Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 31, No. 6, 219-224, 2018
https://doi.org/10.5806/AST.2018.31.6.219

Analysis of Marker Components of Fermented *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Stem Extracts

Dong Won Shin, Sang Ho Lee, Soyeon Lee, and Eun Hye Han★
R&D Center, Koreaeundan Co., Seongnam-si, Gyeonggi-do 13207, Korea
(Received October 5, 2018; Revised November 21, 2018; Accepted November 23, 2018)

유산균 발효에 의한 손바닥선인장 줄기추출물의 지표물질 함량 변화 분석

신동원 · 이상호 · 이소연 · 한은혜★
고려은단 연구소
(2018. 10. 5. 접수, 2018. 11. 21. 수정, 2018. 11. 23. 승인)

Abstract: The fruit and stem of *Opuntia ficus-indica* var. *aboten* (OFS), a native plant of Jeju Island, are considered a safe food source. Moreover, stem extracts have been previously reported to possess a variety of biological effects (e.g. anti-inflammatory and anti-oxidant, including the ability to partially ameliorate cognitive impairment), suggesting that this plant may have utility as a functional food. The present study investigated whether fermentation by lactic acid bacteria enhances the biological effects of OFS extracts. The acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity of fermented or non-fermented OFS extracts was evaluated, and the content of marker components dihydrokaempferol (DHK) and quercetin-3-methyl ether (3-MeQ) was analyzed using high-performance liquid chromatography. Fermented (relative to non-fermented) OFS extracts exhibited improved AChE inhibitory activity (IC_{50}=28.35 mg/mL), with AChE inhibitory activity resulting from fermentation by *L. plantarum* (IC_{50}=12.56 mg/mL) exceeding that resulting from fermentation by *L. fermentum* (IC_{50}=17.71 mg/mL). Furthermore, fermented (relative to non-fermented) OFS extracts exhibited a 16.7 % increase in DHK content, and 3-MeQ content of OFS extracts fermented by *L. plantarum* and *L. fermentum* increased by 28.6 % and 21.4 %, respectively. Therefore, OFS stem extract AChE inhibitory activity, as well as DHK and 3-MeQ content, was enhanced by fermentation with *Lactobacillus* spp. This suggests that fermented OFS extracts may contribute to prevention or improvement of cognitive impairment. These data are anticipated to be useful in the development of enhanced-efficacy OFS products.

요 약: 손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)은 제주도 자생식물로 섭취가 가능하고 항염 및 항산화, 인지개선 등 다양한 효능이 보고되었다. 본 연구에서는 손바닥선인장 줄기추출물의 지표물질 함량과 인지개선 효능을 높이기 위해 유산균 발효를 수행하였으며, 비발효추출물과 발효추출물 간 지표물

★ Corresponding author
Phone : +82-31-743-1155 Fax : +82-31-741-7606
E-mail : ehhan@eundan.co.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.

www.kci.go.kr

질 함량 차이를 비교하고 acetylcholinesterase (AChE)의 저해 활성도를 평가하여 유산균 발효가 인지장애 개선에 미치는 효과를 연구하였다. 지표물질로는 손바닥선인장 줄기 중 함량이 높은 dihydrokaempferol (DHK)과 항산화 효능이 우수하다고 알려진 quercetin-3-methyl ether (3-MeQ)를 선정하였으며, 함량은 HPLC-PDA (280 nm, 360 nm)로 측정하였다. 실험 결과, 발효추출물의 DHK 함량은 비발효추출물에 비해 16.7 % 증가하였고, 3-MeQ 함량은 *L. plantarum*과 *L. fermentum* 발효추출물에서 각각 28.6 %, 21.4 % 증가하였다. 또한, 발효추출물의 AChE 저해 활성이 비발효추출물 (IC_{50}=28.35 mg/mL)보다 높았으며, 발효추출물 중에서도 *L. plantarum* 발효추출물 (IC_{50} =12.56 mg/mL)이 *L. fermentum* 발효추출물 (IC_{50} =17.71 mg/mL)보다 높은 AChE 저해 활성을 보였다. 따라서 손바닥선인장 줄기추출물은 유산균 발효에 의해 지표성분 함량이 증가되었으며, AChE 저해 활성이 높아지고 이로 인해 인지장애 개선 효과가 나타난 것으로 사료된다. 이러한 결과는 효능이 향상된 고부가가치의 손바닥선인장 제품 개발에 유용한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

