

## Biological Activity of *Viola mandshurica* Fermented with *Bacillus methylotrophicus* CBMB205 and *Leuconostoc pseudomesenteroides* NRIC1777

Ji-Young Lee<sup>2\*</sup>, Su-Bin Oh<sup>1†</sup>, Nack-Shick Choi<sup>3</sup>, Yong-Woon Park<sup>4</sup> and Dae-Ook Kang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bio Health Science, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

<sup>2</sup>Interdisciplinary Program in Biotechnology, Graduate School, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

<sup>3</sup>K Protech Inc., Daejeon 34141, Korea

<sup>4</sup>THEE & HERB, Sancheong 52234, Korea

Received December 26, 2018 / Revised January 7, 2019 / Accepted January 31, 2019

The aim of this study was to improve the efficacy and functionality of *Viola mandshurica* (VM). A water suspension of VM powder was fermented for 72 hr with *Bacillus methylotrophicus* CBMB205 (BM) and *Leuconostoc pseudomesenteroides* NRIC1777 (LP) isolated from kimchi. The antioxidant activity and reducing power of fermented VM, its total phenolic and flavonoid compounds, as well as its inhibitory activity on  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and pancreatic lipase were determined and compared to those of non-fermented VM (NVM), a negative control. The total phenolic and flavonoid compounds of VM fermented with BM and LP were higher than those of NVM by 1.4, 1.17, and about 3 times. There was no difference in 2, 2'-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity between fermented VM and NVM. However, there was a 2.1- and 1.6-fold increase in 2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity in VM fermented with BM and LP, respectively. The reducing power of BM was 1.6 times as high as NVM, but no significant difference was found between LP and NVM. Fermented VM's inhibitory activity on  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and pancreatic lipase was much higher than that of NVM. Fermenting VM with BM was superior to fermenting it with LP, except flavonoid content. Taken together, VM fermented with BM could be used as a functional food and as an additive to cosmetics.

**Key words** : Anti-diabetic activity, antioxidant activity, fermentation, lipase, *Viola mandshurica*

### 서론

제비꽃은 우리나라 남부지역의 양지바르고 다습한 곳에서 무리 지어 자라는 제비꽃과의 다년생 식물로 한방에서는 피부 발진과 습진의 치료와 거담제, 이뇨제 그리고 기관지염, 류마티스, 피부발진 및 습진 등에 항염증제와 같은 약리기능을 나타내는 것으로 알려져 있다[6, 13, 14]. 또한 다양한 연구를 통해 제비꽃은 항산화, 항당뇨, 항천식 및 신경세포보호 활성을 나타내는 것으로 보고되었다[29, 30]. 한방에서는 화농성 염증질환, 종기, 임파선 결핵, 피부질환 등의 치료제로 사용되고 장염, 설사, 이질, 복통, 눈다래끼 및 독사에 의한 교상 등에도 처방되었다[2, 3]. 제비꽃에는 사포닌, 살리실산, 메틸배당체, 알칼로이드, 폴리페놀(polyphenol), 플라보노이드

(flavonoid), cyclotide, 다당류 및 coumarin 등이 포함되어 있으며 제비꽃 추출물은 혈액순환을 개선하여 울혈을 효과적으로 없애고 바이러스 감염, 독소, 알코올 및 약물 등에 의한 손상으로부터 간을 보호하는데 효과가 있는 것으로 인식되고 있다[6, 18, 28].

지금까지 제비꽃의 생리활성에 관한 다양한 연구가 진행되어 제비꽃 추출액의 항산화 활성[2, 3, 14]과 혈당량 증가와 관련이 있는  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase 효소에 대한 저해활성[14], 제비꽃 에탄올 추출액의 항천식 활성[17], 고지방 식이로 유도된 비만 쥐에서 항비만 활성[28-30], 항동맥경화 활성과 간지방증 개선효과[23], glutamate [16]와 과산화수소[6]로 유도된 산화적 스트레스로부터 신경세포 보호효과 및 제비꽃당 침출액의 클로로포름 추출액에서 멜라닌 생성 저해활성[13] 등이 보고되었다.

오늘날 소비자들이 점차적으로 친환경적인 제품을 선호함에 따라 발효를 이용한 생물학적인 방법이 자연스럽게 각광을 받고 있다[26]. 발효란 유산균, *Bacillus* 및 효모 등 유익한 미생물을 이용하여 기존 식품의 효능에서 새로운 생리활성 부여 및 여러 유용성분의 증가, 흡수율의 증가, 유용한 장내 미생물의 증가 등의 이점을 더하는 것을 말한다[1]. 발효과정을 통해 식품의 페놀 및 플라보노이드 함량이 증가되어 항산화, 항균

† Authors contributed equally.

\*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3554, Fax : +82-55-213-3550

E-mail : dokang@changwon.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.

및 항암 활성 등의 약리활성이 향상된다[8]. 또한 유산균을 이용한 천연물 발효 공정은 천연 소재 추출물의 활성 성분 및 생리 활성의 증가를 쉽게 극대화할 수 있다는 이점이 있으며 *Bacillus*는 항 혈전효과를 지니고 단백질 분해능력이 뛰어난 미생물로서 발효 시 생산되는 효소의 작용으로 가용성 추출물의 함량이 증가하는 등 다양한 효과를 나타낸다[26]. 소득수준의 향상과 식생활 패턴의 서구화로 인해 비만, 당뇨, 고혈압, 혈관계질환 등과 같은 성인병이나 대사성 질환의 발병률이 증가되고 있다[11]. 최근에는 이를 바탕으로 질병 예방 및 치유 차원에서 만성 질환 관련 건강식품에 대한 관심과 요구가 증가하면서 다양한 형태의 건강기능식품들이 개발되어 왔고, 이들의 생체조절기능이나 질병의 회복 또는 예방에 효과가 있는 것으로 제시되었다[1, 26]. 정상적인 대사과정이나 외부 인자에 의해 생성되는 활성산소종은 다양한 질병과 노화의 원인으로 알려져 있으며 활성산소나 라디칼을 제거하여 노화를 억제시키고 질병을 예방하기 위한 목적으로 폴리페놀, 플라보노이드 및 카테킨 등과 같은 식물 유래 천연물 항산화제 개발과 이를 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[22].

