한국식생활문화학회지 34(1): 75-83, 2019
J. Korean Soc. Food Cult. 34(1): 75-83, 2019
본 논문의 저작권은 한국식생활문화학회에 있음.
Copyright © The Korean Society of Food Culture

ISSN 1225-7060(Print)
ISSN 2288-7148(Online)
https://doi.org/10.7318/KJFC/2019.34.1.75

*Lactobacillus plantarum*으로 발효한 천년초 선인장 열매의 발효특성 및 *in vitro* 항비만 효과

문혜정[1,2] · 박정은[2] · 차연수[2] · 박종혁[1,*]
[1]주식회사 발효예스, [2]전북대학교 식품영양학과

Fermentation Characteristics and Anti-Obesity Effects of Cheonnyuncho (*Oputia Humifusa*) Fruit Fermented with *Lactobacillus plantarum* in 3T3-L1 Cells

Hye-Jung Moon[1,2], Jung-Eun Park[2], Youn-Soo Cha[2], Jong-Hyuk Park[1,*]
[1]*Balhyoyes Inc.,*
[2]*Department of Food Science and Human Nutrition, Chonbuk National University*

Abstract

This study was conducted to investigate the fermentation characteristics and anti-obesity effects of Cheonnyuncho (*Oputia Humifusa*) fruit fermented with *Lactobacillus plantarum* SRCM 100320 (FC). The pH gradually decreased from 4.77 to 3.63 at 72 hours during fermentation. Counts of lactic acid bacteria, total polyphenol and flavonoid contents and DPPH scavenging activity were the highest at 48 hours during fermentation. Evaluation of the composition of polyphenols and flavonoids of FC fermented at 48 hours by HPLC revealed hyperoside (quercetin 3-galactoside), luteolin and kaempferol were the major components. The hyperoside content of FC was decreased, while the luteolin and kaempferol contents of FC were increased compared to unfermented Cheonnyuncho (NFC). Evaluation of the anti-obesity effects of FC in 3T3L-1 cells revealed that the accumulation of triglyceride was inhibited by about 27.3% in cells treated with FC at 150 μg/mL compared to NFC. These findings indicate FC has the potential for use as an anti-obesity material.

Key Words: *Oputia Humifusa*, *Lactobacillus plantarum*, 3T3-L1 cells, fermentation, Cheonnyuncho

I. 서 론

대사증후군의 원인 중 하나인 비만은 발생률이 점진적으로 증가하고 있고 이는 서구화된 식습관으로 인한 고칼로리 섭취 및 운동 부족의 결과이다(Ladabaum et al. 2014; Lee et al. 2015). 세계보건기구(WHO)에서는 전 세계적인 주요 사망원인으로 허혈성 심장 질환, 뇌졸중 및 당뇨병 등과 같은 비전염성 질병이 약 71%를 차지한다고 보고하고 있으며, 비만은 이 질환들의 주요 원인 중의 하나로 알려져 있다(Lew 1985; WHO 2018). 비만환자의 약 90%는 내장지방비만으로써 내장지방은 포도당과 지질대사에 장애를 일으켜 인슐린 저항성, 고지혈증, 고혈압 및 고지혈증 등을 유발하며 최종적으로는 아테롬성 동맥경화증과 같은 심혈관질환을 일으키는 것으로 알려져있다(Matsuzawa et al. 1995). 비만을 예방하거나 억제하기 위해 신체활동을 증가시키거나 칼로리 섭취를 제한하는 방법이 있으나 이러한 방법들만으로는 충분하지 않기 때문에 비만 치료 약물의 도움을 받기도 한다. 그러나 최근 amphetamine, rimonabant와 sibutramine 같은 화학적 약물들을 복용 시 혈압증가, 매스꺼움, 위장관 질환 및 기억력 손상 등의 부작용을 야기하는 것으로 알려지면서 사용을 금지하기도 하였다(Kang & Park 2012; Haslam 2016). 이러한 이유로 최근에는 화학적 합성품 보다는 천연 원료 유래 기능성 물질이나 천연 식품에 관한 관심이 증가하고 있으며, 특히 발효 미생물에 의한 발효공정을 통하여 효과적이고 안전한 물질을 찾는 연구가 활발히 진행 중에 있다(Choi et al. 2007; Yun 2010).

선인장은 건조한 기후에 적응력이 뛰어나 식물로 예로부터 그 기능성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며(Meckes-Lozoya & Ibáñez-Camacho 1989), 우리나에서는 opuntia 속 선인장인 손바닥 선인장과 천년초 선인장의 건강 기능 소재로서 가능성에 대한 연구가 진행 중에 있다(Yoon & Son 2009). 천년초 선인장은 백년초 선인장과는 달리 솜털가시를 가지고 있고, 토양에서 약 30 cm 정도로 자라는 특성이 있다. 여름에는 수분이 풍부한 지역에서 성장 및 번식하고, 휴면기

*Corresponding author: Jong-Hyuk Park, Balhyoyes Inc., Food Venture Center, 110, Dongchonje-gil, Iksan-si, Jeollabuk-do, 54576, Korea
Tel: +82-63-838-8942 Fax: +82-63-838-8941 E-mail: fyeslove@naver.com

인 겨울에는 비닐하우스 없는 노지에서도 생존하며, 병충해에도 강한 특성을 가지고 있다고 보고되고 있다(Joo 2016). 천년초 선인장의 주요 기능성 성분은 페놀성 물질 및 플라보노이드, 식이섬유, 비타민C, 칼슘, 무기성분, 아미노산 및 복합 다당류 등과 인체에 중요한 각종 영양성분을 함유하고 다고 보고하였다(Cho et al. 2009). 천년초 관련 연구로는 항산화, 항균, 항암 등의 생리활성에 관한 연구(Jung & Shin 2011; Jung et al. 2012; Kim et al. 2014)와 임상실험 및 면역력에 관한 연구(Park et al. 2005; Hwang et al. 2012)가 진행되고 있으나 항비만 효과에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 현재 천연물의 생리활성을 안전적으로 극대화 시킬 수 있는 방법으로 발효에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다(Kong et al. 2008). 천연물의 생리활성을 극대화시킬 수 있고 천연물과 미생물 상호 간의 상승효과 그리고 발효과정 중 생성되는 대사산물의 성분의 변환에 대한 건강기능소재로서의 가능성 등이 연구되고 있다(Jeon et al. 2005).