Key words: *opuntia ficus-indica* var. *saboten,* dihydrokaempferol, quercetin-3-methyl ether, fermentation, cognitive function

1. 서 론

손바닥선인장은 제주도에서 자생하는 다년초로서 민간에서 기관지, 천식, 위염, 신장염, 당뇨 등의 증상에 효능이 있는 것으로 알려져 있다.[1] 최근 손바닥선인장에 대한 연구가 활발히 진행되면서 위 점막 보호 및 항염증 작용,[2, 3] 면역체계 개선 효과,[4] 인지 개선[5] 등에 대한 다양한 효능이 보고되었다. 특히 인지장애 개선과 관련하여 손바닥선인장의 열매와 줄기 추출물이 항산화 효과와 신경 보호 효과가[6] 있으며, 마우스를 이용한 동물실험에서 손바닥선인장 줄기 추출물이 장기 기억을 향상시켰다.[5]

현대사회는 인구 고령화 추세로 인해 전세계적으로 치매환자가 급증하고 있으며, 인지장애 개선에 효과가 있는 식품을 소재로 한 제품 개발이 시급한 시점이다. 따라서 인지장애 개선에 효과가 있는 식품 소재에 대한 관심이 고조되면서, 지표물질 함량을 높이고 효능을 증가시키기 위한 연구들이 진행되어 왔다. 기존에 발표된 연구 결과에 따르면 천연물 식품 소재나 일부 한약재 등은 발효에 의해 지표성분 함량이 증가되고 생리활성이 강화되었다.[7,8] 또한 유산균, 효모, 곰팡이 등 다양한 균주를 발효에 적용하여 새로운 발효 산물을 얻거나 시너지 효과에 따른 생리활성의 증가 유도하였다.[9]

이에 본 연구에서는 손바닥선인장 줄기추출물의 지표물질 함유량과 효능을 증가시키기 위한 일환으로 유산균 발효를 수행하였다. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 이용하여 손바닥선인장 발효추출물과 비발효추출물 간의 지표물질 함량 변화를 확인하고, AChE 저해 활성도 평가를 통해 발효추출물의 인지장애 개선에 대한 효과를 확인해 보고자 하였다. 발효에 사용한 균주는 산업현장에서 식용 균주로 사용되고 있는 *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus fermentum*으로, 손바닥선인장 줄기추출물을 발효시킨 다음, HPLC를 이용하여 지표성분의 함량을 분석하였다. 지표성분으로는 손바닥선인장 줄기추출물에서 함량이 높은 dihydrokaempferol (DHK)과 항산화 효능이 우수하다고 보고된 quercetin-3-methyl ether (3-MeQ)을 선정하였다.[10] 지표 물질의 함량은 HPLC-PDA (280 nm, 360 nm)로 method validation[10]한 시험법으로 측정하였다. 연구 결과를 함께 비교 분석함으로써 유산균 발효 전후 손바닥선인장 추출물 내 지표성분 함량 변화와 인지장애 개선 효과 간의 상관관계를 확인하였다.

2. 실 험

2.1. 실험재료

손바닥선인장 줄기추출물 및 2 종의 유산균에 의한 발효추출물은 SK바이오랜드 (Ansan, Korea)에서 제공받았으며, 2 종의 유산균에 의한 발효추출물은 37°C에서 24시간, 접종 및 배양되었다.

