3.01 ^{Eb}	13.88±0.88 ^{Fb}	48.12±5.52 ^{Ea}	—
	0.0625	6.99±4.25 ^{DEd}	6.96±1.39 ^{Ed}	9.84±2.07 ^{Ed}	17.42±2.38 ^{Dc}	21.96±2.14 ^{Ebc}	26.11±4.67 ^{Db}	23.95±2.10 ^{Db}	26.36±2.25 ^{Eb}	53.59±3.89 ^{Ea}	—
	0.125	11.18±2.22 ^{De}	14.90±2.29 ^{Dde}	19.19±2.33 ^{Dd}	31.99±6.68 ^{Cc}	37.26±1.74 ^{Dbc}	36.71±3.00 ^{Cbc}	42.06±1.91 ^{Cb}	35.84±1.80 ^{Dc}	64.88±3.86 ^{Da}	—
	0.25	22.34±3.63 ^{Cf}	25.91±4.87 ^{Cf}	38.45±0.62 ^{Ce}	36.58±1.48 ^{Ce}	45.30±3.97 ^{Cd}	46.96±1.44 ^{Bcd}	54.52±2.94 ^{Bb}	50.87±1.59 ^{Cbc}	76.42±0.66 ^{Ca}	—
	0.5	37.68±1.83 ^{Be}	40.85±3.60 ^{Be}	47.08±2.20 ^{Bd}	49.67±1.20 ^{Bd}	59.59±3.53 ^{Bc}	78.20±2.62 ^{Ab}	74.08±4.91 ^{Ab}	76.47±3.67 ^{Bb}	83.24±2.03 ^{Ba}	—
	1	58.03±1.57 ^{Af}	57.97±0.46 ^{Af}	59.79±0.79 ^{Aef}	60.59±1.19 ^{Ae}	65.23±1.86 ^{Ad}	77.21±1.91 ^{Ab}	79.09±0.69 ^{Ab}	71.51±0.30 ^{Ac}	91.54±0.24 ^{Aa}	—
sABTS	0.03125	7.82±3.16 ^{Fd}	7.28±1.68 ^{Ed}	8.85±0.78 ^{Fd}	11.08±3.52 ^{Ed}	6.10±2.48 ^{Fd}	7.35±1.30 ^{Fd}	18.64±2.66 ^{Ec}	24.89±4.63 ^{Db}	40.08±0.58 ^{Fa}	—
	0.0625	13.46±2.00 ^{Ee}	24.02±4.59 ^{Dd}	27.03±2.54 ^{Ecd}	24.83±1.83 ^{Dd}	24.13±2.40 ^{Ed}	30.80±0.40 ^{Ec}	32.21±1.82 ^{Dc}	43.68±7.02 ^{Cb}	50.64±0.77 ^{Ea}	—
	0.125	27.01±0.33 ^{Df}	36.44±0.47 ^{Ce}	38.13±1.11 ^{Dde}	44.21±1.68 ^{Cc}	43.25±1.50 ^{Dc}	41.70±0.85 ^{Dcd}	52.78±2.59 ^{Cb}	50.85±5.52 ^{Cb}	62.31±1.61 ^{Da}	—
	0.25	34.94±2.36 ^{Cf}	41.67±5.98 ^{Ce}	45.36±0.48 ^{Cde}	47.83±1.57 ^{Cd}	50.38±5.83 ^{Cd}	65.23±2.10 ^{Cc}	78.86±1.93 ^{Ba}	76.03±3.12 ^{Bab}	71.39±1.19 ^{Cb}	—
	0.5	53.13±2.53 ^{Be}	56.19±0.78 ^{Bde}	60.91±2.07 ^{Bcd}	63.92±2.97 ^{Bc}	56.57±2.72 ^{Bde}	75.33±4.48 ^{Bb}	82.38±4.05 ^{Ba}	86.34±0.12 ^{Aa}	83.06±2.97 ^{Ba}	—
	1	64.85±4.87 ^{Ad}	65.52±2.24 ^{Ad}	73.53±2.92 ^{Ac}	76.33±1.51 ^{Ac}	74.23±3.46 ^{Ac}	87.55±1.21 ^{Ab}	87.18±1.80 ^{Ab}	85.88±0.12 ^{Bb}	93.43±1.98 ^{Aa}	—
FRAP	0.03125	6.98±1.70 ^{1)Fe}	6.45±2.00 ^{Fe}	5.18±0.61 ^{Fe}	6.32±2.41 ^{Fe}	5.84±1.35 ^{Fe}	10.04±2.06 ^{Ed}	15.99±1.85 ^{Fc}	19.61±1.38 ^{Fb}	—	30.93±0.97 ^{Fa}
	0.0625	14.21±0.76 ^{Ee}	17.15±0.92 ^{Dde}	13.51±1.47 ^{De}	20.60±1.26 ^{Ecd}	18.71±0.52 ^{Ecd}	21.52±2.69 ^{Dc}	25.42±2.95 ^{Eb}	28.92±2.95 ^{Eb}	—	43.00±3.46 ^{Ea}
	0.125	27.55±2.67 ^{De}	24.37±2.20 ^{Cef}	22.59±2.38 ^{Cf}	26.89±1.80 ^{De}	34.64±1.16 ^{Dcd}	33.22±2.78 ^{Cd}	37.99±1.13 ^{Dbc}	40.98±1.66 ^{Dc}	—	59.08±1.70 ^{Da}
	0.25	36.44±0.34 ^{Ce}	37.83±2.28 ^{Be}	40.89±1.26 ^{Be}	47.00±0.89 ^{Cd}	58.73±1.09 ^{Cb}	53.45±2.45 ^{Bc}	53.03±2.43 ^{Cc}	60.54±4.58 ^{Cb}	—	74.15±4.43 ^{Ca}
	0.5	54.68±0.64 ^{Bde}	39.69±1.03 ^{Bf}	51.58±5.68 ^{Ae}	58.17±2.12 ^{Bd}	68.35±1.32 ^{Bc}	70.13±2.56 ^{Abc}	67.38±2.42 ^{Bc}	73.45±1.42 ^{Bb}	—	86.43±3.72 ^{Ba}
	1	60.58±0.98 ^{Ad}	53.58±5.68 ^{Ae}	55.73±1.86 ^{Ade}	67.65±0.51 ^{Ac}	75.37±2.09 ^{Ab}	74.72±4.62 ^{Ab}	78.04±5.88 ^{Ab}	78.72±0.99 ^{Ab}	—	91.88±1.08 ^{Aa}