따라서 본 연구는 발효식품 유래 발효미생물을 이용하여 천년초 선인장을 발효시킬 경우 기존의 천년초 선인장이 가지는 유효성분의 증가 할 것으로 기대되며, 천년초를 이용한 항비만 소재 개발을 위한 기초연구로 *Lactobacillus plantarum* SRCM100320 (*L. plantarum*)으로 발효한 천연초선인장 열매의 *in vitro* 항비만 효과를 검토하였다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 실험재료

전라북도 익산시에 소재한 천년초 선인장 재배 전문업체(ChunNyeonCho Land, Iksan, Korea)에서 구입한 천년초 선인장 열매 분말을 주요 원료로 사용하였으며, 이를 발효시키기 위한 유산균 균주는 발효미생물산업진흥원(Sunchang, Korea)으로부터 분양받은 *Lactobacillus plantarum* SRCM 100320을 사용하였다.

2. 일반성분 분석

일반성분 분석은 AOAC 방법(2000)에 따라 수분 정량은 상압건조방법으로 105°C에서 건조하여 정량하였고 조단백질은 semimicro-Kjeldhl법으로 자동단백질 분석기로(Kjeltec 2400 AUT, Foss Tecator, Eden Prairie, Mn, USA)로 분석하였으며, 조지방은 Soxhlet 추출기(Kjeltec 2400 AUT, Foss Tecator, Eden Prairie, Mn., USA)를 사용하였고, diethyl ether로 추출하여 정량하였으며, 조회분은 건식회화법으로 측정하고 탄수화물은 100에서 이들 값을 뺀 값을 표기하였다.

3. 천년초 선인장 열매 발효물 제조

천년초 선인장 열매 분말을 증류수를 이용하여 10% (w/v) 농도로 조정한 다음 MRS broth 배지에서 37°C에서 48시간 배양한 *L. plantarum* 균주를 10% 첨가하여 37°C에서 72일간 배양하면서 배양시간에 따른 pH 및 유산균수 등을 측정하였다.

4. Free radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 Blois MS(1958)의 방법에 의해 측정하였다. 천년초 선인장 열매 발효물을 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.5)에 용해시키고 2 mL의 7.5×10^{-5} M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich Co., Korea)을 첨가하였다. 추출액 혼합액은 37°C에서 30분간 반응시킨 후 UV/Visible spectrometer (X-ma 1,000, Humas Co., Korea)로 측정하였고, 대조군으로 Vitamin C를 사용하였다. 항산화활성은(%)은 [1–(시료첨가구의 흡광도/시료무첨가구의 흡광도)]×100의 계산식에 의해 구하였다.

5. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량측정

천년초 선인장열매 발효물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 Folin-Ciocalteu법에 의해 측정하였다(Pellegrini et al. 1999). 발효물 1 mL에 Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich Co., LCC, USA) 0.5 mL와 증류수 5 mL를 첨가하여 8분간 반응시킨 다음 7% Na_2CO_3 10 mL를 첨가하였다. 이후 혼합액의 최종 부피가 25 mL가 되도록 증류수를 첨가하였다. 혼합액은 상온에서 2시간 동안 반응시켜 UV/Visible spectrometer (X-ma 1,000, Humas Co., Korea)로 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid (Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)를 이용하여 표준곡선을 구하여 플라보노이드 함량을 측정하였다. 총플라보노이드 함량은 Moreno et al.(2000)의 방법을 이용하였으며, 10% aluminum nitrite 100 μL 및 1 M potassium actetate 100 μL, 80% 에탄올 4.3 mL를 혼합한 용액에 발효물 0.5 mL를 첨가하여 40분간 상온에서 반응시킨 다음 510 nm에서 UV/Visible spectrometer (X-ma 1,000, Humas Co., Korea)을 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 quercetin (Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)을 이용하여 표준곡선을 구하여 플라보노이드 함량을 측정하였다.

6. 폴리페놀 및 플라보노이드 구성성분 분석

천년초 선인장 열매 발효물의 폴리페놀 및 플라보노이드 구성성분은 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 분석하였으며, 표준성분으로서 hyperoside (quercetin 3-galactoside), apiin, apigenin 7-glucoside, luteolin, kaempferol, apigenin을 이용하였다. HPLC 분석은(Chen et al. 2001) Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며, 컬럼은 Schseido CapCell PAK MGII C18 (4.6×150 mm, 3 μm pore size), 유속 0.45 mL/min, 주입부피 15 μL로 분석하였다. 이동상은 0.1% Formic acid (A)와 acetonitrile (B)로 0 min-5% B, 5 min-

5% B, 9 min-10% B, 13 min-10% B, 20 min-25% B, 24 min-30% B, 28 min-35% B, 32 min-45 % B, 35 min-45% B, 40 min-50% B, 43 min-55% B, 47 min-60% B, 50 min-60% B, 53 min-70% B, 56 min-70% B, 57 min-40% B, 60 min-5% B조건으로 분석하였다. Detection wavelength는 254~320 nm에서 검출하였다.

