

Pectolarin 고함유 곤드레 미세분말의 항산화 및 항비만 활성

†박성진 · 김현덕* · 이윤환**

한림성심대학교 관광외식조리과 교수, *(주)찬누리라이프 이사, **(주)찬누리라이프 대표이사

Antioxidant and Anti-Obesity Properties of Pectolarin-rich *Cirsium setidens* Nakai Fine Powder

†Sung-Jin Park, Hyun-Duk Kim* and Yoon-Hwan Lee**

Professor, Dept. of Tourism Food Service Cuisine, Hallym Polytechnic University, Chuncheon 24210, Korea

*Director, Channuri Life Co. Ltd., Seoul 03958, Korea

**CEO, Channuri Life Co. Ltd., Seoul 03958, Korea

Abstract

The aim of this study was to evaluate the basic data of *Cirsium setidens* Nakai fine powder (FPC), which will then be used in the development of functional food items. We measured and evaluated the level of pectolarin content, phenol content, flavonoids content, antioxidants and anti-obesity properties of FPC. Our results from the study showed that the pectolarin, phenol, and flavonoids contents of FPC measured at 10.95 ± 0.15 mg/g, 12.92 ± 0.18 mg gallic acid equivalent (GAE)/g and 26.47 ± 0.77 mg rutin equivalent (RE)/g, respectively. The exhibited antioxidant activity of FPC increased significantly depending on the dosage, and additionally, FPC did not show any cytotoxicity up to the dosage level of 500 μ g/mL. During adipocyte differentiation, FPC significantly inhibited ROS production and lipid accumulation, compared with the control substance. These results suggest that FPC could be considered a promising resource of natural antioxidants and could serve a variety of health-improving roles in the production of functional food ingredients.

Key words: *Cirsium setidens* Nakai, pectolarin-rich powder, antioxidant, 3T3-L1, ROS production

서론

웰빙에 대한 관심이 높아지면서 식용으로 이용되는 청정 지역의 산채에 대한 관심도가 증가되고 있으며, 독특한 향과 맛을 나타내는 산채에 함유되어 있는 기능성 성분들의 생리 활성이 밝혀지고 있으며 새롭게 식품 및 약리학적 가치가 부각되고 있다. 소비자의 소비패턴이 자연식품을 선호하는 패턴으로 변화하고 산채의 기능적 특성이 알려지면서 고소득 작목으로 인식되면서, 식품산업이 친환경적으로 급속히 성장함에 따라 산채 또한 여러 가지 특징을 겸비한 식품으로 알려지고 있다(Hwang 등 2014). 대사증후군, 즉 비만, 당뇨, 고지혈증, 관련 질환들이 지속적으로 증가함에 따라 이러한 질병을 개선하고자 하는 연구들이 많이 지속되고 있다(Miquel

등 1989). 만성질환인 대사증후군은 단기적으로 의약품에 의한 치료보다는 예방의학적 관리가 중요하며 이에 따라 친환경적인 소재를 활용한 건강기능식품의 개발이 지속적으로 연구되고 있다(You 등 2010; Han 등 2019). 고려영경귀라고도 불리는 곤드레(*Cirsium setidens*)는 해발 700 m 이상의 고지에서 자생하는 국화과의 다년생 초본으로, 요리에 사용되는 식재료로 한방에서 여러 증상 즉, 고혈압, 부종 등에 사용되어 왔다(Lee 등 2002). 곤드레의 잎에는 높은 탄수화물의 함량과 필수지방산이 함유되어 있으며, 칼륨 등 무기질이 함유되어 있다(Lee 등 2006). 뿐만 아니라, 플라보노이드의 일종인 pectolarin(Park 등 2020)을 비롯하여 luteolin, hispidulin, apigenin 등 여러 종류를 함유하고 있는 것으로 알려져 있어(Thao 등 2011), 기능적인 특성의 활성연구가 활발히 이루어

† Corresponding author: Sung-Jin Park, Professor, Dept. of Tourism Food Service Cuisine, Hallym Polytechnic University, Chuncheon 24210, Korea. Tel: +82-33-240-9234, Fax: +82-33-240-9119, E-mail: sjpark@hsc.ac.kr

지고 있다(Ahn 등 2014; Chung 등 2016; Lee 등 2016). Noh 등(2013)은 간 지방축적의 억제에 고려영양제가 효과가 있다고 보고하였다. 곤드레의 여러가지 기능적 활성이 알려지면서 기능성식품 소재로의 활용이 증가되고 있다(Lee 등 2017). 유용물질의 추출이 용이하고, 색이나 향기 등의 파괴를 줄이는 소재의 미세분말은 물질 표면적을 최대화하여 용해도를 높여 식품 및 바이오산업에서 활용도가 증진되는 장점을 가지고 있으며, 분말의 분쇄 중 저온을 유지함으로써 색감과 향기를 최대한 유지시켜 주는 장점이 있어 미세 분말을 활용한 음료의 경우, 목 넘김, 복용 편이성, 건강기능성이 강조됨으로써 판매가 지속적으로 상승하고 있다(Park 등 1996). 미세 분말화 기술 개발은 용해도 증진을 통해 체내 흡수율을 높이는 기능성 식품소재나 식의약 소재 등 고부가가치 소재로의 전환이 가능 할 것으로 기대된다(Kim 등 2002a; Jung & Lee 2007).