¹⁾The values represent the mean ± SD (n=3).

²⁾Different capital letters within a same sample are significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

³⁾Different small letters within a same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

의 농도로 처리하였을 때, 발효하지 않은 아이스플랜트의 활성(58.03±1.57%)보다 발효하였을 때의 활성(57.97±0.46~79.09±0.69%)이 대체로 높았으며 발효 5일째에 가장 높게 나타났다. 한편 Hanen 등[8]은 *Mesembryanthemum*속 식물들의 항산화활성과 phenol 화합물의 조성을 비교한 연구에서 아이스플랜트(*M. crystallinum*)이 가장 높은 활성을 나타내었다고 보고하였다. 그러나 발효 유무에 따른 활성의 변화에 대한 보고가 없어서 매우 아쉬웠다. ABTS radical 소거 활성은 ABTS radical (ABTS^{•+})이 항산화 물질에 의해 소거되는 정도를 측정하는 방법이다[27]. 아이스플랜트 추출물의 농도에 따른 ABTS radical 소거농도 모든 발효시점에서 농도가 증가함에 따라 상승하였다. 그리고 1 mg/ml의 농도로 처리하였을 때, 발효 전의 활성(64.85±4.87%)보다 발효 후의 활성(65.52±2.24~87.55±1.21%)이 대체로 높았으며 발효 4일째에 가장 높게 나타났다. FRAP assay는 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여 고안된 방법이다[14]. FRAP assay에 의한 항산화활성도 DPPH, ABTS radical 소거활성과 유사한 경향을 나타내었으나, 발효 6일째에 최대 활성을 나타내었다. 또한 Hanen 등[8]은 *Mesembryanthemum*속 식물들이 양성대조군(trolox, ascorbic acid)보다 높은 항산화활성을 나타내었다고 보고하였다. Lipid/MA assay는 불포화 지방산이 산화될 때 malonaldehyde가 생성되는 원리를 이용한 측정방법으로서 아이스플랜트 추출물을 농도별로 처리하여 지질을 인위적으로 산화시킨 후 발생하는 malonaldehyde 형성을 억제하는 정도를 BHA와 비교하였다(Table 4). Lipid/MA assay에 의한 항산화 활성은 모든 발효시점의 시료에서 농도가 증가함에 따라 활성도 증가하였고, 대체로 발효 후에 발효 전보다 대체로 높게 나타났다. 그러나 각각의 추출물을 500 µg/ml 처리하였을 때, 발효 4일째에 가장 높은 활성(64.65±1.63%)을 나타내었으며, 발효 5, 6일째에는 각각 59.79±2.05와 60.60±3.92%로서 조금 낮아지는 경향을 나타내었다. Park 등[24]은 발효더덕의 DPPH 소거활성이 생더덕보다 4배정도 더 높았다고 보고하였다. 그러나 Shon [26]은 복령과 후박의 버섯균사체 발효물의 항산화활성이 더 낮아졌다고 보고하였고, Doh 등[7]은 산마늘 발효추출물의 항산화활성이 비발효 추출물과 비교하여

유의할 만한 변화가 없었다고 하였다. 아이스플랜트의 경우에는 발효 후에 비교적 항산화활성이 높아졌으나, 생약의 종류에 따라 활성을 나타내는 유효성분이 다르기 때문에 발효 후에는 유효성분의 변화형태에 따라 다르게 나타난 것이라고 생각되었다.