7. 세포 배양 및 분화

3T3-L1 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였으며, 10% bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA) 와 100 U/mL penicillin-streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza, Walkersville, MD, USA) 를 이용하여 37°C, 5% CO_2에서 배양하였다. 지방세포 분화를 위해서 3T3-L1 세포를 6-well plate에 분주하여 배양하였으며 세포가 100% confluent 된 후 48시간 더 배양하였다. 그 후 지방세포 분화 유도제인 MDI용액(0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1 M dexamethasone (DEXA), 및 10 μg/mL insulin)과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지와 시료를 처리하여 3일동안 분화를 유도하였다. 이후 2일 간격으로 6일 동안 10% FBS, 10 μg/mL insulin DMEM으로 교환한 뒤, 시료를 첨가하여 배양하였다.

8. 세포 독성 확인

천년초 발효물의 3T3-L1 세포에 대한 세포독성을 확인하기 위하여 EZ-Cytox reagent (Daeil Lab Service, Seoul, Korea)를 이용하여 MTT assay를 실시하였다 (Kamalakkannan et al. 2011). 96-well plate에 세포를 분주하여 37°C, 5% CO_2 상태에서 24 시간 동안 부착시킨 후 천년초 발효물을 75-1200 μg/mL의 농도로 처리한 다음 24, 48 및 72시간 동안 배양하였다. 그 후 EZ-Cytox reagent를 포함하는 배지로 교체하여 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 microplate reader (SpectraMax M2, Molecular devices, San Jose, CA, USA)을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 증식율(%)은 시료를 처리하지 않은 대조구의 흡광도 대비 시료 처리구의 흡광도를 백분율로 나타내었다.

9. Oil Red O 염색

천년초 발효물이 3T3-L1 지방전구세포의 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Oil Red O 염색법을 사용하였다 (Kasturi & Joshi 1982). 즉, 분화가 완료된 3T3-L1 세포를 Phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척한 후 10% formalin 용액을 처리하여 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. 그 후 formalin을 완전히 제거하고 60% isopropanol로 세척한 다음 Oil Red O 용액을 넣고 실온에서 30분 동안 염색하였다. Oil Red O 용액을 제거하고 증류수로 세척하고 건조시킨 후 현미경(CKX41, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 흡광도 측정을 위해 100% isopropanol로 용출시켜 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10. Triglyceride (TG) 함량 측정

분화가 완료된 3T3-L1 세포를 PBS로 2회 세척한 후 5% Triton X-100 용액으로 용출 시킨 후 TG assay kit (abcam, Cambridge, MA, USA)의 제조사의 매뉴얼에 따라 지방구 생성량을 측정하였다. 중성지방축적율(%)은 시료를 처리하지 않은 대조구의 TG 함량 대비 시료 처리구의 TG 함량을 백분율로 나타내었다.

11. 통계분석

모든 실험결과는 3회 반복하였으며, SPSS Statistics 18 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균±표준편차로 나타내었다. 각 실험군 간의 유의성을 검증하기 위해서 일원분산분석(one-way ANOVA)를 실시하였으며, 사후검증은 Duncan's multiple range test에 의해 $p<0.05$ 수준에서 사후검정하였다. 또한 두 그룹 간의 데이터를 비교하기 위해 유의수준 $p<0.05$에서 independent t-test를 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 천년초 선인장 열매 분말의 일반성분

천년초 선인장 열매 분말의 일반성분을 분석한 결과 <Table 1>에서 보는 바와 같이 조회분의 함량이 가장 높았으며, 그 다음으로 조단백질, 조섬유, 조지방 순으로 나타났다. 천년초 선인장 열매 분말의 수분함량은 5.8%, 조단백질이 5.2%, 조지방이 3.1%, 조섬유가 4.0%, 조회분이 5.8%이였다. Jan et al.(2013) 및 Shin & Han(2016)은 천년초 선인장 열매분말의 수분함량은 각각 6.0 및 6.28%, 조단백질은 5.63 및 2.62%, 조지방함량은 3.45 및 1.82%, 조회분함량은 4.2 및 7.47%으로 본 연구의 결과와 다소 차이가 나타났으며, 이러한 차이는 원료가 되는 천년초의 생육환경, 지역, 채취시기 및 가공방법, 시료처리 방법 등의 차이에 따른 결과라 보여진다.

2. *L. plantarum* 으로 발효한 발효물의 이화학적 및 미생물학적 특성

천년초 선인장 열매 분말을 주요 원료로 사용하여 이를 발효시키기 위해 김치유래 유산균주인 *L. plantarum*을 이용하여 발효하였다. 천년초 선인장 열매 분말 1% (w/v)에 MRS broth에서 3일간 배양한 *L. plantarum*을 10%로 첨가하여 발효시간에 따른 이화학적 및 미생물학적 변화를 <Table 2>에 나타내었다. 발효시간에 따른 pH의 변화는 발효 초기 4.77에서 발효시간이 증가할수록 pH는 3.63으로 감소하였다. Park & Lee(2013)의 sucrose 첨가량에 따른 천년초 분말 발

<Table 1> Proximate composition of the Cheonnyuncho (*Oputia Humifusa*) fruit powder (Unit: dry basis, %)

	Composition				
	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude fiber	Crude ash
Cheonnyuncho fruit powder	5.8±0.03[1)]	5.2±0.02	3.1±0.06	4.0±0.05	5.8±0.03

[1)]Values are expressed as the mean±SD of determinations made in triplicate experiments.