따라서, 본 연구에서는 공기분급 곤드레 미세분말의 건강 기능식품 소재화시 기초를 제공하고자 pectolinarin 함량분석과 이에 따른 곤드레 미세분말의 항산화, 총 플라보노이드 및 총페놀 함량 및 항미반 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

본 실험에 이용한 건조 곤드레 원료는 (주)정선약초백화점(Jeongseon, Korea)으로부터 구입하였다. 건조 곤드레를 미세 분쇄/분급 처리하기 전, 분쇄 효율을 높이고자 MS-200 분쇄기(Myeongseong Co. Ltd, Chengju, Korea)를 사용하여 조분쇄한 후 열풍건조기로 60°C에서 8시간 재건조를 실시하였다. 건조된 조분쇄물은 Soro-100N 미세분쇄/분급기(Sorobio Co. Ltd, Jeonju, Korea)를 이용하여 3,500 RPM으로 곤드레 미세 분쇄/분급(시료투입량 10 kg/hr)을 실시하여 pectolinarin 고함유 곤드레 분말을 제조하였다. 조분쇄된 곤드레 시료 투입량(7.5 kg) 대비 곤드레 분말의 회수량은 1.7 kg(22.7%)으로 나타났다.

DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), AAPH(2,2'-azobis(2-methylpropionamide), dihydrochloride), trifluoroacetic acid, NAC(N-acetyl-L-cysteine), insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, nitroblue tetrazolium, Oil Red O, isopropanol 등은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, pectolinarin은 Carbosynth(Compton, Berkshire, UK)에서 구입하여 사용하였다. Acetonitrile은 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서, DMSO(dimethyl sulfoxide)는 Junsei Chemical(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. DMEM, bovine serum, fetal bovine serum, penicillinstreptomycin, phosphate-buffered saline

및 trypsin-EDTA는 Gibco(Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. Pectolinarin 분석

곤드레 미세분말의 pectolinarin 분석은 Oh 등(2015)의 방법을 변형하여 실시하였다. 분석을 위한 조건은 Table 1과 같으며 분석용 column은 Capcell Pak C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm, Shiseido Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다.

3. 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 페놀 및 총 플라보노이드 함량은 Kim 등(2011)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 총 페놀 함량은 곤드레 시료액과 Follin-Ciocalteu's phenol reagent(2%) 및 10% Na₂CO₃를 1:1:1의 비율로 혼합한 후 1시간 동안 반응시킨 후 750 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하고 gallic acid의 표준곡선을 이용하여 총 페놀 함량을 구하였다. 총 플라보노이드 함량은 각 곤드레 시료액 0.5 mL에 95% ethanol 1.5 mL, 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL, 증류수 2.8 mL를 첨가하여 상온에서 30일 동안 반응시킨 후 microplate reader로 415 nm에서 흡광도를 측정한 후 rutin 표준곡선을 이용하여 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

4. DPPH radical 소거활성 평가

DPPH radical 소거능은 전자 전달에 의한 항산화활성을 측

Table 1. HPLC condition for analysis of pectolinarin

Analytical condition			
Column temp.	40°C		
HPLC	Waters 2695 HPLC system		
Detector	Waters 996 PDA Detector (340 nm)		
Column	Shiseido Capcell Pak C ₁₈ UG 120 (4.6×250 mm, 5.0 μm)		
	Time (min)	A ¹⁾	B ²⁾
	0	70	30
	6	70	30
Mobile phase	11	53	47
	22	53	47
	25	70	30
	30	70	30
Injection vol.	10 μL		
Flow rate	1.0 mL/min		

¹⁾ 0.05% trifluoroacetic acid in DDW.

²⁾ 0.05% trifluoroacetic acid in acetonitrile.

정하는 방법으로, 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 전자나 수소를 받아 환원되어 안정한 분자를 형성하게 될 때, 보라색이 탈색되어지는 원리를 이용하여 다양한 천연소재로부터 항산화물질을 탐색하기 위해 많이 이용되고 간단하게 짧은 시간에 항산화 능력을 측정할 수 있는 방법이다. 시료 200 μ L와 0.4 mM DPPH 시약 800 μ L를 혼합하여 10분간 어두운 곳에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Kim 등 2002b). 다음 식에 의해 시료의 DPPH radical 소거능을 구하였다.

$$\text{DPPH radical 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

5. ABTS radical 소거활성 평가

ABTS 라디칼을 이용한 항산화능의 측정은 샘플 내의 항산화 물질에 의해 ABTS free 라디칼이 제거되어 청록색이 탈색되는 원리이다(Cho 등 2013). 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate 용액을 16시간 동안 암소에서 반응시키고 radical을 발생 후 96-well microplate에 시료 10 μ L와 ABTS 용액 290 μ L를 가해 혼합한 후 6분간 어두운 곳에서 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 구하고 소거활성을 계산하였다(Re 등 1999). 다음 식에 의해 시료의 ABTS radical 소거능을 구하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능} = \left(1 - \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

6. FRAP assay

FRAP 활성 측정은 전자 공여능을 측정하지 않고 산화 및 환원 반응을 측정방법으로 항산화 물질이 노란색 계열의 Fe(III)-TPTZ를 푸른색 계열의 Fe(II)-TPTZ로 환원시키는 원리를 이용한 방법(Student 등 1980)으로 acetate buffer(pH 3.6, 300 mM):TPTZ(10 mM) · FeCl₃ · 6H₂O(20 mM)를 각각 제조하여 10:1:1의 비율로 섞어 FRAP 용액을 제조하였다. 시료 50 μ L, 1.5 mL의 FRAP 및 150 μ L의 증류수를 혼합하여 실온에서 10 min 동안 보관 후, 593 nm에서 흡광도를 구하였다(Benzie & Strainin 1996).