이상에서 살펴본 바와 같이 제비꽃의 연구는 주로 용매 추출액을 이용하여 여러 생리활성을 규명한 보고가 대부분을 차지하지만 미생물을 이용한 제비꽃의 발효를 통해 생리활성을 높이고 기능성을 분석한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 발효식품에서 분리한 *B. methylotrophicus* CBMB205와 *L. pseudomesenteroides* NRIC1777 두 박이용하여 제비꽃 발효액의 항산화 활성,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase 및 lipase 효소에 대한 저해활성과 같은 생리활성을 발효하지 않은 제비꽃과 비교, 분석함으로써 기능성 식품 소재로 개발하기 위한 가능성을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 제비꽃은 지리산 대한당 영농조합법인에서 채집, 동정하고 건조한 제비꽃 전 초본을 제공받아 분쇄하여 사용하였다. 폴리페놀과 플라보노이드류 정량분석, 항산화 활성 측정 그리고  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase 및 lipase 등의 효소와 효소저해활성 측정에 사용된 시약과 효소들, catechin, gallic acid는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 미생물 배지류는 Difco Laboratories (Sparks, MD, USA) 제품을 사용하였다.

### 제비꽃 발효

제비꽃 발효에 사용된 미생물은 다양한 발효식품에서 분리하여 본 연구실에 보관되어 있는 균주들 중 가수분해 효소활성이 상대적으로 높은 분리주를 선택하여 (주)솔젠트에 의뢰하여 16S rRNA 유전자 염기서열분석으로 동정한 *B. methylotrophicus* CBMB205와 *L. pseudomesenteroides* NRIC1777 두 박테리아를 최종 선택하였다. 분쇄한 제비꽃 20 g과 증류수 200 ml를 1,000 ml 삼각플라스크에 넣고 121°C에서 15분간 멸균한 후 *B. methylotrophicus* CBMB205와 *L. pseudomesenteroides* NRIC1777를 *Lactobacilli* De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 배지에서 배양한 전 배양액 1%를 접종한 후 37°C, 150 rpm에서 72시간 배양하였다. 12시간 간격으로 발효액을 10 ml씩 회수하여 생균수를 측정하고 나머지는 원심분리하고 상등액을 회수하였다.

회수한 상등액을 0.2  $\mu$ m 막여과지(Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하여 Folin과 Denis 등[5]의 방법을 약간 변형하여 총 폴리페놀을 정량하였다. 정용한 시료 0.1 ml에 증류수 1.9 ml과 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.2 ml를 첨가한 후 25°C에서 3분 동안 반응시켰다. 그리고 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액을 0.4 ml를 첨가하고 혼합한 후 25°C에서 1시간 반응시키고 730 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 사용하였고 검량곡선을 이용하여 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

### 총 폴리페놀 함량

회수한 상등액을 0.2  $\mu$ m 막여과지(Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하여 Folin과 Denis 등[5]의 방법을 약간 변형하여 총 폴리페놀을 정량하였다. 정용한 시료 0.1 ml에 증류수 1.9 ml과 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.2 ml를 첨가한 후 25°C에서 3분 동안 반응시켰다. 그리고 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액을 0.4 ml를 첨가하고 혼합한 후 25°C에서 1시간 반응시키고 730 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 사용하였고 검량곡선을 이용하여 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

### 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Kim[9] 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 제비꽃 발효액 50  $\mu$ l, 멸균수 50  $\mu$ l, diethylene gly콜리알콜 col 1,000  $\mu$ l, 1 N NaOH 100  $\mu$ l를 가한 후 37°C 항온수조에서 1시간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin을 표준물질로 사용하여 검량곡선을 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

### DPPH radical 소거능

제비꽃 발효액의 라디칼 소거능은 Mesor 등[20]의 방법에 따라 측정하였다. 대조구는 시료 대신 같은 부피의 증류수를 첨가하였고 시료의 라디칼 소거능은 대조구에 대한 백분율로 나타내었다. 0.15 mM DPPH 용액 990  $\mu$ l와 10  $\mu$ l 제비꽃 발효액 시료를 혼합한 후 실온에서 30분간 반응시키고 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{DPPH free radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}}\right) \times 100$$

Control: Absorbance of distilled water at 520 nm

### ABTS radical 소거능

제비꽃 발효액의 ABTS 라디칼 소거능은 Fellegrini 등[4]의 방법에 따라 측정하였다. 7.4 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate를 암소에 하루 동안 방치하여 양이온( $\text{ABTS}^+$ )을 형성시켰다. 제비꽃 발효액 시료 10  $\mu$ l와 7 mM

ABTS 용액 190 µl를 넣고 30분 동안 암소에 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{ABTS free radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}}\right) \times 100$$

Control: Absorbance of distilled water at 734 nm

**환원력 측정**

제비꽃 발효액의 환원력은 Kim 등[10]의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.25 ml에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 0.25 ml와 10% potassium ferricyanide 0.25 ml를 첨가한 후 50°C, 20분 반응시켰다. 10% trichloroacetic acid 0.25 ml를 첨가하고 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 회수한 제비꽃 발효액 0.5 ml, 증류수 0.5 ml 및 0.1% ferric chloride 용액 0.1 ml를 혼합하고 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로 vitamin C를 사용하였다.

**α-Amylase 저해활성**

제비꽃 발효액의 α-amylase 저해활성은 Lim 등[19]의 방법을 사용하여 측정하였다. 제비꽃 발효액 125 µl에 α-amylase 효소액 62.5 µl, 200 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) 62.5 µl와 혼합하고 37°C에서 10분간 전 배양시킨 후 1% starch 용액 125 µl를 첨가하고 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응액에 48 mM DNS (3,5-dinitrosalicylic acid and 30% sodium potassium tartrate in 0.5 M NaOH) 발색시약 125 µl를 첨가하고 100°C에서 15분간 끓여 발색, 냉각시킨 후 3배의 증류수를 첨가하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\alpha\text{-Amylase inhibition activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}}\right) \times 100$$

Control: Absorbance of distilled water at 540 nm

**α-Glucosidase 저해활성**

제비꽃 발효액의 α-glucosidase 저해활성은 Tibbot와 Skadsen 등[31]의 방법에 따라 측정하였다. α-Glucosidase와 p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (pNPG)는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해하여 사용하였다. 시료 50 µl와 α-glucosidase 효소액(0.35 unit/ml) 100 µl를 혼합하고 37°C에서 10분간 전 배양시키고 1.5 mM pNPG 50 µl 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 ml 첨가하고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\alpha\text{-Glucosidase inhibition activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}}\right) \times 100$$

Control: Absorbance of distilled water at 405 nm

**Lipase 저해활성**

p-Nitrophenyl dodecanoate (pNPD)를 기질로 사용하여 제비꽃 발효액의 pancreatic lipase 활성저해를 측정하였다. 효소 활성은 pNPD가 p-nitrophenol (pNP)과 dodecanoic acid로 분해되어 생성된 pNP의 양을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 0.25 M Tris-HCl (pH 7.7), 250 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM pNPD 등으로 구성된 반응액을 혼합하고 37°C에서 5분간 예열하였다. Pancreatic lipase (3.3 mg/ml in 0.25 M Tris-HCl, pH 7.7) 50 µl와 제비꽃 발효액 시료 100 µl를 넣고 멸균수로 최종 부피를 1 ml로 맞춘 후 37°C에서 0분과 10분 동안 각각 반응시켰다. 20% SDS 500 µl을 넣어 반응을 정지시킨 후 15,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리 한 후 상등액을 회수하고 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 10분간 반응한 시료의 흡광도에서 0분간 반응한 시료의 흡광도를 뺀 값을 대조구 대비 백분율로 나타내었다[21].