2.2. 시약 및 기기

HPLC 함량분석에 사용한 표준물질인 dihydrokaempferol (DHK)과 quercetin-3-methyl ether (3-MeQ)은 Sigma-

www.kci.go.kr

Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. AChE 저해 활성 평가에 사용된 화합물인 Sodium phosphate와 ATCI (acetylcholine iodide), AChE (Acetylcholinesterase), DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid))은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

HPLC 분석기기는 Waters ACQUITY Arc System (Waters Corporation, Milford, MA, USA)의 2998 photodiode array detector (PDA), Sample Manager FTN-R (auto sampler), Quaternary Solvent Manager-R (quaternary pump), column heater를 사용하였으며 HPLC column은 Agilent사의 ZORBAX Eclipse plus C_{18} column (250 × 4.6 mm, 5 μm, Agilent, USA)을 사용하였다.

2.3. HPLC 함량분석

표준액 분석을 위해 지표성분인 DHK과 3-MeQ의 표준품을 5, 12.5, 20 μg/mL 농도로 조제하였다. 검액은 *L. plantarum*과 *L. fermentum*을 이용해 발효한 손바닥선인장 줄기추출물(발효추출물)과 유산균을 주입하지 않은 손바닥선인장 줄기추출물(비발효추출물)을 각각 0.5 g을 취하여 50% 메탄올 10 mL로 20 분간 초음파 추출하여 녹인 다음 20 mL로 표선하고 0.20 μm syringe filter (Satorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany)로 여과하여 준비하였다. 각 검액은 3개씩 조제하여 분석에 사용하였다.

HPLC 분석법은 기존에 알려진 손바닥선인장 줄기추출물 분석법을 사용하였다.[10] 시료 분석을 위해 역상 컬럼인 C_{18} column (250 × 4.6 mm, 5 μm)을 사용하였고 온도는 30 °C로 설정하였으며, 이동상으로는 1%의 phosphoric acid (이동상 A)와 acetonitrile (이동상 B)을 사용하여 1.0 mL/min 유속으로 시료 20 μL를 주입하여 gradient 조건으로 분석하였다(*Table* 1). 분석시간대별 이동상 조건은 *Table* 1와 같다. DHK와 3-MeQ 분석은 최대 흡광도를 나타내는 280 nm와 360 nm에서 각각 크로마토그램을 추출하여 면적을 구하여 농도별 표준액의 검량곡선으로부터 각 화합물의 함유량을 계산하였다.[10] 각 검량곡선에 각 3회 반복 분석한 비발효추출물, *L. plantarum* 발효추출물, *L. fermentum* 발효추출물 검액을 적용하여 함량을 산출하였다.

Table 1. Content analytic condition of 3, 5-DCQA

Injection volume	20 μL
Column temperature	30°C
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	Gradient system
Column	ZORBAX Eclipse plus C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm, Agilent)
Wavelength	280 nm, 360 nm

Time (min)	% A (1% phosphoric acid)	% B (acetonitrile)
0	90	10
40	60	40
60	0	100
70	90	10

2.4. Acetylcholinesterase 저해 활성 평가

AChE 저해 활성 평가는 AChE에 의해 acetylcholine iodide가 thiocholine으로 분해되는데, 이를 DTNB와 반응시켜 생성된 5-thio-nitrobenzoate의 흡광도 변화를 확인하는 Ellman법[11]을 변형하여 사용하였다. 시료의 저해 활성을 측정하기 위하여 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0)를 이용하여 각 농도별로 희석하여 검액을 준비하였다. 96-well microplate에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) 10 μL와 시료 120 μL, AChE (0.2 U/mL) 20 μL를 순서대로 넣어준 다음 상온에서 10 분간 반응시켰다. 반응물에 3 mM DTNB 10 μL와 7.5 mM ATCI 40 μL를 가해준 다음 37 °C에서 30 분간 반응시키고 spectrophotometer를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물 색에 의한 수치보정을 위하여 blank 그룹에는 ATCI 대신 buffer를 처리하였다. AChE 저해 활성 백분율은 아래의 공식에 따라 계산하였다.

$$\text{AChE 저해 활성(\%)} = 1 - \left(\frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{시료 무 첨가군의 흡광도}} \right)$$

2.5. HPLC 함량 분석의 통계처리

검액의 분석은 각각 3회씩 진행하였고, 표준액 검량곡선을 사용하여 함량을 계산하였다. 각 검액의 함량 평균은 Microsoft Excel 프로그램의 수식을 이용하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유산균발효에 의한 지표성분 함량 변화