7. Reducing power

Reducing power activity는 시료 0.1 mL, sodium phosphate buffer(0.2 M) 0.5 mL, potassium ferricyanide(1%) 0.5 mL를 혼합한 후 20분간 50°C에서 반응시키고 trichloroacetic acid (10%) 0.5 mL를 가한 후 10분간 원심 분리(12,000 rpm)한 후, 0.5 mL의 상등액에 증류수 0.5 mL, iron(III) chloride(0.1%) 0.1

mL를 가하여 10분간 상온에서 반응시키고 700 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하고(Cho 등 2011), 구한 값을 이용하여 환원력을 비교하였다.

8. 세포독성평가(XTT assay)

3T3-L1 지방세포에 대한 시료의 세포 독성평가는 Kim 등 (2011a)의 방법에 따라 XTT assay Kit(WelGene, Seoul, Korea)로 측정하였으며 분화 6일이 되었을 때 XTT assay를 진행하였다. 1 mL의 XTT reagent와 20 μ L PMS reagent를 혼합하여 working solution을 준비하고, 피펫으로 96-well medium 부피의 20% 되는 양을 well에 가한 후 흔들어 혼합해 주었다. 37°C의 CO₂ 배양기에서 배양한 후, microplate reader(Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450 nm 흡광도 값에서 690 nm의 흡광도 값을 뺀 결과 값으로 세포 독성을 계산하였다.

9. Oil Red O staining을 통한 지방축적량

지방축적량을 측정하고자 지방 세포에 곤드레 시료를 처리하여 분화된 3T3-L1 세포에 500 μ L의 formalin 용액(10%)을 가하여 상온에서 5분 동안 방치하고 제거한 후, 같은 양의 formalin 용액으로 분화된 3T3-L1 세포를 상온에서 1시간 이상 방치하여 고정시킨 후 isopropanol 용액(60%) 500 μ L로 세척하고 세포를 완전히 건조시킨 후, 만들어 놓은 Oil Red O (ORO:증류수=6:4) 용액으로 세포 내 축적된 지방성분들을 염색하였다. 증류수를 이용하여 세포를 세척한 후, isopropanol을 이용하여 지방 성분과 결합한 ORO를 용출시키고 490 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

10. NBT assay를 이용한 ROS 함량 측정

ROS 생성량을 측정하기 위하여 멸균 PBS(phosphate buffer saline, pH 7.4)로 세포 배양액을 세척하고 NBT 용액(0.2%) 200 μ L를 첨가하여 90분간 CO₂ 배양기에서 반응시키고 DMSO:1 N KOH=7:3의 비율로 혼합한 KOH 용액을 사용하여 formazan을 용출시키고 같은 양의 증류수를 가하여 섞어 준 후 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

11. Western blot 분석

100 μ plate에서 배양한 3T3-L1 세포에 곤드레 시료를 처리하여 지방세포 분화시킨 후, 세포를 cell lysis buffer(0.1% SDS, 1 mM pepstatin, 150 mM sodium chloride, 50 mM Tris-HCl, 0.25% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride)에 용해시켜 4°C에서 30분 동안 처리하였다. 이후 12,000 \times g에 20분간 원심분리 하고 얻은 세포용출액은 Bradford protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules,

CA, USA)을 이용하여 단백질 농도를 결정하였다. 30 µg의 세포용출액을 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)에서 전기영동 후 단백질을 전기적으로 polyvinylidene difluoride membrane(Immun-Blot PVDF membrane, 0.2 µM; Bio-Rad Laboratories, Inc.)으로 전이시켰다. 비특이적 결합을 억제하기 위하여 5% skim milk 또는 3% bovine serum albumin을 함유한 Tris-buffered saline을 이용하였으며, 목적 단백질에 대한 1차 항체 및 2차 항체를 처리 후 Super-Signal West Pico Chemiluminescence(Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 목적단백질을 검출하였다. Western blot의 band는 Chemi Doc image software 5.2.1(Bio-Rad Laboratories, Inc.)을 사용하여 관찰하였다.

12. 통계처리

모든 실험은 3회 반복실험을 통해 평균±표준편차로 나타내었으며, 실험 결과 값은 SAS version 9.4(SAS institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 통계처리하였다. One-way ANOVA 검정을 통해 유의성 분석을 실시하였으며 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의성은 $p<0.05$ 수준에서 검정하였다. 항산화 성분과 항산화 활성의 상관성 분석은 Pearson correlation을 수행하여 $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ 수준에서 유의성을 검증하였고 상관계수를 구하였다.

결과 및 고찰

1. 곤드레 미세분말의 pectolarin 함량, 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량

식물에 널리 분포되어 있다고 잘 알려진 플라보노이드는 황색의 물질로 항산화활성 및 생리활성 기능을 가진 물질이다. 플라보노이드는 항비만, 항염증에 효과가 있을 뿐만 아니라 분화억제 및 항산화효과가 있음이 보고되었다(Hsu & Yen 2007). 곤드레 미세 분말의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 분석한 결과(Table 2), 곤드레 미세분말의 pectolarin 함

Table 2. Pectolarin, total phenol and total flavonoid contents of FPC (*Cirsium setidens* Nakai fine powder)

Sample	Pectolarin (mg/g)	Total phenol (mg GAE ¹⁾ /g)	Total flavonoid (mg RE ²⁾ /g)
Control	4.24±0.02 ^b	11.35±0.18 ^b	18.31±0.18 ^b
FPC	10.95±0.15 ^a	12.92±0.18 ^a	26.47±0.77 ^a

¹⁾ GAE: gallic acid equivalent.

²⁾ RE: rutin equivalent.

^{a,b}Different superscripts in the same column are significant differences ($p<0.05$).