**통계처리**

모든 실험은 3회 측정된 값의 평균치와 표준편차(means ± SD)로 나타내었고, SPSS package program software (version 25)를 이용하여 시료를 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 Student's t-test로써 유의성을 검증하였으며 F 값이 0.05 미만 일 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

**결과 및 고찰**

**제비꽃 발효에 따른 세포성장**

72시간 제비꽃을 발효하면서 12시간 간격으로 측정된 생균수(CFU/ml)와 pH 변화양상을 Fig. 1에 나타내었다. 발효에 사용된 두 균주는 유사하게 24시간 배양까지 생균수가 거의

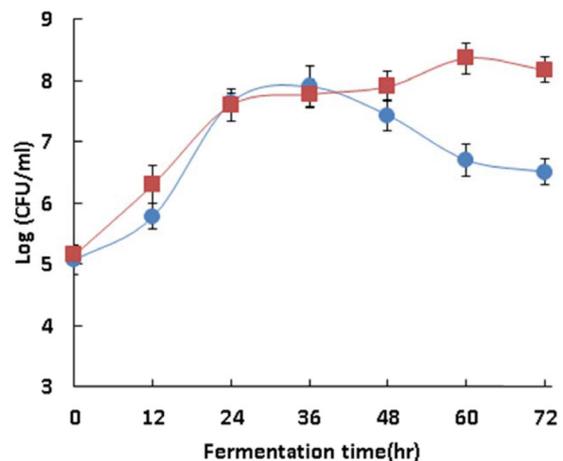


Fig. 1. Cell growth of *B. methylotrophicus* CBMB205 and *L. pseudomesenteroides* NRIC1777 during fermentation of *V. mandshurica*. The data represent means ± SD (n=3). The symbols: ■-, *Bacillus methylotrophicus* CBMB205; ●-, *Leuconostoc pseudomesenteroides* NRIC1777.

대수적으로 증가하였으나 24시간 이후 *B. methylotrophicus* CBMB205는 소폭 증가하여 약  $2.0 \times 10^8$  CFU/ml을 유지하였다. 반면에 *L. pseudomesenteroides* NRIC1777는 24시간부터 36시간 배양까지 약  $1.0 \times 10^8$  CFU/ml로 최대를 유지한 후 36시간부터  $3.0 \times 10^6$  CFU/ml로 서서히 감소하였다. Jung 등[8]은 증숙, 건조된 더덕을 *Lactobacillus rhamnosus*를 이용하여 37°C에서 7일간 정제배양으로 발효한 결과 생균수가  $10^8$  CFU/g까지 증가한 것으로 보고하였다. 본 연구에서 발효에 사용된 두 박테리아가 배양시간에 따라 생균수 변화가 나타나는 것으로 보아 제비꽃 성분을 대사적으로 발효함으로써 세포생장이 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

**총 폴리페놀 함량**

폴리페놀 화합물은 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl (-OH)기를 가진 방향족 화합물을 총칭하며 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화-환원에서 기질로 작용한다. 플라보노이드와 탄닌이 주된 식물계 폴리페놀 물질이며 충치 예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 나타낸다[2, 7]. 식물성분의 항산화 활성은 페놀성 화합물이 원인물질로 관련되어 있는 것으로 알려져 있어 gallic acid를 표준용액으로 사용하여 작성한 검정곡선으로부터 제비꽃의 발효시간에 따른 발효액의 총 폴리페놀 함량을 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 *B. methylotrophicus* CBMB205로 발효한 경우 48시간까지 증가하여 최대인 13,235 mg%(132 mg/g)로 비발효 제비꽃 함량인 9,324 mg%보다 약 1.4배 증가하였고 *L. pseudomesenteroides* NRIC1777도 48시간까지 총 폴리페놀 함량이 점진적으로 증가하여 10,967 mg%을 나타내었

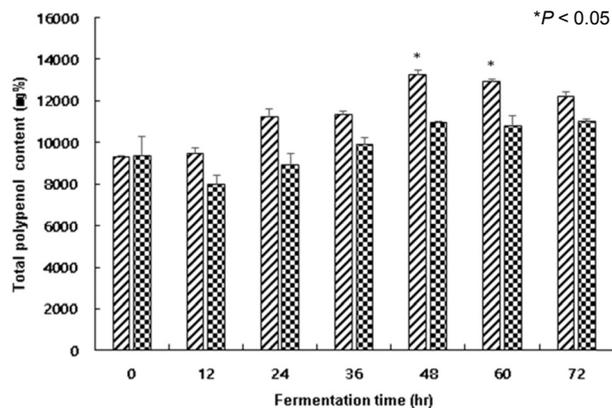


Fig. 2. Changes in total phenolic compounds of *V. mandshurica* fermented with *B. methylotrophicus* CBMB205 and *L. pseudomesenteroides* NRIC1777. Contents of total phenolic compounds of non-fermented and fermented *V. mandshurica* were determined using gallic acid as a standard. The data represent means  $\pm$  SD (n=3). Means with star are significantly different at  $p < 0.05$ . The symbols: ▨, *B. methylotrophicus* CBMB205; ▩, *L. pseudomesenteroides* NRIC1777.

으나 유의한 증가는 아닌 것으로 나타났다. 어성초를 *L. mesenteroides* 4395와 *L. sakei* 383으로 발효한 경우 총 폴리페놀 함량은 47.55 mg/g과 46.51 mg/g으로 각각 나타나 비발효 어성초 35.90 mg/g에 비해 1.3배 정도 함량이 증가되는 것으로 보고되었다[12]. 또한 아마씨를 발효한 후 농도를 달리한 폴리페놀 함량분석에서도 비 발효물 대조구 보다 약 1.8배에서 8배 증가된 결과를 보였다[24]. 금은화 추출물을 이용한 미생물 발효에서도 폴리페놀양은 발효 전보다 열수추출에서는 30.2% 증가하였고 에탄올 추출에서는 12.9% 정도 증가된 결과를 보였다[27]. 이 밖에도 미생물을 이용한 발효과정을 통해 천연물의 총 폴리페놀 함량이 증가된 연구가 다수 보고되었다[8, 15, 22, 33]. 곰팡이를 이용한 가시오가피의 발효에서는 발효 전보다 오히려 감소하였다[1]. 본 연구에 사용된 유산균보다 *Bacillus*를 사용했을 때 총 폴리페놀 함량이 소량 더 증가된 것으로 나타났는데 이는 발효 전 세포벽 및 세포 구성물질에 결합되어 있던 페놀류 및 생리활성물질들이 미생물의 발효작용에 의해 유리된 것으로 보인다[27]. 또한 페놀성 물질은 식물의 고유한 색을 부여하는 동시에 식품의 맛에 깊이 관여하며 천연물에서 얻어지는 항산화성 물질은 주로 페놀성 화합물과 플라보노이드류의 화합물로서 특히 caffeic acid, chlorogenic acid, gentistic acid 등이 강한 항산화 효과를 나타내는 것으로 알려졌다[22].