간세포 보호효과

BNL CL2 세포에 아이스플랜트 추출물을 농도별로 처리한 후, 24시간 배양한 다음 MTT assay로 세포생존율을 측정한 결과는 Fig. 1과 같았다. 즉 추출물을 처리하지 않은 대조군의 생존율을 100%로 하였을 때, 추출물을 500 µg/ml의 농도로 처리한 군을 제외한 모든 군에서 90% 이상의 생존율을 나타내었다. 따라서 아이스플랜트 추출물 200 µg/ml 이하에서는 세포독성이 거의 없음을 인정하여 200 µg/ml이하로 처리농도를 설정하여 실험을 진행하였다. Table 5는 BNL CL2 세포에 아이스플랜트 추출물을 농도별로 처리하고 1시간 후에 t-BHP 80 µM을 처리한 뒤 24시간 후에 세포생존율을 확인한 결과이다. t-BHP를 처리한 세포의 생존율은 14.19±0.98%로서 처리하지 않은 정상세포의 99.87±0.47%에 비해 현저히 낮았으나, 아이스플랜트 추출물을 처리한 모든 실험군에서 농도에 비례하여 세포생존율이 증가하였다. 그러나 발효 4일째까지는 발효 전에 비하여 오히려 낮은 세포생존율을 보였다. 즉 발효 2일째까지는 세포생존율이 오히려 낮아졌으나, 3일째부터는 조금씩 높아지기 시작하였다. 그리고 발효 5일째부터는 발효 전의 아이스플랜트 추출물보다 약간 높아지기 시작하였으며, 200 µg/ml의 농도로 처리하였을 경우, 발효 6일째에는 50.07±4.85%까지 높아졌다. Table 6은 BNL CL2 세포에 아이스플랜트 추출물을 농도별로 전 처리한 후, 0.4 mM H₂O₂를 처리하고 2시간 후 세포생존율을 확인한 결과이다. H₂O₂를 처리한 세포의 생존율은 13.80±2.25%로서 처리하지 않은 정상세포의 100.27±0.31%에 비해 현저히 낮았다. 그러나 200 µg/ml의 농도로 처리하였을 경우, 세포생존율이 발효 전(54.35±2.16%)에 비해 발효 후(50.01±8.02~57.06±4.52%)에 뚜렷한 증가를 보이지 못하였으며, 발효초기에는 세포생존율이 조금씩 높았으나, 발효 6일째에는 50.01±8.02%로서 오히려 낮아졌다. BNL CL2

Table 4. Antioxidant activities of extracts from mulkimchi solids produced from *Mesembryanthemum crystallinum* during fermentation periods by Lipid/MA assay

Treated conc. (µg/ml)	Antioxidant activities (%)								
	IP	IPF-0	IPF-1	IPF-2	IPF-3	IPF-4	IPF-5	IPF-6	BHA
10	8.15±0.34 ^{1)D2)e3)}	12.95±2.45 ^{De}	20.70±1.73 ^{Dcd}	19.05±2.15 ^{Dd}	22.11±3.10 ^{Dbcd}	23.37±4.05 ^{Dbcd}	26.29±4.72 ^{Db}	24.63±3.17 ^{Cbc}	62.34±0.91 ^{Da}
50	26.35±1.41 ^{Ce}	37.11±2.13 ^{Ccd}	40.47±2.16 ^{Cbc}	32.24±5.02 ^{Cd}	31.97±2.91 ^{Cd}	44.79±3.40 ^{Cb}	40.96±2.15 ^{Cbc}	37.19±5.54 ^{Bcd}	81.33±2.05 ^{Ca}
100	36.01±2.55 ^{Be}	48.57±2.96 ^{Bcd}	47.33±2.14 ^{Bcd}	42.09±3.52 ^{Bde}	48.42±4.91 ^{Bcd}	56.05±5.65 ^{Bb}	50.55±4.44 ^{Bbc}	44.20±5.42 ^{Bcd}	86.16±0.34 ^{Ba}
500	47.98±3.23 ^{Ae}	53.85±2.81 ^{Ad}	54.97±0.98 ^{Accl}	56.31±2.87 ^{Accl}	58.16±5.72 ^{Accl}	64.65±1.63 ^{Ab}	59.79±2.05 ^{Abc}	60.60±3.92 ^{Abc}	94.29±1.99 ^{Aa}

¹⁾The values represent the mean ± SD (n=3).