<Table 2> pH and viable cell counts of Cheonnyuncho (*Oputia Humifusa*) fruit powder fermented by *L. plantarum*

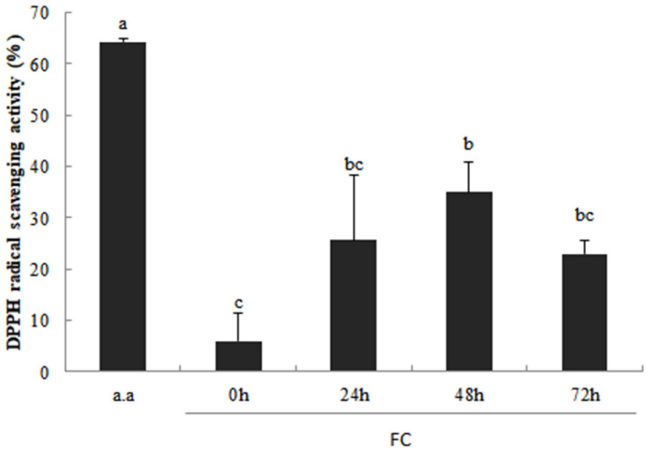
	Fermentation time(hour)			
	0	24	48	72
pH	4.77±0.07[1)]	4.12±0.03	3.67±0.02	3.63±0.03
Viable cell counts (CFU/mL)	5.17×10^7	1.78×10^7	5.83×10^8	6.55×10^7

[1)]Values are expressed as the mean±SD of determinations made in triplicate experiments.

효물에 있어서 pH는 초기 4.30에서 발효 3일째 4.19로 낮아졌으며, 산도는 발효초기 0.63%에서 발효 3일째 1.69로 증가하였다고 보고하였으며, 본 연구의 결과와 다소 상이하였다. 이러한 결과는 천년초 분말 및 사용된 유산균주의 원료적 특성에 의한 차이로 보여진다. 천년초 선인장 열매 분말 발효물의 유산균수 변화는 <Table 2>와 같이 초기 접종 *L. plantarum* 균수는 3.2×10^9 CFU/mL 접종하였고 발효 0일째 유산균수는 5.17×10^7 CFU/mL에서 발효시간이 증가할수록 증가하여 발효 48시간째 최대인 5.83×10^8 CFU/mL으로 증가하였다가 6.55×10^7 CFU/mL로 감소하였다. Park & Lee (2013)은 *Leuconostoc mesenteroides* SM으로 발효한 천년초 분말의 유산균수는 발효 24시간째 최대 생육인 1.7×10^9 CFU/g에서 발효시간이 증가할수록 감소하여 발효 72시간째 4.21×10^8 CFU/g로 감소하였다고 보고하였다. 본 연구에 있어서는 발효기간 동안 서서히 증가하여 발효 48시간째 최대치가 되었다가 감소하였고, 이는 천연초 선인장 열매 분말 발효를 위해 사용한 균주의 특성 차이로 보여진다.

3. *L. plantarum* 으로 발효한 발효물의 라디칼 소거활성

L. plantarum 으로 발효한 발효물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 <Figure 1>와 같다. 천년초 열매 발효물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 100 ppm 농도에서 발효 0시간째 5.93%에서 발효 48시간째 35.1%으로 증가하였다가 발효 72시간째 30.0%으로 감소하였다. Kim(2014)은 버섯균사체로 발효한 천년초 에탄올 추출물의 생리활성에 관한 연구에서 비발효 천년초 추출물 대비 발효 천년초 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 유의적으로 증가한다고 보고하였고, 상황버섯균사체 및 표고버섯균사체를 이용한 발효물이 500 ppm 농도에서 합성항산화제인 BHA 와 유사한 소거활성을 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서 있어서는 발효 전에 비해 발효 48시간째 발효물이 7배 높은 항산화 효과를 나타났다. Shin & Han(2016)은 천년초의 성분특성과 항산화 활성에 관한 연구에서 천년초 열매 에탄올 추출물에서 500 ppm에 농도에서 DPPH 라디칼 소거능이 26%로 보고하였으며, 본 연구에 있어서 *L. plantarum*로 발효한 천년초 열매 발효물이 100 ppm 농도에서 발효 48시간째 35.1%으로 나타나 비발효 천년초 열매분말보다 우수한 것으로 보여진다.

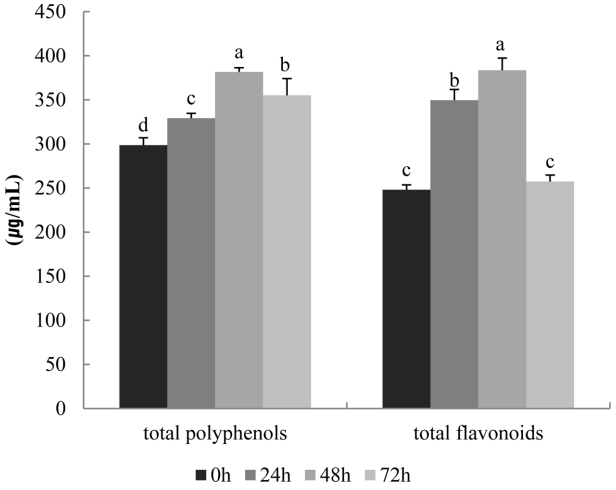


<Figure 1> Changes of scavenging activity of DPPH during fermentation periods of Cheonnyuncho (*Oputia Humifusa*) fruit powder with *L. plantarum.*

Values are expressed as the mean±SD of determinations made in triplicate experiments. Means with the different letters on bars of each sample are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test. a.a: 50ppm ascorbic acid, FC; Cheonnyuncho fruit fermented with *L. plantarum*

4. *L. plantarum* 으로 발효한 발효물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

*L. plantarum*으로 발효한 발효물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드의 발효시간에 따른 함량변화는 <Figure 2>와 같다. *L. plantarum*으로 발효한 천년초 열매 분말의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 발효 초기 각각 298 및 248 ppm에서 발효시간이 증가할수록 증가하여 48시간째 각각 381 및 383 ppm로 증가하였다가 355 및 257 ppm으로 감소하였다.