**총 플라보노이드 함량**

페놀성 화합물 분자 내 수산기가 효소 단백질 등 큰 분자와 과 수소를 공유하며 결합하기 때문에 활성산소 중용 효과적으로 제거해주면서 산화 및 노화 억제에 기능을 하며, 플라보노이드는 폴리페놀계 화합물 중 하나로 항산화 활성뿐만 아니라 다양한 생리활성 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 플라보노이드계 화합물로는 isoflavones, flavanones, flavonols, catechins, gallocatechins, chalcones, anthocyanins를 포함한다[7, 8, 10]. 제비꽃의 발효시간에 따른 발효액의 총 플라보노이드 함량 측정결과를 Fig. 3에 나타내었다. *B. methylotrophicus* CBMB205와 *L. pseudomesenteroides* NRIC1777로 72시간 발효한 경우 발효시간이 경과함에 따라 플라보노이드 함량은 꾸준히 증가하여 각각 8,030 mg%와 8,362 mg%을 나타내어 비발효 제비꽃에 비해 3.2배와 3.4배로 발효 균주에 상관없이 유사하게 증가하였다. Park 등은 아마씨를 유산균으로 발효 후 플라보노이드 함량이 발효 전 대조구에 비해 1.2배 증가된 것을 보고하였다[24]. 또한 발효더덕의 경우 비발효 대조구보다 플라보노이드 함량이 약 3.5 배 증가하였다[8]. Kim 등[12]은 어성초를 두 종의 유산균으로 서로 다른 온도에서 발효하면 발효 전에 비해 플라보노이드 함량이 최대 1.3배 증가됨을 보고하였다. 곰팡이 발효는 비 발효에 비해 2배 이상 높아지는 증가율을 보였다. 천연물에 존재하는 생리활성 물질은 대부분 페놀성 화합물이며 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산

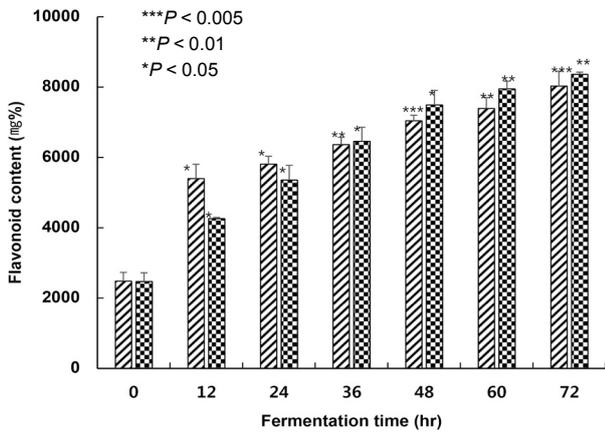


Fig. 3. Changes in total flavonoid compounds of *V. mandshurica* fermented with *B. methylotrophicus* CBMB205 and *L. pseudomesenteroides* NRIC1777. Contents of total flavonoid compounds of non-fermented and fermented *V. mandshurica* were determined using catechin as a standard. The data represent means  $\pm$  SD (n=3). Means with different stars are significantly different at  $p < 0.005$ ,  $p < 0.01$  or  $p < 0.05$ . The symbols: ▨, *B. methylotrophicus* CBMB205; ▩, *L. pseudomesenteroides* NRIC1777.

물 중 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며 항균, 항알레르기, 항산화, 항암 등의 효과 및 생리 활성을 가진다[26].

**항산화력**

항산화 활성과 연관성이 높은 측정법인 DPPH법은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질의 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로 이용되고 있다[20, 26]. DPPH법은 홀 전자를 가지고 있는 자유 라디칼 수산화기(-OH)가 결합하여 라디칼이 생성되거나 반응하는 것을 억제한다. DPPH 라디칼은 보라색을 나타내는데 항산화활성이 있는 시료와 반응하여 노란색을 띠게 되어 색의 변화로부터 항산화력의 정도를 측정하는 분석법이다[15]. 제비꽃 발효액의 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH 라디칼 소거율을 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었는데 발효 전후 유의적인 항산화 활성의 변화를 관찰할 수 없었다. 일반적으로 DPPH 라디칼 소거능은 폴리페놀 함량과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으나 본 연구결과는 다른 양상을 보였다. 가시오가피의 경우 발효 전 열매 분말은 58%의 활성을 나타내었지만 두 종의 곰팡이로 각각 발효한 열매 분말은 약 77%와 69%로 증가하였다[1]. 대마씨의 유산균 발효의 경우 비발효 대조구에 비해 발효 후 4배 정도 증가하였다[33]. 천마의 경우 발효추출물의 농도 별 소거율은 비발효 대조구에 비해 2.4~3.1배 높게 나타났다[22].

항산화 활성을 측정하는 다른 방법인 ABTS법은 potassium persulfate에 의해 산화되어 생성된  $ABTS^+$  라디칼이 제비꽃 발효액의 항산화력에 의해 환원이 되면 정록색에서 무색으로

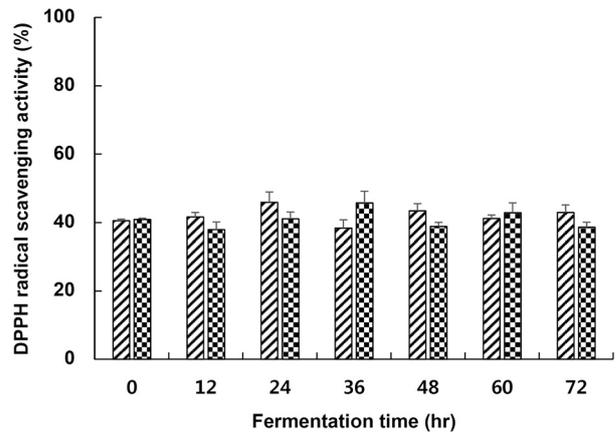


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of *V. mandshurica* fermented with *B. methylotrophicus* CBMB205 and *L. pseudomesenteroides* NRIC1777. DPPH radical scavenging activity was measured at 520 nm. The data represent means  $\pm$  SD (n=3). The symbols: ▨, *B. methylotrophicus* CBMB205; ▩, *L. pseudomesenteroides* NRIC1777.