²⁾Different capital letters within a same sample are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

³⁾Different small letters within a same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

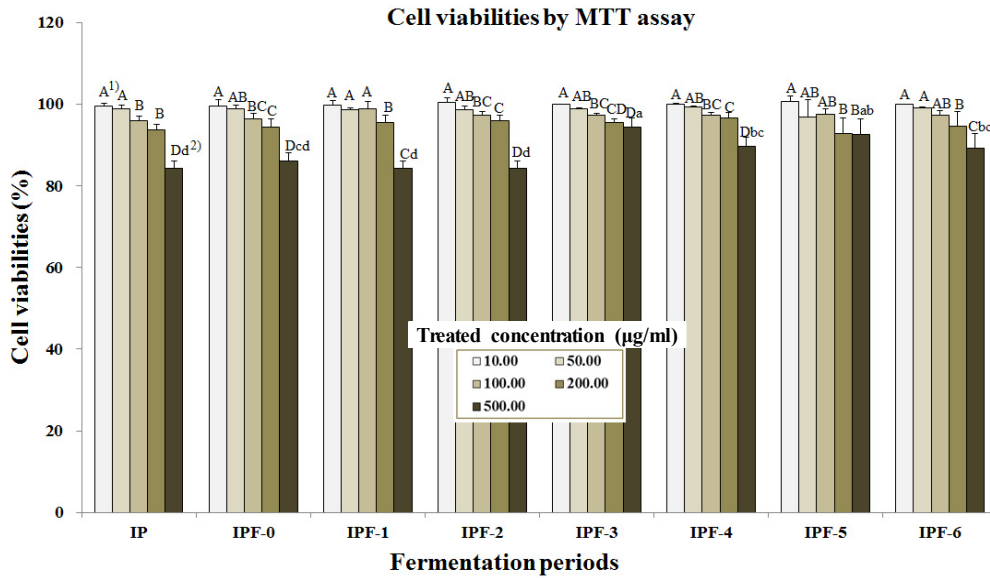


Fig. 1. Cell viabilities against hepatocytes (BNL CL2) of extracts from mulkimchi solids produced from *Mesembryanthemum crystallinum* during fermentation periods by MTT assay. All values represent the mean ± SD (n=3). ¹⁾Different capital letters within a same sample are significantly different by Duncan’s multiple range test at $p<0.05$. ³⁾Different small letters within a same concentration are significantly different by Duncan’s multiple range test at $p<0.05$.

Table 5. Protection effect against hepatocytes (BNL CL2) damaged by *t*-BHP of extracts from mulkimchi solids produced from *Mesembryanthemum crystallinum* during fermentation periods

Treated concentrations (µg/ml)	Viabilities (%) of hepatocytes (BNL CL2) damaged by <i>t</i> -BHP									
	IP	IPF-0	IPF-1	IPF-2	IPF-3	IPF-4	IPF-5	IPF-6	<i>t</i> -BHP ⁺	<i>t</i> -BHP ⁻
10	20.10±4.87 ^{1)Cbc}	19.35±4.30 ^{Cbce}	16.84±1.83 ^{Cce}	19.92±3.26 ^{Bbc}	22.36±1.86 ^{Bb}	17.01±2.74 ^{Cce}	17.05±1.51 ^{Cce}	22.01±2.25 ^{Cbc}		
50	25.00±3.48 ^{Cbc}	22.44±1.57 ^{BCc}	26.42±2.24 ^{Bbc}	24.57±4.79 ^{Bbc}	26.33±3.68 ^{Bbc}	23.32±5.05 ^{BCc}	30.81±6.01 ^{Bb}	26.59±2.01 ^{Cbc}		
100	36.45±2.72 ^{Bb}	26.38±4.69 ^{Bd}	34.94±4.71 ^{Abc}	24.35±0.96 ^{Bd}	28.78±8.60 ^{Bcd}	28.74±2.91 ^{Bcd}	33.84±2.71 ^{Bbc}	37.11±4.49 ^{Bb}	14.19±0.98 ^e	99.87±0.47 ^a
200	44.53±2.98 ^{Abcd}	40.37±1.04 ^{Accl}	37.66±5.66 ^{Accl}	36.54±9.09 ^{Ad}	39.31±1.72 ^{Accl}	42.97±6.71 ^{Abcd}	45.76±3.26 ^{Abc}	50.07±4.85 ^{Ab}		

¹⁾The values represent the mean ± SD (n=3).
²⁾Different capital letters within a same sample are significantly different by Duncan’s multiple range test at $p<0.05$.
³⁾Different small letters within a same concentration are significantly different by Duncan’s multiple range test at $p<0.05$.