지표성분인 DHK와 3-MeQ의 표준시료를 각각의 크로마토그램으로 얻은 값으로 검량곡선을 구하였다. DHK은 y=44796x – 7072.7, 상관계수 (R^2)=0.9999로 나타났으며, 3-MeQ은 y=29739x + 52, 상관계수 (R^2)=

www.kci.go.kr

Table 2. Content of Dihydrokaempferol at 280 nm

Fermentation	Retention time (min)	Content (mg/g)
Non-fermentation	23.402	0.12 ± 0.001
L. plantarum	23.394	0.14 ± 0.001
L. fermentum	23.377	0.14 ± 0.002

Table 3. Content of Quercetin-3-methyl ether at 360 nm

Fermentation	Retention time (min)	Content (mg/g)
Non-fermentation	23.402	0.14 ± 0.002
L. plantarum	23.394	0.18 ± 0.001
L. fermentum	23.377	0.17 ± 0.002

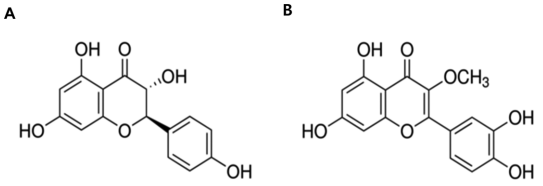

Fig. 1. Structure of Dihydrokaempferol (A) and Quercetin-3-methyl ether (B).

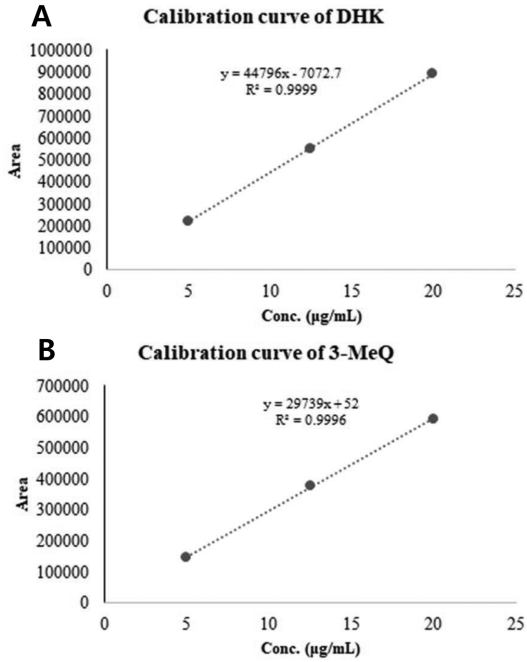

Fig. 2. Calibration curves of DHK (A) and 3-MeQ (B).

0.9996로 나타나 우수한 직선성을 보였다. 표준용액 DHK와 3-MeQ의 retention time은 각각 23.397분, 29.818분으로 손바닥선인장 추출물의 DHK와 3-MeQ의 retention time과 유사하였다.

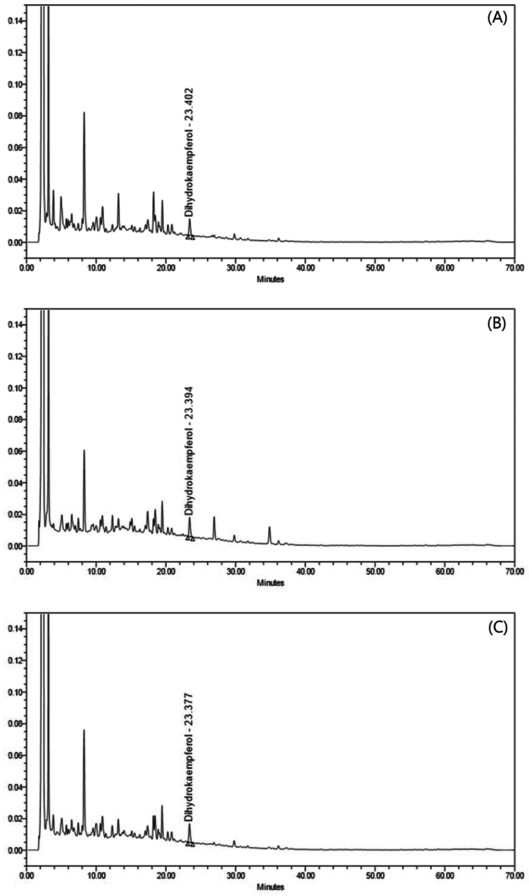

Fig. 3. Chromatograms of DHK of non-fermented (A), fermented with *L. plantarum* (B), and fermented with *L. fermentum* (C) at 280 nm.