<Figure 2> Changes of total polyphenols and total flavonoids during fermentation periods of Cheonnyuncho (*Oputia Humifusa*) fruit powder with *L. plantarum.*

Values are expressed as the mean±SD of determinations made in triplicate experiments. Means with the different letters on bars of each sample are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

발효 48시간째 천년초 선인장 열매 발효물은 발효 0시간째에 비해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 각각 27.8 및 40.0% 증가하였다. Kim(2015)은 균사체로 발효한 천년초 발효물은 균사체 종류에 따라 총 폴리페놀 및 플라보노이드는 각각 20~40% 증가한다고 보고하였고, Kim(2014)은 가시오카피 발효물의 경우에 있어서도 발효시간이 증가할수록 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 증가한다고 보고하였다. Jung et al.(2017)은 천년초 융합발효를 통한 특성연구에서 총 폴리페놀의 함량이 발효 전에 비해 45.8% 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서 있어서도 발효 후 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 발효 전에 비해 증가하였고 증가량은 사용된 유산균주, 발효조건, 원료특성의 등이 이유로 차이가 난 것으로 보인다. 식품의 폴리페놀성 화합물들은 단순한 phenol류, phenolic acid, phenylprophanoid류 및 flavonoid류 등이 대부분이며, 항균, 항알러지, 항산화, 항암, 심장질환 및 당뇨병 예방 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Azuma, et al. 1999). *L. plantarum*으로 발효한 천년초 열매분말의 페놀성분 및 플라보노이드 물질의 구성성분을 확인하기 위하여 항산화 활성, 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높은 발효 48시간째 발효물을 HPLC로 분석하였고, 주요성분은 hyperoside (quercetin 3-galactoside), luteolin 및 kaempferol이 검출되었으며, 특히 천년초 열매분말을 발효시 hyperoside는 2.17 ppm에서 1.12 ppm으로 감소한 반면, luteolin 및 kaempferol은 각각 0.64 및 4.10 ppm에서 0.75 및 12.94 ppm으로 증가하였으며, 특히 kaempferol은 발효 전 대비 약 3.16배 증가한 것으로 나타났다<Table 3>.

Kim & Park(2009)은 천년초에는 isorhamnetin, kaempferol, quercetin 및 taxifolin 등이 존재한다고 보고하고 있으며, Cha et al.(2013)은 천년초 열매 에탄올 추출물의 ethyl acetate 분획층에서 주요 페놀산과 플라보노이드로 ferulic acid, protocatechuic acid, taxifolin 및 myricetin으로 보고하고 있으며, 이 외에도 Luteolin 및 Kaempferol 등이 존재한다고 보고하였다. 본 연구에서도 이와 유사하게 hyperoside (quercetin 3-galactoside), luteolin 및 kaempferol이 천년초 열매 분말의 주요 성분으로 나타났다.

식물과 식품에 존재하는 플라보노이드는 flavan-3-ols를 제외하고 대부분 당과 결합된 배당체(glycoside) 형태로 존재하고 있으며, 장내에서 glycosidase 같은 효소와 장내 미생물에 의해서 분해되어 당이 유리된 aglycone 형태로 체내에 흡수되어 항암, 심혈관 질환 등을 예방하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Ross & Kasum 2002; Braune & Blaut 2016). Lee et al.(2015)는 꾸찌뽕나무 잎을 *L. plantarum*으로 발효시 플라보노이드 배당체가 flavonol, quercetin 및 kaempferol로 전환되었다고 보고하였다. 본 연구에서도 quercetin의 배당체 중 하나인 hyperoside (quercetin 3-glalactosdie)는 천년초 열매 발효 후에 감소한 반면 aglycone 형태인 luteolin 및 kaempferol은 증가하는 것으로 나타났으며, 이는 천년초 열매 분말의 플라보노이드 배당체가 *L. plantarum* 발효에 의해서 aglycone으로 전환되었을 것으로 사료된다.

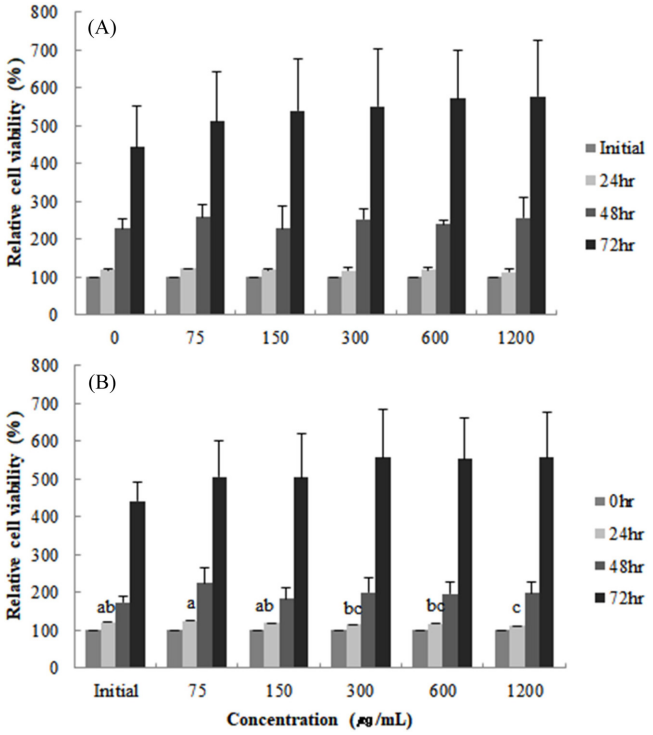
5. 3T3-L1 지방전구세포에서의 독성확인

비발효 천년초(NFC)와 *L. plantarum*으로 발효한 천년초 발효물(FC)의 3T3-L1 지방전구세포에 대한 세포독성을 확인하기 위하여 75, 150, 300, 600, 및 1,200 μg/mL의 농도에서 MTT assay를 실시하였다<Figure 3>. 그 결과, 비발효 천년초는 0시간(초기상태)에서부터 72시간까지 모든 그룹간에 유의적인 차이는 없었다<Figure 3(A)>. 천년초 발효물은

<Table 3> Hyperoside (quercetin 3-galactoside), luteolin and kaempferol contents of Cheonnyuncho (*Oputia Humifusa*) fruit powder fermented by *L. plantarum* (ppm)

	Hhyperoside (quercetin 3-galactoside)	Luteolin	Kaempferol
NFC[1)]	2.17±0.15[2)]	0.64±0.04	4.10±0.22
FC	1.12±0.1[1)]	0.75±0.02	12.94±0.4

[1)]NFC; unfermented cheonnyuncho fruit powder, FC; cheonnyuncho fruit powder fermented by *L. plantarum*.
[2)]Values are expressed as the mean±SD of determinations made in triplicate experiments.