Table 6. Protection effect against hepatocytes (BNL CL2) damaged by hydrogen peroxides of extracts from mulkimchi solids produced from *Mesembryanthemum crystallinum* during fermentation periods

Treated concentrations (µg/ml)	Viabilities (%) of hepatocytes (BNL CL2) damaged by H ₂ O ₂									
	IP	IPF-0	IPF-1	IPF-2	IPF-3	IPF-4	IPF-5	IPF-6	H ₂ O ₂ ⁺	H ₂ O ₂ ⁻
10	16.99±3.00 ^{1)(2)bcf3)}	16.27±3.74 ^{Cbf}	14.50±2.10 ^{Cf}	18.32±0.63 ^{Cbfc}	15.67±0.61 ^{Cbfc}	17.55±1.17 ^{Dbcf}	19.47±2.73 ^{Cb}	18.83±4.18 ^{Cbc}		
50	25.07±0.78 ^{Bb}	30.20±1.67 ^{Bb}	24.33±4.10 ^{Bb}	28.04±7.31 ^{Bb}	30.34±5.35 ^{Bb}	26.76±4.67 ^{Cb}	25.47±4.69 ^{Cb}	31.75±5.65 ^{Bb}		
100	51.89±7.65 ^{Ab}	47.83±9.25 ^{Abc}	50.03±6.65 ^{Abc}	33.09±5.63 ^{Bde}	30.49±0.71 ^B	42.09±1.82 ^{Bcd}	37.50±3.40 ^{Bde}	52.97±3.90 ^{Ab}	13.80±2.25 ^f	100.27±0.31 ^a
200	54.35±2.16 ^{Abc}	54.02±2.02 ^{Abc}	57.06±4.52 ^{Ab}	56.08±1.77 ^{Abc}	55.10±2.54 ^{Abc}	56.93±2.39 ^{Abc}	55.61±4.14 ^{Abc}	50.01±8.02 ^{Ac}		

¹⁾The values represent the mean ± SD (n=3).
²⁾Different capital letters within a same sample are significantly different by Duncan’s multiple range test at $p<0.05$.
³⁾Different small letters within a same concentration are significantly different by Duncan’s multiple range test at $p<0.05$.

세포에 300 mM ethanol을 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 후, 아이스플랜트 물김치 건더기의 추출물의 간세포보호 효과를 MTT assay로 세포 생존율을 측정할 결과는 Table 7와

같다. Ethanol을 처리한 세포의 생존율은 25.89±2.90%로서 처리하지 않은 정상세포에 비해 현저히 낮았으나, 아이스플랜트 추출물을 처리한 모든 실험군에서 농도에 비례하여 세포생존

Table 7. Protection effect against damaged hepatocytes (BNL CL.2) by alcohol of extracts from mulkimchi solids produced from *Mesembryanthemum crystallinum* during fermentation periods

Treated concentrations (µg/ml)	Viabilities (%) of hepatocytes (BNL CL.2) damaged by alcohol									
	IP	IPF-0	IPF-1	IPF-2	IPF-3	IPF-4	IPF-5	IPF-6	Alcohol [†]	Alcohol
10	33.48±3.51 ^{1)B2)bc3)}	31.28±6.05 ^{Chf}	33.77±3.01 ^{Cb}	33.77±4.01 ^{Cb}	30.43±4.87 ^{Dhf}	35.88±2.54 ^{Db}	32.72±3.33 ^{Cb}	33.44±3.32 ^{Ab}		
50	37.93±2.02 ^{Bde}	33.22±3.14 ^{Ce}	41.47±1.47 ^{Bd}	40.95±4.24 ^{Cd}	39.64±2.45 ^{Cde}	42.18±2.25 ^{Ccd}	49.18±4.44 ^{Bb}	48.64±8.59 ^{Abc}	25.89±2.90 ^f	100.66±0.86 ^a
100	51.31±3.82 ^{Abc}	41.86±3.78 ^{Bd}	41.52±4.01 ^{Bd}	50.41±1.76 ^{Bbc}	46.75±4.48 ^{Bcd}	56.76±1.90 ^{Bb}	54.65±5.36 ^{Bb}	54.51±3.71 ^{Ab}		
200	57.63±6.83 ^{Ac}	56.62±2.95 ^{Ad}	57.28±1.11 ^{Ac}	59.58±7.51 ^{Abcd}	60.74±2.02 ^{Abcd}	66.06±1.36 ^{Ab}	64.38±2.84 ^{Abc}	64.51±4.21 ^{Abc}		

¹⁾The values represent the mean ± SD (n=3).