탈색되는데 이를 흡광도 수치로 나타내어 항산화 활성을 평가할 수가 있다[10]. 제비꽃 발효액의 ABTS 라디칼 소거활성을 측정된 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 비발효 제비꽃은 37% 소거율을 나타내었으나 *Bacillus*로 60시간 발효한 제비꽃은 78%, 유산균으로 72시간 발효한 제비꽃은 60% 소거율로 비발효 대조구에 비해 각각 2.1배와 1.6배 증가하였다. 전 발효기간 동안 유산균에 비해 *Bacillus*로 발효한 것의 소거율이 훨씬 높게 나타났다. 발효한 제비꽃의 ABTS 소거율의 변화양상을 보고된 사례가 없는 관계로 직접적인 비교는 할 수 없지만 Kim 등[10]은 인삼꽃을 여러 미생물로 발효하고 소거율을 비교한 결과

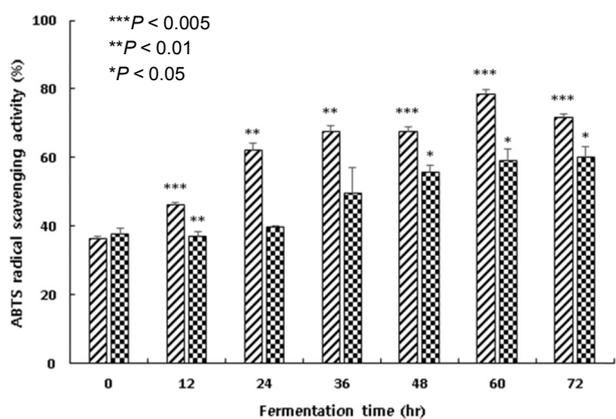


Fig. 5. ABTS radical scavenging activity of *V. mandshurica* fermented with *B. methylotrophicus* CBMB205 and *L. pseudomesenteroides* NRIC1777. ABTS radical scavenging activity was measured at 734 nm. The data represent means  $\pm$  SD (n=3). Means with different stars are significantly different at  $p < 0.005$ ,  $p < 0.01$  or  $p < 0.05$ . The symbols: ▨, *B. methylotrophicus* CBMB205; ▩, *L. pseudomesenteroides* NRIC1777.

미생물에 따라 비발효 대조구에 비해 1.6~3.8배 증가한 것을 보고하였다. 본 연구결과에서는 *Bacillus*와 유산균으로 제비꽃을 발효하면 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 증가되었으나 DPPH 라디칼 소거능은 변화가 없었고 ABTS 라디칼 소거능만 증가되었는데 이것은 폴리페놀 함량의 변화양상과 유사하게 나타났다. ABTS 라디칼과 잘 반응하는 항산화 물질이 DPPH와 반응하지 않을 수도 있는 것으로 알려져 있다. 즉, 발효에 사용된 미생물에 따라 생성된 발효물의 차이로 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능에 대한 차이를 나타낸 것으로 생각된다[10]. 한편 Kim 등은 자생식물 추출물 26종과 생약자원 추출물 14종을 대상으로 DPPH 라디칼 소거능과 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량과의 상관관계를 분석하여 신뢰수준 99.95%에서 DPPH 라디칼 소거능과 플라보노이드 함량의 관계에서만 양의 상관관계를 나타내고 DPPH 라디칼 소거능과 폴리페놀 함량 그리고 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량 간에는 상관관계가 나타나지 않음을 보고하였다[9].

**환원력**

환원력 측정의 원리는 ferric-ferricyanide (Fe<sup>3+</sup>) 혼합물이 수소를 공여하여 자유 라디칼을 안정화시켜 ferrous (Fe<sup>2+</sup>)로 전환시키는 시료의 환원력을 700 nm에서 흡광도를 측정하는 것으로 환원력이 강할수록 녹색을 띠게 되어 항산화 활성이 큰 물질일수록 높은 흡광도를 나타낸다[10, 25]. 본 연구결과에서는 *Bacillus*로 발효한 제비꽃의 경우 환원력이 72시간 발효까지 유의적으로 증가하여 비발효 제비꽃보다 1.6배 높게 나타났다으나 유산균에서는 비발효 제비꽃 대조구와 뚜렷한 차이점이 없었다(Fig. 6). Kim 등[10]은 다양한 미생물로 발효한 인삼꽃의 농도별 환원력을 조사한 결과 고초균 발효의 경우

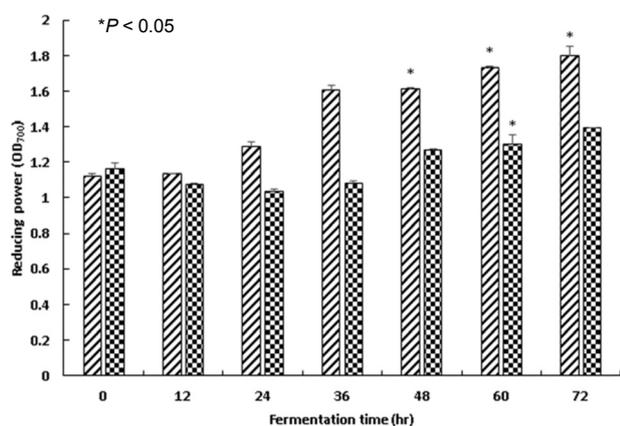


Fig. 6. Reducing power of *V. mandshurica* fermented with *B. methylotrophicus* CBMB205 and *L. pseudomesenteroides* NRIC1777. The reducing power activity was measured at 700 nm. The data represent means ± SD (n=3). Means with star are significantly different at p<0.005. The symbols: ▨, *B. methylotrophicus* CBMB205; ▩, *L. pseudomesenteroides* NRIC1777.

환원력이 증가하지 않았으나 *L. casei* 발효에서는 환원력이 1.5배 증가된 것으로 보고하였다. 이러한 결과는 *Bacillus*로 발효할 경우 환원력이 증가되나 유산균은 영향이 미미한 본 연구결과와 다른 양상을 보였다. 한편 Ahn 등[1]에 의하면 가시오가피를 잎, 줄기, 뿌리 및 과실로 나누고 *M. purpureus*, *A. oryzae* 및 *A. kawachii* 등의 곰팡이로 발효할 경우 오히려 환원력이 감소하는 것으로 나타났다. 이는 발효에 사용된 미생물의 대사특성에 따라 생성되는 발효대사산물인 항산화 물질의 차이에 기인하는 것으로 판단된다[10]. 또한 곰팡이 분말 추출물의 1% 수용성 추출물에서 Cu 환원력이 0.14 인데 비해 발효 곰팡이 분말 추출물이 0.47로 기존의 곰팡이 분말 추출물보다 환원력이 훨씬 크게 증가한 것이 보고되었다[26]. 또한 곰팡이 분말의 1% 수용성 추출물의 Cu 환원력은 0.14로 나타났으나 고초균으로 발효 한 곰팡이 추출물은 0.47로서 발효 전 곰팡이 분말 추출물에 비해 환원력이 훨씬 증가된 것으로 나타났다 [26].