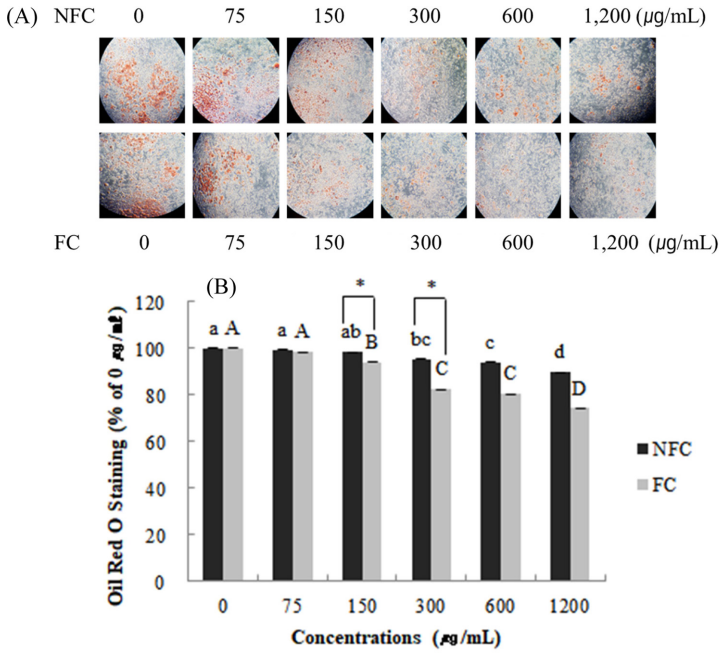
<Figure 3> Effect of unfermented cheonnyuncho (A) and fermented cheonnyuncho (B) on cytotoxicity in 3T3-L1 cells.

Data are representative of three independent experiments (mean±SD). Values are expressed as the mean±SD of determinations made in triplicate experiments. Means with the different letters on bars of the same colour column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

24시간째에 무처리구(0 μg/mL)과 비교시 1,200 μg/mL 처리시 세포 생존율이 약간 감소하였으나 90% 이상으로 나타났으며, 48시간 및 72시간째에는 그룹 간의 유의적인 차이가 없었다<Figure 3(B)>. 따라서, 비발효 천년초 및 천년초 발효물은 세포 생장에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

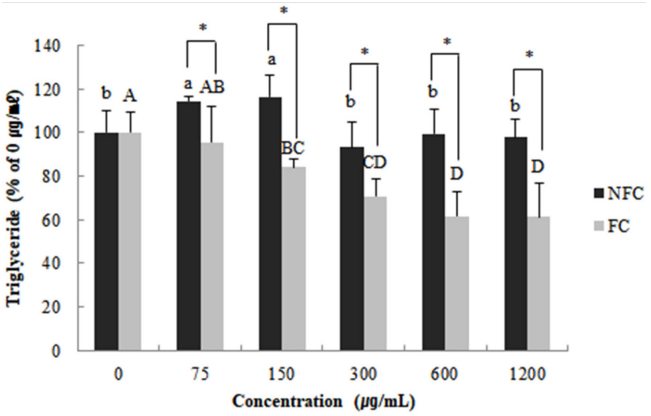
6. 천년초 발효물의 지질축적 억제 효과

비발효 천년초와 천년초 발효물을 3T3-L1 지방전구세포의 분화과정동안 처리하여 지질축적 억제 효과를 확인하였다<Figure 4, 5>. Oil Red O 염색법을 이용하여 세포내 지질축적정도를 확인한 결과, 비발효 천년초와 천년초 발효물은 농도의존적으로 유의적으로 감소하였다<Figure 4>. 비발효 천년초는 300 μg/mL 이상 처리시 무처리구 대비 유의적으로 감소하였으나, 천년초 발효물은 150 μg/mL 이상 처리시 유의적으로 감소하였다. 특히, 3T3-L1 세포에서 150 μg/mL과 300 μg/mL 농도로 천년초 발효물을 처리시 비발효 천년초보다 약 4.9% 및 15.8%로 유의적으로 지질축적을 감소시키는 것으로 나타났다. 3T3-L1 전구지방세포가 분화되는 동안 중성지방 축적정도를 TG assay kit를 이용하여 정량적으로 확인하였다<Figure 5>. 비발효 천년초는 무처리구 대비 유의적인 감소효과가 나타나지 않았으나, 천년초 발효물은 처리농도가 증가할수록 중성지방 축적량을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 특히, 150 μg/mL의 천년초 발효물을 처리시 동일한 농도의 비발효 천년초를 처리할 때 보다 약 27.6%의 중성지방 축적억제율을 나타내었다. 따라서, 비발효



<Figure 4> Effect of unfermented cheonnyuncho (NFC) and fermented cheonnyuncho (FC) on the lipid droplet accumulation (A) and oil red O levels (B) during the differentiation of 3T3-L1 cells.

Values are expressed as the mean±SD of determinations made in triplicate experiments. Means with the different letters on bars of the same colour column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test. *Differences between the two groups were analyzed by independant t-test (*$p<0.05$).



<Figure 5> Effect of unfermented cheonnyuncho (NFC) and fermented cheonnyuncho (FC) on the triglyceride accumulation during the differentiation of 3T3-L1 cells.