량, 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량은 각각 10.95±0.15 mg/g, 12.92±0.18 mg GAE/g 및 26.47±0.77mg RE/g으로 나타났다. Lee 등(2015)의 연구에 의하면 곤드레 나물을 90°C에서 4시간 동안 열수추출하여 제조한 곤드레 열수 추출물에는 pectolarin 함량이 약 2.81±0.01 mg/g이 함유되어 있다고 보고하여 본 연구에서 미세분말화한 곤드레 시료의 pectolarin의 함량이 약 3.89배 많은 것으로 나타났다.

2. 곤드레 미세분말의 항산화능 측정

비타민 C 와 E 등에 의해 환원되어 보라색이 탈색되어지는 원리로 천연소재로부터 항산화 물질을 탐색하는데 사용되고 있는 DPPH radical은 비교적 간단하게 짧은 시간 내에 항산화능력을 측정할 수 있어 널리 이용되고 있는 방법이다(Que 등 2006). 곤드레 미세분말의 DPPH radical 측정 결과는 Fig. 1A와 같다. 곤드레 미세분말의 1.25, 2.5 및 5.0 mg/mL 농도에서 DPPH radical 소거활성은 각각 18.35±3.3, 44.17±0.4 및 91.03±0.5%로 곤드레 미세분말의 농도의 증가에 따라 DPPH radical 소거활성도 유의적인 증가를 나타내었다. 곤드레 미세분말의 FRAP 항산화 활성 결과는 Fig. 1B와 같이 곤드레 미세분말 1.25, 2.5 및 5.0 mg/mL의 농도에서 FRAP 활성은 각각 0.190, 0.276 및 0.444로 나타났다. 700 nm에서 Fe³⁺ 혼합물이 수소를 공여하여 유리라디칼을 안정화시켜 Fe²⁺로 전환하는 환원력을 흡광도로 나타낸 환원력의 결과는 Fig. 1C와 같이 곤드레 미세분말 1.25, 2.5 및 5.0 mg/mL의 농도에서의 환원력은 0.22, 0.25와 0.27로 나타내 유의적인 증가를 보여주었다. ABTS법은 양이온 라디칼을 소거하는 특징을 나타내며, 기질과 반응물과의 결합 정도 차이에 따라 라디칼의 소거능력을 나타낸다(Li 등 2007). ABTS radical 소거활성 결과는 Fig. 1D에 나타내었다. 곤드레 미세분말 1.25, 2.5 및 5.0 mg/mL의 농도에서 ABTS radical 소거활성은 각각 27.56, 38.73 및 57.59%로 유의적으로 증가하는 경향이 나타났다. Prior 등(1998)의 결과와 비슷한 지표성분 함량과 총 플라보노이드 함량에 따라 항산화능이 높게 나타났으며 그 차이는 미세분말 곤드레의 페놀성 화합물의 함량에 의한 것으로 판단된다. 항산화능을 평가하는 네 종류의 실험에서 곤드레 미세분말은, 농도에 따라 항산화 능력이 증가하는 것으로 보아 항산화 작용에 효과가 있을 것으로 판단된다.

3. 항산화 성분과 항산화 활성의 상관관계 분석

항산화 활성을 평가하는 *in vitro* 방법은 기전에 따라 크게 5가지 유형으로 금속이온 킬레이팅, 수소공여기전, 항산화성 효소기전, 산소 소거기전 및 일중항산소 제거기전 등으로 나눌 수 있다(Yang 등 2011; Lee 등 2012). 본 연구에서는 농도별 곤드레 미세분말 추출물의 항산화 성분(총 페놀 및 플라

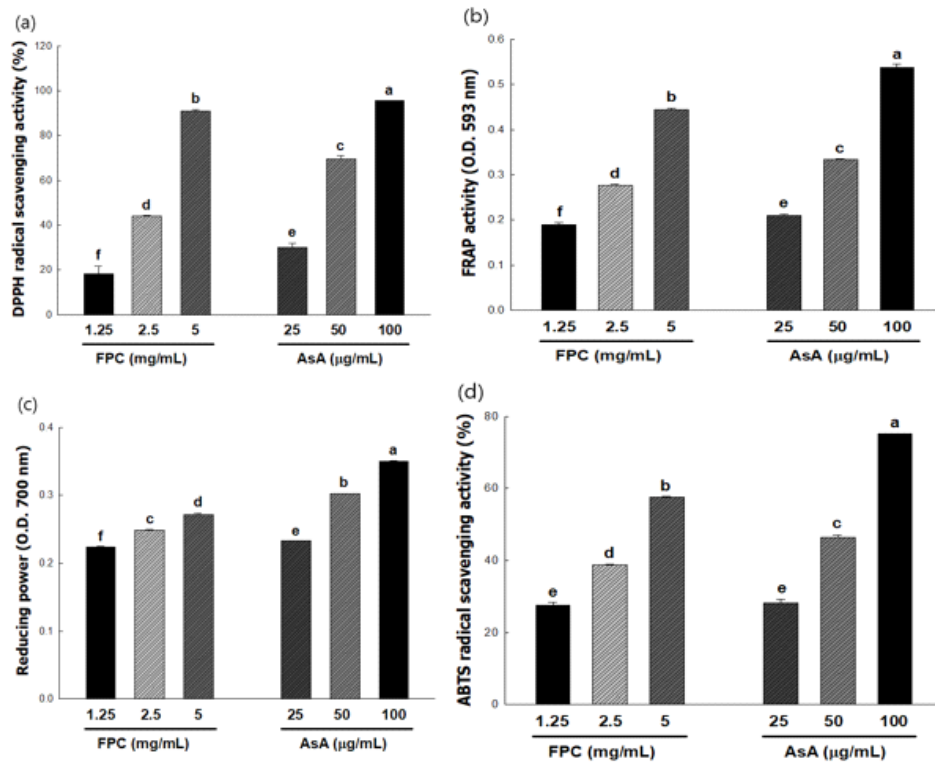


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity (a), FRAP value (b) and reducing power (c), ABTS radical scavenging activities (d) of FPC (*Cirsium setidens* Nakai fine powder). Each bar represents the mean±S.D. of quadruplicate determinations, n=3. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA ($p < 0.05$).