**α-Amylase 저해활성**

α-Amylase는 탄수화물의 α-D-(1,4)-glucan 결합을 분해하는 효소로서 사람, 동물, 미생물, 곤충들의 탄수화물대사에 꼭 필요한 효소이다. 소장의 α-amylase를 저해함으로써 포도당의 흡수를 지연시킬 수 있어 α-amylase의 혈당수치 상승억제 지표로 사용한다[17]. 제비꽃 발효시간에 따른 α-amylase 활성에 대한 저해능을 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 *Bacillus*와 유산균 모두 24시간 동안에는 저해율의 변화가 거의 없었으나 *Bacillus*의 경우 24시간 이후부터 급격히 증가하여 72시간 발효 시 60% 저해율로 비 발효 대조구보다 6배 높게 나타났다으나 유산

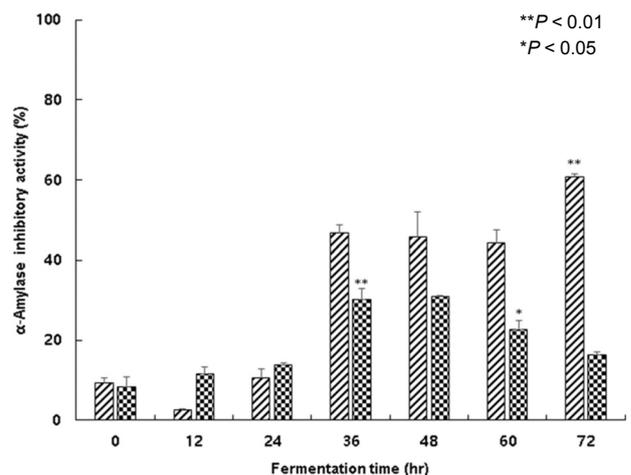


Fig. 7. Effect of fermented *V. mandshurica* on α-amylase activity. α-Amylase activity was measured at 540 nm. The data represent means ± SD (n=3). Means with different stars are significantly different at p<0.01 or p<0.05. The symbols: ▨, *B. methylotrophicus* CBMB205; ▩, *L. pseudomesenteroides* NRIC1777.

균에서는 발효시간에 따른 저해율 증가율이 낮았으며 36, 48 시간 배양 시 30% 저해율을 보여 비 발효 대조구에 비해 3배 증가되어 상대적으로 *Bacillus*가 효율이 더 높았다. 이상의 결과로부터 제비꽃의 발효를 통해  $\alpha$ -amylase 저해활성이 증가됨을 확인할 수 있었다.

**$\alpha$ -Glucosidase 저해활성**

$\alpha$ -Glucosidase는 소장 상피세포나 brush-border membrane에 존재하는 효소로서 이당류나 다당류 탄수화물이 소화, 흡수되기 위한 상태인 단당류인 포도당으로 가수분해하는 역할을 한다[25].  $\alpha$ -Glucosidase에 대한 저해율은 탄수화물 식이 후 혈당상승을 억제할 수 있어 항 당뇨활성 측정법으로 이용된다. 제비꽃 발효액의  $\alpha$ -glucosidase 저해율은 Fig. 8에 나타내었다. *Bacillus*의 경우 48시간부터 75% 저해율을 보여 비 발효 대조구에 비해 2.9배 증가되었으며 유산균에서는 증가되는 정도가 상대적으로 낮았으나 72시간 발효에서 비 발효 대조구보다 2.6배 높게 나타났다. 72시간 발효 동안 *Bacillus*가 유산균보다 더 높은  $\alpha$ -glucosidase 저해율을 나타내었다. Jeong 등[7]에 의하면 원료인삼 및 가열살균 된 인삼에서는  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 없었으나 상황버섯 균사체 인삼 배양물에서는 8.92%에서 92.51%로 높은 저해활성을 나타내었다. Jung 등[8]이 보고한 바에 따르면 *L. rhamnosus*로 미증숙된 더덕의 발효액에 대한 EC<sub>50</sub> 값이 비 발효 대조구에 비해 2.2배 감소하여 본 연구결과와 유사하게 증가되는 경향을 보였다. Yoon 등은 4종의 유산균으로 대마씨를 발효하고  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성을 조사한 결과 대부분 5% 내외 증가 또는 감소하는 것으로 보고하였다[33].

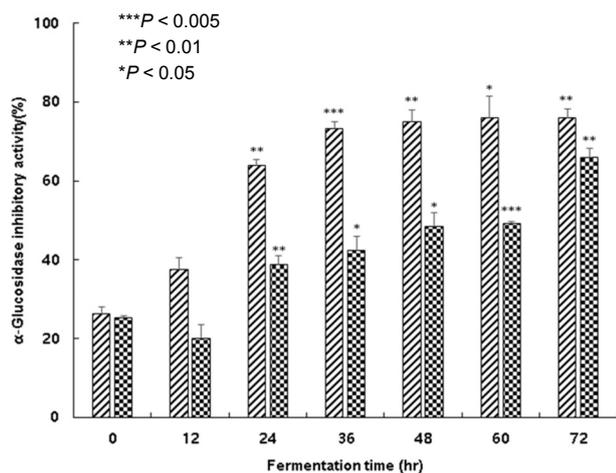


Fig. 8. Effect of fermented *V. mandshurica* on  $\alpha$ -glucosidase activity.  $\alpha$ -Glucosidase activity was measured at 405 nm. The data represent means  $\pm$  SD (n=3). Means with different stars are significantly different at  $p < 0.005$ ,  $p < 0.01$  or  $p < 0.05$ . The symbols: ▨, *B. methylotrophicus* CBMB205; ▩, *L. pseudomesenteroides* NRIC1777.