²⁾Different capital letters within a same sample are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

³⁾Different small letters within a same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

Table 8. Inhibition effect against α-glucosidase and α-amylase of extracts from mulkimchi solids produced from *Mesembryanthemum crystallinum* during fermentation periods

Enzymes	Inhibition activities (%)									
	IP	IPF-0	IPF-1	IPF-2	IPF-3	IPF-4	IPF-5	IPF-6	Acarbose (mg/ml)	
									0.1	1
α-Glucosidase	83.52±2.69 ^{1)A2)c3)}	83.94±1.65 ^{Ac}	87.36±4.11 ^{Abc}	87.51±1.36 ^{Aabc}	88.78±3.30 ^{Aabc}	88.02±1.08 ^{Aabc}	89.63±1.85 ^{Aab}	92.79±2.16 ^{Aa}	62.34±0.91 ^{Bd}	85.11±5.69 ^{bc}
α-Amylase	54.10±1.20 ^{Bc}	54.24±5.75 ^{Bc}	53.80±4.34 ^{Bc}	55.57±1.82 ^{Bc}	55.30±3.42 ^{Bc}	57.56±1.21 ^{Bc}	54.29±3.63 ^{Bc}	52.64±3.26 ^{Bc}	75.62±4.86 ^{Ab}	86.64±3.15 ^a

¹⁾The values represent the mean ± SD (n=3).

²⁾Different capital letters within a same sample are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

³⁾Different small letters within a same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

율이 다소 증가하였다. 즉 200 µg/ml의 농도로 처리하였을 경우, 발효 1일째까지는 뚜렷한 변화를 보이지 않았으나, 발효 2일째부터 조금씩 높아지기 시작하여 발효 4일째에 66.06±1.36%로서 최대치를 나타내었다. Park [25]은 애엽 (*Artemisiae Argi* F.)의 유산균발효 추출물이 ethanol, acetaminophen, gallic acid, nocotine, lipopolysaccharide 등의 간 독성물질들에 의해 손상된 간 조직세포의 손상을 완화하는데 효능이 있음을 확인하였고, Yu 등[29]은 곰취 열수 추출 발효물이 간 기능 효소의 활성 억제, 혈청지질 대사 개선, 간 조직내 SOD 활성증가 및 과산화지질을 감소시켜 D-galactosamine으로 인한 간 손상을 완화시키는 데 효과적일 것이라고 하였다. 뿐만 아니라, Choi 등[6]은 유산균 발효 마늘 추출물이 알코올성 지방간이 유발된 마우스에 대한 실험결과에서 ALT, AST 및 ALP의 활성이 낮아졌으며, 간 손상을 나타내는 주요 지표들이 현저히 낮아졌다고 하였다. Lee 등[17]도 오이 발효 음료가 간 조직의 ALDH 활성과 항산화 방어계를 향상시킴으로서 알코올로 인한 간 독성을 보호할 수 있을 것이라고 보고한 바가 있다. 이와 같이 많은 연구들에서 발효 후에 간 보호효과가 증가된다고 보고하고 있으나, 본 실험에서는 발효 후에 간세포의 보호효과가 크게 증가하지는 않는 것으로 나타났다.

하고 소장에서 glucagonlike peptide-1의 분비를 촉진하여 글루카곤 분비를 억제한다[5]. α-Amylase는 탄수화물의 α-D-(1,4)-glucan 결합을 분해하여 α-amylase 저해제는 소장에서 전분의 소화를 저해하여 포도당의 흡수를 지연시킴으로써 급격한 혈당의 상승을 조절한다[23]. α-Glucosidase와 α-amylase 저해 활성은 아이스플랜트 추출물을 1 mg/ml의 농도로 처리하여 얻은 결과를 Table 8에 나타내었다. α-Glucosidase 저해 활성은 발효 전·후의 모든 실험군에서 83.52±2.69 ~ 92.79±2.16%로 상당히 높게 나타났다. 특히 발효기간이 증가함에 따라 조금씩 증가하는 경향이였다. 한편 α-Amylase 저해활성은 전체적으로 52.64±3.26~57.56±1.21%로 나타났다. 그러나 발효 전·후에 뚜렷한 상관관계를 나타내지 못하였다. Cho 등[4]은 오미자 발효원액(100%)은 100%의 높은 α-amylase 저해효과를 나타내었으며, α-glucosidase 활성도 오미자 발효액 30%에서 15.8%, 60%에서 49%의 저해활성을 나타내었다고 하였다. Jung 등[10]은 증숙이나 발효 혹은 병행처리 더덕추출물이 우수한 α-glucosidase활성 저해효과를 보였다고 하였다. 본 연구에서는 발효 아이스플랜트 추출물이 α-glucosidase의 활성을 저해하는 효과는 발효 전에 비하여 우수하였으나, 발효 후에 α-amylase 활성의 저해효과를 높이지는 못하였다.

α-Glucosidase 및 α-Amylase 저해활성

α-Glucosidase는 올리고당이나 이당류를 포도당으로 전환시키는 효소로서 α-glucosidase 저해제는 인슐린 분비를 촉진

감사의 글

이 논문은 2017년도 경남과학기술대학교 대학회계 연구비

지원에 의하여 연구되었음.