보노이드 함량)과 항산화 활성(DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능, FRAP 활성, reducing power)을 평가하였으며, 실험결과를 바탕으로 항산화 성분과 항산화 활성에 대한 상관관계를 비교하여 R^2 값으로 나타내었다(Table 3). 그 결과 모든 항산화 활성실험 값이 항산화 성분에 대하여 1에 가까운 R^2 값을 타나내어 페놀 및 플라보노이드가 증가함에 따라

항산화 활성도가 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 위의 결과로 보아 곤드레 미세분말 추출물은 라디칼 소거능 및 산화·환원작용을 통하여 항산화 활성을 가지는 것으로 사료되며, 천연 항산화 소재로서의 활용가능성이 높을 것으로 기대된다.

Table 3. Correlation analysis (R) among the antioxidant activity and antioxidant compounds of *Cirsium setidens* Nakai fine powder

Parameter	DPPH	ABTS	FRAP	Reducing power	TPC ¹⁾	TFC ²⁾
DPPH	1.000					
ABTS	0.998**	1.000				
FRAP	0.999**	0.999**	1.000			
Reducing power	0.978**	0.981**	0.975**	1.000		
TPC ¹⁾	0.998**	0.999**	0.999**	0.976**	1.000	
TFC ²⁾	0.997**	0.998**	0.999**	0.976**	1.000**	1.000

¹⁾ Total phenolic content.

²⁾ Total flavonoid content.

**The correlation coefficients are significant at the 0.01 level.

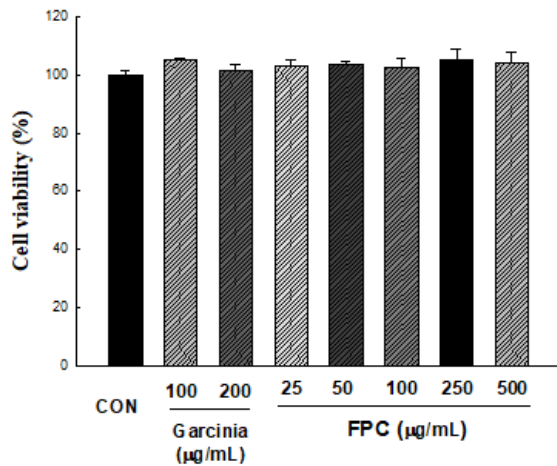


Fig. 2. Effects of FPC (*Cirsium setidens* Nakai fine powder) on cell viability in 3T3-L1 adipocytes. Results are presented as the mean±S.D. of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

4. 곤드레 미세분말의 세포독성

분화 유도기간 동안 3T3-L1 전구지방세포에 곤드레 미세분말의 세포독성에 대한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 곤드레 미세분말의 25~500 µg/mL 농도에서 세포독성은 나타나지 않았으며, 현미경 상에서의 형태학적인 변화도 관찰되지 않았다. 양성대조군으로 사용한 가르시니아 캄보지아 추출물의 경우에도 100~200 µg/mL의 농도에서 세포독성을 보이지 않았다. 국내 산림자원 5종 추출물에 대한 세포독성을 연구한 Choi 등(2017)의 결과에서도 지방전구 세포에 농도별로 처리 결과, 세포 내 독성을 보이지 않아 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 곤드레 미세분말의 세포 보호 효과를 측정하기 위하여 50~500 µg/mL 농도로 실험을 하였다.

5. 3T3-L1 세포내 지방 축적 및 ROS 생성에 대한 곤드레 미세분말의 효과

Fig. 3은 3T3-L1 세포에 곤드레 미세분말을 농도별로 분화 유도배지와 함께 처리하면서 adipocyte로 분화를 유도시키고 Oil red O를 통해 중성지방의 양을 측정한 결과이다. 처리농도는 Do 등(2012)의 연구에서 3T3-L1 지방세포에 늪은 호박 (*Cucubita moschata* Duch) 추출물의 항비만 효과를 보기 위한 추출물의 농도를 0.5-5 mg/mL로 설정한 것과 Yoon 등(2012)의 연구서 쓴메밀 및 단메밀 에탄올 추출물의 항산화 및 지방세포 분화 억제 효과를 보기위한 시료의 농도를 50-400 µg/mL로 설정한 것을 참고로 하여 곤드레 미세분말 추출물을 25~500 µg/mL의 농도로 처리한 군에서 101.22±4.57, 97.68±8.88, 81.61±8.47, 76.09±1,033 및 45.17±7.08%로 지방세포 분

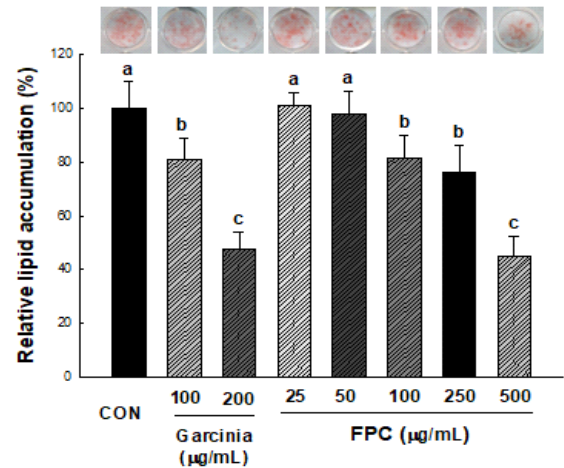


Fig. 3. Effects of FPC (*Cirsium setidens* Nakai fine powder) on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Results are presented as the mean±S.D. of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