**Lipase 저해활성**

Pancreatic lipase는 triacylglycerol (TAG)를 2-monoacylglycerol과 지방산으로 분해하는 효소로 지방의 소화를 진행하고 장내 상피세포가 분해하는 산물을 흡수하도록 돕는다. 이처럼 췌장의 리파아제에 의해 분해되어 흡수되기 때문에 리파아제 효소의 활성을 저해할 경우 지방은 흡수되지 않고 대변으로 나오게 된다. 따라서 췌장 리파아제의 활성 저해능은 시료의 항 비만 활성을 예측하기 위한 유용한 시험법이다 [11, 21, 32]. 제비꽃의 발효 동안 lipase에 대한 저해활성을 측정된 결과는 Fig. 9와 같다. *Bacillus*로 발효한 제비꽃은 비 발효 대조구에 비해 최대 3.4배, 유산균의 제비꽃 발효에서는 대조구보다 최대 2.8배 높게 나타났다. 전 발효시간 동안 *Bacillus*는 유산균보다 훨씬 높은 저해율을 나타내었다. 따라서 *B. methylotrophicus* CBMB205를 사용하여 제비꽃을 발효하면 항 비만 효능을 보유한 기능성 식품의 개발에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 미생물 발효기술을 이용하여 제비꽃의 기능성을 증진하여 기능성 식품이나 화장품 첨가제로 사용하기 위한 기초 연구를 수행하기 위한 일환으로 *B. methylotrophicus* CBMB205와 *L. pseudomesenteroides* NRIC1777 분리주를 이용하여 제비꽃을 발효하고 항산화능과 연관이 있는 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량, 항산화 활성 그리고  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase 및 췌장 리파제에 대한 저해활성 등을 대조구인 발효하지 않은 제비꽃과 비교, 분석하였다. *B. methylotrophicus* CBMB205로 발효한 경우 DPPH 라디칼 소거능만 대조구와 차이가 없었고 나머지 시험항목에 대해서는 대조구에 비해 여러 생리활성과 이화학적 특성이 훨씬 높아진 것을 확인하였

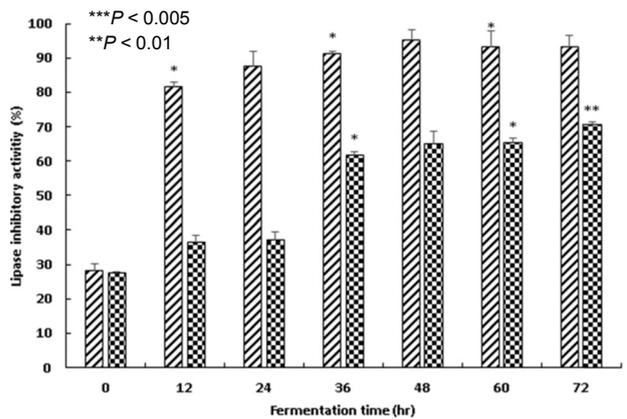


Fig. 9. Changes in lipase inhibition activity of *V. mandshurica* fermented with *B. methylotrophicus* CBMB205 and *L. pseudomesenteroides* NRIC1777. Inhibitory activity on pancreatic lipase was measured at 412 nm. The data represent means  $\pm$  SD (n=3). Means with different stars are significantly different at  $p < 0.005$  or  $p < 0.01$ . The symbols: ▨, *B. methylotrophicus* CBMB205; ▩, *L. pseudomesenteroides* NRIC1777.

을 뿐만 아니라 *L. pseudomesenteroides* NRIC1777보다 거의 모든 항목에서 우수한 효과를 나타내었다. 따라서 *B. methylo-trophicus* CBMB205로 발효한 제비꽃 발효산물에서 기능성을 나타내는 화합물을 분리하고 동정하고 항 비만이나 항 당뇨 효능을 검증하기 위한 동물실험과 같은 후속 연구의 진행이 필요할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 2017~2018년도 창원대학교 자율연구과제 연구비의 지원으로 수행된 결과임.

### References

- Ahn, H. Y., Park, K. R., Kim, Y. R., Cha, J. Y. and Cho, Y. S. 2013. Chemical characteristics in fermented cordycepin-enriched *Cordyceps militaris*. *J. Life Sci.* **23**, 1032-1040.
- Choi, B. D., Park, C. S. and Joo, E. Y. 2008. Physiological activities of Korean and Chinese *Viola mandshurica* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 1101-1108.
- Choi, M. H. and Park, I. S. 2016. Antioxidant effect of *Viola mandshurica* W. Becker on the high fat diet-induced renal oxidative stress. *J. Physiol. Pathol. Kor. Med.* **30**, 250-256.
- Fellegrini, N. Re, R. Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2, 2'-azino bis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol.* **299**, 379-389.
- Folin, P. and Denis, W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* **12**, 239-249.
- Jeon, G. I., Yoon, M. Y., Park, H. R., Lee, S. C. and Park, E. J. 2009. Neuroprotective activity of *Viola mandshurica* extracts on hydrogen peroxide-induced DNA damage and cell death in PC12 cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1171**, 576-582.
- Joung, E. M., Kim, H. Y., Hwang, I. G., Jeong, J. H., Yu, K. W., Lee, J. S. and Jeong, H. S. 2010. Changes of antioxidant on cultured ginseng with mushroom mycelia during cultivation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 1346-1352.
- Jung, L. S., Yoon, W. B., Park, S. J., Park, D. S. and Ahn, 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.
- Kim, E. J., Choi, J. Y., Yu, M. R., Kim, M. Y., Lee, S. H. and Lee, B. H. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 337-342.
- Kim, K. H., Kim, D. M., Byun, M. W., Yun, Y. S. and Yook, H. S. 2013. Antioxidant activity of *Panax ginseng* flower-buds fermented with various microorganisms. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 663-669.
- Kim, Y. J., Kim, B. H., Lee, S. Y., Kim, M. S., Park, C. S., Rhee, M. S., Lee, K. H. and Kim, D. S. 2006. Screening of medicinal plants for development of functional food ingredients with anti-obesity. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 221-226.
- Kim, Y. M., Jeong, H. J., Chung, H. J., Seong, J. H., Kim, H. S., Kim, D. S. and Lee, Y. G. 2016. Anti-oxidative activity of the extracts from *Houttuynia cordata* Thunb. fermented by lactic acid bacteria. *J. Life Sci.* **26**, 468-474.
- Kwak, Y. J., Kim, K. S., Kim, K. M., Yu, H. Y., Chung, E. S., Kim, S. J., Cha, J. Y., Lee, Y. C. and Lee, J. H. 2011. Fermented *Viola mandshurica* inhibits melanogenesis in B16 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 841-847.
- Lee, B. B., Park, S. R., Han, C. S., Han, D. Y., Park, E. J., Park, H. R. and Lee, S. C. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 405-409.
- Lee, J. H., Yoon, Y. C., Kim, J. K., Park, Y. E., Hwang, H. S., Kwon, G. S. and Lee, J. B. 2018. Antioxidant and whitening effects of the fermentation of barley seeds (*Hordeum vulgare* L.) using lactic acid bacteria. *J. Life Sci.* **28**, 444-453.
- Lee, M. R., Han, C. S., Han, D. Y., Park, E. J., Lee, S. C. and Park, H. R. 2008. Protective effect of neuronal cell on glutamate-induced oxidative stress from *Viola mandshurica* extracts. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **51**, 79-83.
- Lee, M. Y., Yuk, J. E., Kwon, O. K., Kim, O. K., Oh, S. R., Lee, H. K. and Ahn, K. S. 2010. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of *Viola mandshurica* W. Becker (VM) ethanolic (EtOH) extract on airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *J. Ethnopharmacol.* **127**, 159-164.
- Lee, Y. S. and Kim, N. W. 2008. Comparative analysis of the amino acids and effective components from *Viola mandshurica*. *Kor. J. Food Preserv.* **15**, 699-705.
- Lim, C. S., Li, C. Y., Kim, Y. M., Lee, W. Y. and Rhee, H. I. 2005. The inhibitory effect of *Cornus walteri* extract against  $\alpha$ -amylase. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 103-108.
- Mesor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., dos Santos, T. C., Coube, C. S. and Leitão, S. G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* **15**, 127-130.
- Park, J. A., Jin, K. S., Lee, J. Y., Kwon, H. J. and Kim, B. W. 2014. Anti-oxidative and anti-obesity effects of *Amonum cardamomum* L. extract. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 249-257.
- Park, M. R., Yoo, C., Chang, Y. N. and Anh, B. Y. 2012. Change of Total Polyphenol content of fermented *Gastrodia elata* Blume and radical scavenging. *Kor. J. Plant Res.* **25**, 379-386.
- Park, S. H., Sung, Y. Y., Nho, K. J., Kim, D. S. and Kim, H. K. 2017. Effects of *Viola mandshurica* on atherosclerosis and hepatic steatosis in ApoE via the AMPK pathway. *The Am. J. Chin. Med.* **45**, 1-16.
- Park, Y. E., Kim, B. H., Yoon, Y. C., Kim, J. K., Lee, J. H., Kwon, G. S., Hwang, H. S. and Lee, J. B. 2018. Total polyphenol contents, flavonoid contents, and antioxidant activity of roasted-flaxseed extracts based on lactic-acid bacteria fermentation. *J. Life Sci.* **28**, 547-554.
- Sa, Y. J., Kim, J. S., Kim, M. O., Jeong, H. J., Yu, C. Y., Park,