References

1. Agarie, S., Kawaguchi, A., Kodera, A., Sunagawa, H., Kojima, H., Nose A. and Nakahara, T. 2009. Potential of the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* as a new high-functional food as evaluated by polyol accumulation. *Plant Prod. Sci.* **12**, 37-46.
2. Ahn, C. H. and Park, P. B. 2009. Increase of the D-chiro-inositol and D-pinitol contents by abiotic stress in the buckwheat seedlings. *J. Life Sci.* **19**, 1456-1462.
3. Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.
4. Cho, E. K., Cho, H. E. and Choi, Y. J. 2010. Inhibitory effects of angiotensin converting enzyme and α -glucosidase, and alcohol metabolizing activity of fermented omija (*Schizandra chinensis* B.) beverage. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 655-661.
5. Cho, E. K. and Choi, Y. J. 2013. Antioxidant, antidiabetic, and anti-inflammatory effects of extracts and fractions from *Parthenocissus tricuspidata* stems. *J. Life Sci.* **23**, 399-405.
6. Choi, J. H., Kim, M. S., Yu, H. J., Kim, K. H., Lee, H. S., Cho, H. Y. and Lee, S. H. 2014. Hepatoprotective effects of lactic acid-fermented garlic extracts on fatty liver-induced mouse by alcohol. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 1642-1647.
7. Doh, E. S., Chang, J. P., Kil, K. J., Choi, M. S., Yang, J. K., Yun, C. W., Jeong, S. M., Jung, Y. H. and Lee, G. H. 2011. Antioxidative activity and cytotoxicity of fermented *Allium victorialis* L. extract. *Kor. J. Plant Res.* **24**, 30-39.
8. Hanen, F., Riadh, K., Samia, O., Sylvain, G., Christian, M. and Chedly, A. 2009. Interspecific variability of antioxidant activities and phenolic composition in *Mesembryanthemum* genus. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 2308-2313.
9. Heo, J. C., Lee, D. Y., Son, M. S., Yun, C. Y., Hwang, J. S., Kang, S. W., Kim, T. H. and Lee, S. H. 2008. Effects of mole crickets (*Grylotalpa orientalis*) extracts on anti-oxidant and anti-inflammatory activities. *J. Life Sci.* **18**, 509-514.
10. Jung, L. S., Yoon, W. B., Park, S. J., Park, D. S. and An, J. H. 2012. Evaluation of physicochemical properties and biological activities of steamed and fermented Deodeok (*Codonopsis lanceolata*). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 135-139.
11. Kang, S. M., Kim, S. J., Ha, S. H., Lee, C. R. and Nam, S. H. 2016. Biochemical components and physiological activities of Ice Plant (*Mesembryanthemum crystallinum*). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **45**, 1732-1739.
12. Kim, S. J., Kang, S. M., Ko, K. H. and Nam, S. H. 2017. Antioxidant activity and protective effects of *Cirsium japonicum* against damaged mouse liver cell (BNL CL.2). *J. Life Sci.* **27**, 442-449.
13. Ko, K. H. and Nam, S. H. 2012. Antioxidant activities of volatile aroma components from *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bureau extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1493-1501.
14. Kwak, J. H., Choi, G. N., Park, J. H., Kim, J. H., Jeong, H. R., Jeong, C. H. and Heo, H. J. 2010. Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. *J. Agric. Life Sci.* **44**, 57-66.
15. Larner, J. 1994. Multiple pathways in insulin signalling-fitting the covalent and allosteric puzzle pieces together. *Endocrine J.* **2**, 167-171.
16. Larner, J. 2001. D-chiro-Inositol in insulin action and insulin resistance—Old-fashioned biochemistry still at work. *IUBMB Life* **51**, 139-148.
17. Lee, H. I., Seo, K. I., Lee, J., Lee, J. S., Hong, S. M., Lee, J. H., Kim, M. J. and Lee, M. K. 2011. Effect of fermented cucumber beverage on ethanol metabolism and antioxidant activity in ethanol-treated rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 1099-1106.
18. Lee, K. G. and Shibamoto, T. 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chem.* **74**, 443-448.
19. Lee, S. Y., Choi, H. D., Yu, S. N., Kim, S. H., Park, S. K. and Ahn, S. C. 2015. Biological activities of *Mesembryanthemum crystallinum* (ice plant) extract. *J. Life Sci.* **25**, 638-645.
20. Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* **26**, 211-219.
21. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
22. Nam, S. H., Jang, H. W. and Shibamoto, T. 2012. Antioxidant activities of extracts from teas prepared from medicinal plants, *Morus alba* L., *Camellia sinensis* L., and *Cudrania tricuspidata*, and their volatile components. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 9097-9105.
23. Oh, S., Hong, S. S., Kim, Y. H. and Koh, S. C. 2008. Screening of biological activities in fern plants native to Jeju Island. *Kor. J. Plant Res.* **21**, 12-18.
24. Park, S. J., Song, S. W., D. H. Seong, Park, D. S., Kim, S. S., Gou, J. Y., Ahn, J. H., Yoon, W. B. and Lee, H. Y. 2009. Biological activities in the extract of fermented *Codonopsis lanceolata*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 983-988.
25. Park, W. S. 2010. Effect of *Artemisiae Argi* folium fermented with *Lactobacillus Pentosus* on viability of human hepatocyte treated with toxicants. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **24**, 457-462.
26. Shon, M. Y. 2007. Antioxidant and anticancer activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* fermented with mycelial mushrooms. *Food Industry Nutr.* **12**, 51-57.
27. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS cation radical decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
28. Tibbot, B. K. and Skadsen, R. W. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. *Plant Mol. Biol.* **30**, 229-241.
29. Yu, K. H., Lee, S. Y., Yang, H. M., Ham, Y. A., Lee, S. U., Chae, S. W. and Lee, Y. J. 2015. Effect of fermented water extracts from *Ligularia fischeri* on hepatotoxicity induced by D-galactosamine in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 1422-1430.