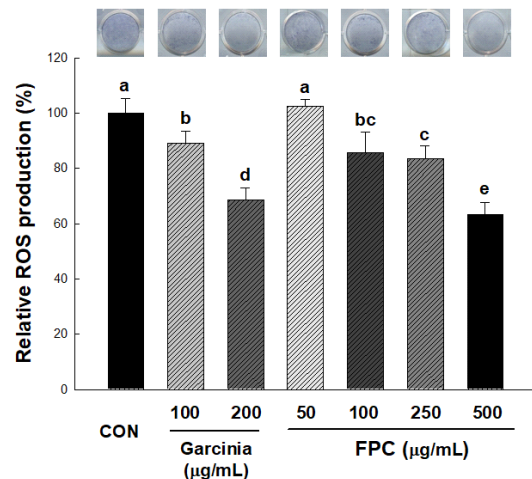


Fig. 4. Effects of FPC (*Cirsium setidens* Nakai fine powder) on ROS production in 3T3-L1 adipocytes. Results are presented as the mean±S.D. of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

화과정에서 지방 축적이 감소하였으며, 500 µg/mL의 농도에서 지방생성량이 대조군과 비교하여 약 45% 가량 감소한 결과를 확인하였다. 이는 양성대조군으로 사용한 가르시니아 캄보지아 추출물의 200 µg/mL에서의 지방축적 억제효과와 곤드레 미세분말 500 µg/mL의 효과가 유사한 것으로 나타났다.

NBT assay의 결과는 Fig. 4에 나타내었다. ROS 생성 억제 효과를 확인하기 위해 3T3-L1 분화 과정 중, 50~500 µg/mL의

농도별로 곤드레 미세분말 시료를 처리하여 분화 유도를 행하였으며, 생성된 ROS를 NBT assay로 평가하였다. 곤드레 미세분말을 처리한 실험군에서 ROS 생성이 억제되었으며 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 대조군에 비해 ROS의 생성이 약 63% 정도 억제되었다. 이 결과는 Kim 등(2011b)에 의해 보고된 결과와 유사한 경향을 나타내었으며, Choi & Kim(2014)의 연구 결과와도 유사함을 나타내었다.

6. 3T3-L1 세포내 주요 바이오마커 변화에 미치는 곤드레 미세분말의 효과

지방세포 분화 시 곤드레 미세분말 처리에 따른 주요 바이

오마커 분석을 위하여 지방세포 합성과 관련된 바이오마커로 peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ), CCAAT-enhancer-binding proteins α (C/EBP α), adipocyte Protein 2(aP2)를, 에너지 대사 조절 바이오마커는 AMP activated protein kinase(AMPK), 지방 분해 촉진 바이오마커로 hormone sensitive lipase(HSL)를 측정하였다. 곤드레 미세분말은 adipogenic transcription factor인 PPAR γ , 및 C/EBP α , aP2의 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 5). 또한, 지방세포화 인자의 발현을 억제시키는 AMPK의 인산화형태인 phospho-AMPK의 발현은 곤드레 분말 처리군에서 증가하였다. 뿐만 아니라 호르몬 민감성 지방분해효소(hormone sensi-

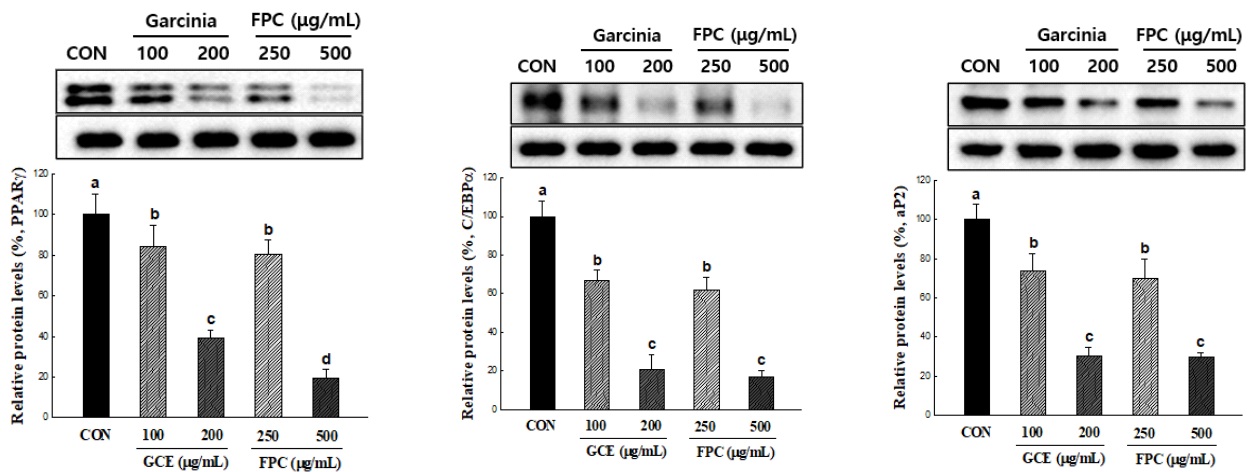


Fig. 5. Effects of FPC (*Cirsium setidens* Nakai fine powder) on the expression levels of adipocyte-specific transcription factors in 3T3-L1 adipocytes. All values are presented as the mean \pm S.D. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