- D. S. and Kim, M. J. Comparative study of electron donating ability, reducing power, antimicrobial activity and inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by *Sorghum bicolor* extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **42**, 598-604.
26. Sim, S. Y., Ahn, H. Y., Seo, K. I. and Cho, Y. S. 2018. Physicochemical properties and biological activities of *Protaetia brevitarsis seulensis* larvae fermented by several kinds of micro-organisms. *J. Life Sci.* **28**, 827-834.
27. Shin, J. H. and Yoo, S. K. 2012. Antioxidant properties in microbial fermentation products of *Lonicera japonica* Thunb. extract. *J. East Asian Soc. Diet. Life* **22**, 95-102.
28. Sung, Y. Y., Kim, D. S., Kim, S. H. and Kim, H. K. 2014. *Viola mandshurica* ethanolic extract prevents high-fat-diet-induced obesity in mice by activating AMP-activated protein kinase. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **38**, 41-50.
29. Sung, Y. Y., Kim, D. S., Kim, S. H. and Kim, H. K. 2015. The nutritional composition and anti-obesity effects of an herbal mixed extract containing *Allium fistulosum* and *Viola mandshurica* in high-fat-diet-induced obese mice. *BMC Complement. Altern. Med.* **15**, 370-379.
30. Sung, Y. Y., Kim, D. S., Kim, S. H. and Kim, H. K. 2017. Anti-obesity activity, acute toxicity, and chemical constituents of aqueous and ethanol *Viola mandshurica* extracts. *BMC Complement. Altern. Med.* **17**, 297-306.
31. Tibbot, B. K. and Skadsen, R. W. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin inducible, putative  $\alpha$ -glucosidase gene from barley. *Plant Mol. Biol.* **30**, 229-241.
32. Woo, S. E., Kwon, J. H., Yang, S. Y., Park, H. Y. and Kim, H. K. 2008. Development of egg yolk antibody specific to the pancreatic lipase domain for anti-obesity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 299-306.
33. Yoon, Y. C., Kim, B. H., Kim, K. J., Lee, J. H., Park, Y. E., Kwon, G. S., Hwang, H. S. and Lee, J. B. 2018. Verification of biological activities and tyrosinase inhibition of ethanol extracts from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) fermented with lactic acid bacteria. *J. Life Sci.* **28**, 688-696.

## 초록 : 미생물 분리주를 이용한 제비꽃 발효액의 생리활성 변화

이지영<sup>2\*</sup> · 오수빈<sup>1\*</sup> · 최낙식<sup>3</sup> · 박용운<sup>4</sup> · 강대욱<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>창원대학교 생명보건학부, <sup>2</sup>창원대학교 대학원 생명공학협동과정, <sup>3</sup>케이 프로텍, <sup>4</sup>지리산대한당영농조합법인)

미생물의 발효를 이용하여 제비꽃의 효능과 기능성을 증진시켜 응용을 높이기 위한 목적으로 발효식품에서 분리하고 동정한 *B. methylotrophicus* CBMB205와 *L. pseudomesenteroides* NRIC1777 두 미생물을 이용하여 72시간 제비꽃을 발효하면서 12시간 마다 발효액의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량, 항산화력, 환원력, 혈당조절과 관련이 있는  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase 저해활성, 비만관련 췌장 리파제 저해활성 등을 측정하고 대조구인 비발효 제비꽃과 비교, 분석하였다. 총 폴리페놀 함량의 경우 *Bacillus*와 유산균은 대조구에 비해 각각 1.4배 및 1.17배 증가되었고, 총 플라보노이드 함량은 각각 3.2배와 3.4배 증가되었다. 항산화력 비교에서 DPPH 라디칼 소거능은 모두 변화가 없었으나 ABTS 라디칼 소거능의 경우 2.1배 및 1.6배 증가된 것으로 나타났다. 환원력의 경우 *Bacillus*는 1.6배 높게 나타났으나 유산균은 대조구와 유의적인 차이점이 없었다.  $\alpha$ -Amylase의 경우 *Bacillus*와 유산균은 대조구보다 각각 6배와 3배의 저해율을 보였고  $\alpha$ -glucosidase는 2.9배와 2.6배의 저해활성을 나타내었다. 췌장 리파제에 대해서 *Bacillus*와 유산균은 대조구에 비해 3.4배와 2.8배 높은 저해활성을 보였다. *Bacillus*와 유산균으로 발효한 제비꽃은 DPPH 라디칼 소거능을 제외하고 시험한 모든 항목에서 대조구보다 우수한 결과를 얻었다. 따라서 미생물 발효를 통해 항산화력과 관련이 있는 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 증가되고 ABTS 라디칼 소거능,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase 및 췌장 리파제에 대한 저해능 등이 대조구에 비해 높아진 결과를 토대로 건강기능식품이나 화장품 첨가제 등으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.