Values are expressed as the mean±SD of determinations made in triplicate experiments. Means with the different letters on bars of the same colour column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test. *Differences between the two groups were analyzed by independant t-test (*$p<0.05$).

천년초 보다 천년초 발효물의 중성지방축적 억제효과가 더 높은 것으로 나타났다. Wang et al.(2018)은 Houttuyni cordata 잎차와 녹차를 *L. paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101로 발효시 폴레페놀인 EGCG, ECG, 및 chlorogenic acid 함량이 비발효군에 비하여 증가하였으며 이를 3T3-L1 세포에 처리시 1 μg/mL 이상에서 지질축적 억제효과를 나타냈다. 또한 Lee et al.(2015)은 검정콩을 홍국균으로 발효하였을 때 monacolin K, daidzein, 및 genistein 함량이 증가하였으며, *in vitro* 및 *in vivo* 실험결과 항비만 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한, Lee et al.(2015)는 *Kaempferia galanga*와 *Opuntia ficus indica* var. *saboten*에 존재하는 kaempferol이 3T3-L1 세포와 zebrafish에서 초기 지방세포분화를 억제함으로써 지질 축적을 억제하는 것으로 보고하였으며, Chang et al.(2011)은 고지방식이와 kaempferol을 함께 섭취한 쥐에서 간내의 PPARα 발현을 증가시켜 복부지방 축적과 고지혈증을 개선하는 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 *L. plantarum*으로 천년초 열매 분말을 발효시 총 폴리페놀 및 플라보노이드를 증가시키는 것으로 나타났으며, 특히 발효된 천년초 열매 분말에서 kaempferol 함량이 발효전과 비교하여 3.16배 증가한 것으로 나타난 것으로 보아, 이로 인해 3T3-L1 세포 내의 지질축적이 억제된 것으로 생각되어진다.

따라서, 천년초 발효물의 지방축적과 관련된 유전자 발현 기작 연구 및 *in vivo* 연구가 추가적으로 수행된다면 항비만 소재로써의 가능성이 있을 것으로 판단된다.

IV. 결론 및 요약

본 연구는 항비만 효과 증진을 위한 소재로써 *L. plantarum*으로 천년초 열매 분말을 발효시켜 품질특성 및 3T3L-1 세포를 이용하여 항비만 효능을 검토하였다. 그 결과 천년초 열매의 발효시간이 증가할수록 pH는 초기 4.77에서 점점 감소하여 발효 72시간째 3.63에 도달하였고, 유산균수는 발효 48시간까지 5.83×10^8 CFU/mL로 최대로 증가하였다가 발효 72시간째는 6.55×10^7 CFU/mL로 약간 감소하였다. 총폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거활성은 발효 초기에 비해 발효 48시간째 최대로 나타났으며, 48시간 발효한 천년초 열매 발효물을 HPLC로 기능성 물질을 분석한 결과, 주요성분은 hyperoside (quercetin 3-galactoside), luteolin 및 kaempferol가 검출되었다. 천년초 열매 발효물은 발효전과 비교시 hyperoside는 감소하였으나, luteolin 및 kaempferol은 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 천년초 열매 발효물을 3T3-L1 세포에 처리하여 항비만효과를 검토한 결과, 천년초 발효물 150 μg/mL 농도에서 비발효 천년초 대비 약 27.3%의 중성지방축적 억제효과를 나타내었으며, 이러한 중성지방축적 억제효과는 발효를 통해 증가된 총 폴리페놀 및 플라보노이드 물질과 특히, aglycone 형태인 kaempferol의 함량 증가 또한 항비만 효과도 영향을 미쳤을 것으로 보여지며, 천년초 열매 발효물은 항비만 소재로써의 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 과제는 전라북도 R&D지원사업의 지원(20170914-C1-025)에 의해 수행되었습니다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. rev2. Ch. 32, Association of Official Analytical Communities, Gaithersbrug, USA, pp 7-10

Azuma K, Nakayama M, Koshioka M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, Yamauchi Y, Ito H, Higashio H. 1999. Phenolic antioxidants from the leaves of Corchorus olitorius L. J. Agric. Food Chem., 47(10):3963-3966

Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 181:1999-1200

Braune A and Blaut M. 2016 Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. Gut Microbes.7(3):216-234

Cha MN, Jun HI, Lee WJ, Kim MJ, Kim MK, Kim YS. 2013.

Chemical composition and antioxidant activity of Korean cactus (*Opuntia humifusa*) fruit. Food Sci. Biotechnol., 22(2):523-529

Chang CJ, Tzeng TF, Liou SS, Chang YS, Liu IM. 2011. Kaempferol Regulates the Lipid-Profile in High-Fat Diet-Fed Rats through an Increase in Hepatic PPARα Levels. Planta Med. 77(17):1876-1882

Chen H, Zuo Y, Deng Y. 2001. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A., 913(1-2):387-395

Cho IK, Jin SW, Kim YD. 2009. Analysis of components in the parts of *Opuntia ficus indica* from Shinan Korea. Korean J. Food Preserv., 16(5):742-746

Choi I, Kim Y, Park Y, Seog H, Choi H. 2007. Anti-obesity activities of fermented soygerm isoflavones by Bifido-bacterium breve. Biofactors, 29(2-3):105-112

Haslam D. 2016. Weight management in obesity-past and present. Int. J. Clin. Pract., 70(3):206-217

Hwang HJ, Kang MS, Kim BK, Jung BM, Kim MH. 2012. The effect of *Opuntia humifusa* seed extracts on platelet aggregation and serum lipid level in ovariectomized rats. J. Life Sci., 22(12):1680-1687

Jan SY, Kim MH, Hong GJ. 2013. Quality changes of sulgidduk added Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) fruit powder during storage. Korean J. Food Cookery Sci., 29(5):501-509