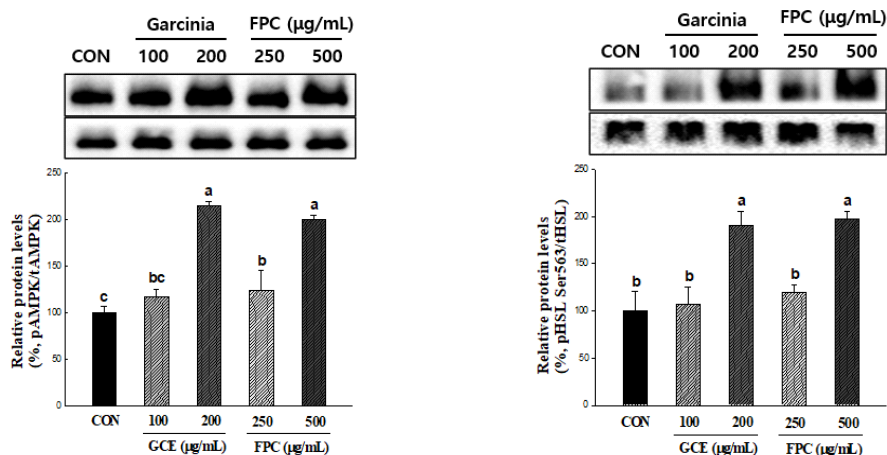


Fig. 6. Effects of FPC (*Cirsium setidens* Nakai fine powder) on the expression levels of p-AMPK and p-HSL proteins in 3T3-L1 adipocytes. All values are presented as the mean \pm S.D. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

tive lipase)는 곤드레 미세 분말 처리시 단백질의 발현이 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 6). C57BL/6J 마우스 모델을 이용하여 표준화된 곤드레 주정추출물의 항비만 활성을 평가한 Cho 등(2017)의 연구와 비교해 볼 때, 곤드레 미세분말의 항비만 활성은 AMPK의 인산화로부터 adipogenic gene의 발현 조절을 통해 기인된 것으로 판단된다.

요약 및 결론

본 연구는 미세분쇄/분급을 통한 곤드레 미세분말의 식품 산업에 활용 시 기초자료를 제공하고자 곤드레 미세분말의 지표물질과 항산화 및 항비만 효능평가를 실시하였다. Pectolarin 고함유 곤드레 분말 제조조건은 3,500 rpm 이상으로 10 kg/hr의 조건으로 곤드레 미세분쇄/분급을 실시한 시료의 pectolarin 함량, 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 10.95 ± 0.15 mg/g, 12.92 ± 0.18 mg GAE/g 및 26.47 ± 0.77 mg RE/g이었고 DPPH radical, FRAP, 환원당, ABTS radical 등의 항산화능력은 유의적으로 증가함을 나타내어 항산화에 효과가 있음을 알 수 있었다. 곤드레 미세분말은 25~500 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 세포독성을 나타내지 않았으며, 곤드레 미세분말을 처리한 지방세포는 지방축적량과 ROS 생성량 모두 억제됨을 나타내었다. 따라서 미세분쇄/분급을 통한 곤드레 미세분말은 대사증후군 개선을 위한 건강기능소재로서의 가능성이 기대되며, 다양한 식품 및 건강기능소재로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 성과물은 중소벤처기업부에서 지원하는 2020년도 산학연 Collabo R&D 예비연구사업(No. S2854253)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

- Ahn MJ, Hur SJ, Kim EH, Lee SH, Shin JS, Kim MK, Uchizono JA, Whang WK, Kim DS. 2014. Scopoletin from *Cirsium setidens* increases melanin synthesis via CREB phosphorylation in B16F10 cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 18: 307-311
- Benzie IFF, Stranin JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76
- Cho BY, Park MR, Lee JH, Ra MJ, Han KC, Kang IJ, Lee OH. 2017. Standardized *Cirsium setidens* Nakai ethanolic extract suppresses adipogenesis and regulates lipid metabolisms in 3T3-L1 adipocytes and C57BL/6J mice fed high-fat diets. *J Med Food* 20:763-776
- Cho ML, Yoon SJ, Kim YB. 2013. The nutritional composition and antioxidant activity from *Undariopsis peterseniana*. *Ocean Polar Res* 35:273-280
- Cho ML, Lee HS, Kang IJ, Won MH, You SG. 2011. Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. *Food Chem* 127:999-1006
- Choi HY, Kim GH. 2014. Inhibitory effects of *Allium sacculiferum* Max. methanol extracts on ROS production and lipid accumulation during differentiation of 3T3-L1 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43:822-828
- Choi SI, Lee JS, Lee S, Lee HJ, Yeo J, Cho BY, Lee JH, Kim JM, Jung TD, Choi SH, Kim JY, Kang SN, Lee OK. 2017. Effects of extracts of five species of Korean native forest plants on lipid accumulation and reactive oxygen species production during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 46:523-528
- Chung MJ, Lee S, Park YI, Lee J, Kwon KH. 2016. Neuroprotective effects of phytosterols and flavonoids from *Cirsium setidens* and *Aster scaber* in human brain neuroblastoma SK-N-SH cells. *Life Sci* 148:173-182
- Do GP, Lee HJ, Do JR, Kim HK. 2012. Antiobesity effect of the *Cucubita moschata* Duch extracts in 3T3-L1 adipocytes. *Korean J Food Preserv* 19:138-143
- Han X, Choi SI, Kim MJ, Lee OH. 2019. Evaluation of antioxidant and cognition improvement effects of 10 wild vegetables cultivated in Gangwon province. *Korean J Food Nutr* 32:662-668
- Hsu CL, Yen GC. 2007. Effects of flavonoids and phenolic acids on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Agric Food Chem* 55:8404-8410
- Hwang EG, Kim SJ, Kim BK. 2014. Effects of the characteristics of wild vegetables on customer satisfaction, trust and repurchase intention. *Korean J Culin Res* 20:59-74
- Jung EY, Lee SK. 2007. Anti-oxidant activities and regeneration effect in HaCaT cell line by Jeju Island aboriginal *Eclonia cava*. *J Korean Soc Cosmetol* 13:1071-1077
- Kim DJ, Jung JH, Kim SG, Lee HK, Lee SK, Hong HD, Lee BY, Lee OH. 2011a. Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Preserv* 18:366-373