30. Xu, M. L., Wang, L., Xu, G. F. and Wang, M. H. 2011. Anti-diabetes and angiotensin converting enzyme inhibitory

activity of *Sonchus asper* (L) hill extract. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**, 61-67.

초록 : 아이스플랜트(*Mesembryanthemum crystallinum* L.) 발효추출물의 항산화, 항당뇨 및 간 보호효과

남상해^{1*} · 강승미² · 김선정³ · 고건희³

(¹경남과학기술대학교 식품과학부, ²(주)약목푸드, ³경남한방약초연구소)

본 연구는 아이스플랜트의 생리활성을 향상시키고, 식생활에서의 활용가능성을 높이기 위하여 물김치 형태로 발효시켰으며, 아이스플랜트의 성분 및 몇 가지 생리활성을 발효 전과 비교하였다. 물김치 침지액의 pH는 발효 6일째까지 계속해서 낮아졌으며, lactic acid의 생성량은 발효 4일째에 가장 많았다. 아이스플랜트 물김치 건더기 중의 D-pinitol은 발효 전 4.196±0.096 mg/g에서 6일째에는 3.843±0.116 mg/g으로 감소하였다. 그러나 myo-inositol과 D-chiro-inositol은 각각 발효 전 0.453±0.022와 2.815±0.008 mg/g에서 6일째에 0.630±0.029와 4.117±0.096 mg/g으로 증가하였다. 아이스플랜트 추출물의 DPPH, ABTS radical 소거활성 및 FRAP 활성은 대체로 발효 후에 높게 나타나 유사한 경향이었으며, 1 mg/ml의 농도로 처리하였을 때 각각 발효 5일째(79.09±0.69%), 4일째(87.55±1.21%) 및 6일째(78.72±0.99%)에 가장 높았다. Lipid/MA assay에 의한 항산화 활성도 대체로 발효 후에 높게 나타나 유사한 경향이었으며, 추출물을 500 µg/ml 처리하였을 때, 발효 4일째에 가장 높은 활성(64.65±1.63%)을 나타냈으며, 발효 5, 6일째에는 낮아지는 경향이였다. 아이스플랜트 추출물의 t-BHP, H₂O₂ 및 ethanol에 의하여 손상된 BNL CL2 세포의 생존율은 각각 14.19±0.98, 13.80±2.25 및 25.89±2.90%이었으나, 추출물을 200 µg/ml의 농도로 처리하였을 경우, 각각 발효 6일째에 50.07±4.85%, 2일째에 57.06% 및 4일째에 66.06±1.36%의 세포생존율을 나타내어 간세포가 회복되고 있음을 알 수 있었다. 그러나 발효 후에 간세포 보호효과가 뚜렷이 증가하지는 않았다. α-Glucosidase 저해활성은 모든 실험군에서 83.52±2.69~92.79±2.16%로 상당히 높게 나타났으며, 발효기간이 경과함에 따라 조금씩 증가하였다. 한편 α-Amylase 저해활성은 전체적으로 52.64±3.26~57.56±1.21%로 나타났으며 발효 전후에 뚜렷한 차이가 없었다. 이와 같은 결과로 볼 때, 아이스플랜트의 물김치 발효기간은 4~5일이 적절할 것으로 생각되었다. 한편 발효에 의한 기능성은 항산화효과를 제외한 간세포보호 및 α-Glucosidase, α-Amylase 저해활성은 전체적으로 소폭 향상에 그쳤다. 따라서 이러한 결과를 바탕으로 발효 등 다양한 가공방법이 개발되어, 향후 아이스플랜트의 소비촉진의 계기가 되기를 기대한다.