Jeon BS, Park JW, Kim BK, Kim HK, Jung TS, Hahm JR, Kim DR, Cho YS, Cha JY. 2005. Fermented mushroom milk-supplemented dietary fiber prevents the onset of obesity and hypertriglyceridemia in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. Diabetes Obes. Metab., 7(6):709-715

Joo SK. 2016. Radical-scavenging activities of fermented cactus cladodes (*Opuntia humifusa* Raf.). Korean Soc. Food Sci. Nutr., 29(2):200-205

Jung BM, Shin MO, Kim HR. 2012. The effects of antimicrobial, antioxidant, and anticancer properties of *Opuntia humifusa* stems. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 41(1):20-25

Jung BM, Shin MO. 2011. Physiological activities of *Opuntia humifusa* petal. Korean J. Food Cookery Sci., 27(5):523-530

Jung YM, Lee DS, Kwon K. 2017. The Characterization of *L. plantarum*-fermented Opuntia humifusa. J. Korea Convergence Society. 8(1):107-114

Kamalakkannan S, Rajendran R, Venkatesh RV, Clayton P, Akbarsha MA. 2011. Effect of Caralluma fimbriata extract on 3T3-L1 pre-adipocyte cell division. Food and Nutrition Sciences, 2(4):329-336

Kang JG, Park CY. 2012. Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. Diabetes Metab. J., 36(1)13-25

Kasturi, R, Joshi VC. 1982. Hormonal regulation of stearoyl coenzyme Adesaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells. J. Biol. Chem., 257(20):12224-12230

Kim H, Park SH. 2009. Metabolic profiling and discrimination of two cacti cultivated in Korea using HPLC-ESI-MS and multivariate statistical analysis. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 52(4):346-352

Kim MH. 2014. Screening of biological activities of ethanol extracts from fermented Gastrodia elata Blume. Korean J. Food & Nutr., 27(5):837-844

Kim MH. 2015. Biological activity of extracts from fermented *opuntia humifusa* with 3 different. Korean J. Food Nutr., 28(4):620-627

Kim YJ, Park CI, Kim SJ, Ahn EM. 2014. Antioxidant and inflammatory mediators regulation effects of the roots of *Opuntia humifusa*. J Appl. Biol. Chem., 57(1):1-5

Kong BM, Park MJ, Min JW, Kim HB, Kim SH, Kim SY, Yang DC. 2008. Physico-chemical characteristics of white, fermented and red ginseng extracts. J. Ginseng Res., 32(3):238-243

Ladabaum U, Mannalithara A, Myer PA, Singh G. 2014. Obesity, abdominal obesity, physical activity, and caloric intake in US adults: 1988 to 2010. Am. J. Med., 127(8):717-727.

Lee G, Choi HY, Yang SJ. 2015. Effects of dietary and physical activity interventions on metabolic syndrome: A Meta-analysis. J. Korean Acad Nurs., 45(4):483-494

Lee Y, Oh J, Jeong YS. 2015. *Lactobacillus plantarum*-mediated conversion of flavonoid glycosides into flavonols, quercetin, and kaempferol in *Cudrania tricuspidata* leaves. Food Sci. Biotechnol., 24(5):1817-1821

Lee YJ, Choi HS, Seo MJ, Jeon HJ, Kim KJ, Lee BY. 2015. Kaempferol suppresses lipid accumulation by inhibiting early adipogenesis in 3T3-L1 cells and zebrafish. Food Funct., 6(8):2824-2833

Lee YS, Choi BK, Lee HJ, Lee DR, Cheng J, Lee WK, Yang SH, Suh JW. 2015. Monascus pilosus-fermented black soybean inhibits lipid accumulation in adipocytes and in high-fat diet-induced obese mice. Asian Pac. J. Trop. Med., 8(4):276-282

Lew EA. 1985. Mortality and weight: insured lives and the American Cancer Society studies. Ann. Intern. Med., 103(6):1024-1029

Matsuzawa Y, Shimomura I, Nakamura T, Keno Y, Kotani K, Tokunaga K. 1995. Pathophysiology and Pathogenesis of Visceral Fat Obesity. Obes. Res., 3(S2):187s-194s

Meckes-Lozoya M, Ibáñez-Camacho R. 1989. Hypoglucaemic activity of *Opuntia streptacanth*a throughtout its annual cycle. Am. J. Chin. Med., 17(3-4):221-224

Moreno MI, Isia MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000.

Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentian. J. Ethnopharmacol., 71(1-2):109-114

Park MJ, Lee SP. 2013. Physicochemical characteristics of cheonnyuncho fruit (*Opuntia humifusa*) fermented by *Leuconostoc mesenteroides* SM. Korean J. Food Sci. Technol., 45(4):434-440

Park MK, Lee YJ, Kang ES. 2005. Hepatoprotective effect of Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) extract in rats treated carbon tetrachloride. Korean J. Food Sci. Technol., 37(5): 822-826

Pellegrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2-azinobis (3-ethylene-benzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. Methods Enzymo, 299:379-389

Ross JA and Kasum CM. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. Annu. Rev. Nutr. 22:19-34

Shin DS and Han GJ. 2016. Chemical comsitions and antioxidant activities of cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) stems and fruit. Korean J. Food Preserv. 23(1): 89-96.

Wang LC, Pan TM, Tsai TY. 2018. Lactic acid bacteria-fermented product of green tea and Houttuynia cordata leaves exerts antiadipogenic and anti-obesity effects. J. Food Drug Anal., 26(3):973-984

Yoon JA, Son YS. 2009. Effects pf fruits and stems of *Oputia ficus-indica* on blood glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 38(2):146-153

Yun JW. 2010. Possible anti-obesity therapeutics from nature-a review. Phytochemistry, 71(14-15):1625–1641

World health organization (WHO). Global Health Observatory (GHO) data. Top 10 causes of death. Available from: http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death, [accessed 2018.11.02.]

Received November 26, 2018; revised January 28, 2019; accepted February 8, 2019