- Kim IS, Yang MR, Lee OH, Kang SN. 2011b. Antioxidant activities of hot water extracts from various spices. *Int J Mol Sci* 12:4120-4131
- Kim JH, Park JH, Park SD, Choi SY, Seong JH, Hoon KD. 2002a. Preparation and antioxidant activity of health drink with extract powders from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. *Korean J Food Sci* 34:617-624
- Kim JH, Park JH, Park SD, Kim JK, Kang WW, Moon KD. 2002b. Effect of addition of various mesh sifted powders from safflower seed on quality characteristic of Yangeng. *Korean J Food Preserv* 9:309-313
- Lee JH, Jung HK, Han YS, Yoon YM, Yun CW, Sun HY, Cho HW, Lee SH. 2016. Antioxidant effects of *Cirsium setidens* extract on oxidative stress in human mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep* 14:3777-3784
- Lee JH, Moon SY, Cho BY, Choi SI, Jung TD, Choi SH, Kim JD, Lee OH. 2017. Stability of ethanolic extract from fermented *Cirsium setidens* Nakai by bioconversion during different storing conditions. *Korean J Food Nutr* 30:388-394
- Lee MY, Yoo MS, Whang YJ, Jin YJ, Hong MH, Pyo YH. 2012. Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels. *Korean J Food Sci Technol* 44:540-544
- Lee SH, Jin YS, Heo SI, Shim TH, Sa JH, Choi DS, Wang MH. 2006. Composition analysis and antioxidative activity from different organs of *Cirsium setidens* Nakai. *Korean J Food Sci Technol* 38:571-576
- Lee WB, Kwon HC, Cho OR, Lee KC, Choi SU, Baek NI, Lee KR. 2002. Phytochemical constituents of *Cirsium setidens* Nakai and their cytotoxicity against human cancer cell lines. *Arch Pharmacol Res* 25:628-635
- Lee YJ, Lee JH, Kim YH, Kim JH, Yu SY, Kim DB, Lee JS, Cho ML, Cho JH, Kim BK, Lee BY, Lee OH. 2015. Assessment of the pectolinarin content and the radical scavenging-linked antiobesity activity of *Cirsium setidens* Nakai extracts. *Food Sci Biotechnol* 24:2235-2243
- Li H, Choi YM, Lee JS, Park JS, Yeon KS, Han CS. 2007. Drying and antioxidant characteristics of the shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom in a conveyer-type far-infrared dryer. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36:250-254
- Miquel J, Quintaniha AT, Weber H. 1989. Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine. Vol. 1. pp.223-244. CRC Press
- Noh H, Lee H, Kim E, Mu L, Rhee YK, Cho CW, Chung J. 2013. Inhibitory effect of a *Cirsium setidens* extracts on hepatic fat accumulation in mice fed a high-fat diet via the induction of fatty acid β -oxidation. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:1424-1429
- Oh JW, Lee JH, Cho ML, Shin GH, Kim JM, Choi SI, Jung TD, Kim YH, Lee SJ, Lee BJ, Park SJ, Lee OH. 2015. Development and validation of analytical method for pectolinarin and pectolinarigenin in fermented *Cirsium setidens* Nakai by bioconversion. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44:1504-1509
- Park DJ, Ku KH, Kim SH. 1996. Characteristics and application of defatted soybean meal fractions obtained by micro-particulation/air-classification. *Korean J Food Sci Technol* 28:497-505
- Park SJ, Kim HD, Lee YH. 2020. Validation of analytical method of pectolinarin for standardized *Cirsium setidens* fine powder by air-classification. *J Agric Life Environ Sci* 32:407-416
- Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G, Mainland CM. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J Agric Food Chem* 46:2686-2693
- Que F, Mao L, Zhu C, Xie G. 2006. Antioxidant properties of Chinese yellow wine, its concentrate and volatiles. *LWT-Food Sci Technol* 39:111-117
- 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
- Student AK, Hsu RY, Lane MD. 1980. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 225:4745-4750
- Thao NTP, Cuong TD, Hung TM, Lee JH, Na M, Son JK, Jung HJ, Fang Z, Woo MH, Choi JS, Min BS. 2011. Simultaneous determination of bioactive flavonoids in some selected Korean thistles by highperformance liquid chromatography. *Arch Pharmacol Res* 34:455-461
- Yang HJ, Park MJ, Lee HS. 2011. Antioxidative activities and components of *Gardenia jasminoides*. *Korean J Food Sci Technol* 43:51-57
- Yoon BR, Cho BJ, Lee HK, Kim DJ, Rhee SK, Hong HD, Kim KT, Cho CW, Choi HS, Lee BY, Lee OH. 2012. Antioxidant and anti-adipogenic effects of ethanolic extracts from

Tartary and common buckwheats. *Korean J Food Preserv*
19:123-130

You SG, Kim SW, Jung KH, Moon SK, Yu KW, Choi WS.
2010. Effect of Astragali Radix and *Opuntia humifusa* on

quality of red ginseng drink. *Food Eng Prog* 14:299-306

Received 06 January, 2021

Revised 14 January, 2021

Accepted 25 January, 2021