손바닥선인장 줄기추출물의 DHK의 함량은 비발효추출물에서 0.12±0.001 mg/g, *L. plantarum*과 *L. fermentum* 발효추출물에서 각각 0.14±0.001 mg/g, 0.14±0.002 mg/g으로 발효추출물의 DHK의 함량이 비발효추출물에 비해 16.7 % 증가하였다(*Table* 2). 또한 3-MeQ의 함량의 경우에도 비발효추출물이 0.14±0.002 mg/g인데 반해, *L. plantarum* 발효추출물은 0.18±0.001 mg/g, *L. fermentum* 발효추출물은 0.17±0.002 mg/g로 각각 28.6 %, 21.4 % 증가하였다(*Table* 3). 따라서 손바닥선인장 줄기추출물 지표성분인 DHK와 3-MeQ의 함량이 유산균 발효에 의해 증가한 것으로 사료된다.

3.2. Acetylcholinesterase 저해 활성도 평가

Acetylcholinesterase (AChE)는 신경 기능과 관련된

www.kci.go.kr

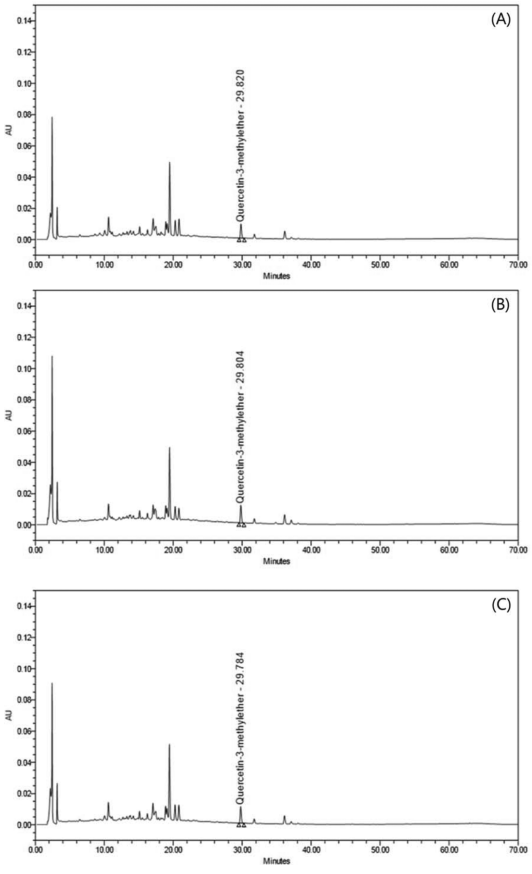

Fig. 4. Chromatograms of 3-MeQ of non-fermented (A), fermented with *L. plantarum* (B), and fermented with *L. fermentum* (C) at 360 nm.

중요한 효소의 하나로 신경전달물질인acetylcholine을 가수분해하는 serine protease이다. AChE의 활성이 높으면 신경연접 내 acetylcholine 수준이 비정상적으로 감소하게 되어 정상적인 콜린성 신경신호전달을 방해하게 되고, AChE 효소 기능을 억제시키면 acetylcholine의 분해를 막아 신경연접 내의 acetylcholine 농도를 증가시켜 인지 기능의 향상을 유도할 수 있다. 이러한 기전으로 인해 AChE에 대한 억제제가 치매 치료제로도 개발되었다. 따라서 본 연구에서는 손바닥선인장 줄기추출물의 유산균 발효에 의한 인지능력 개선 효과를 확인하고자 AChE 저해 활성도를 평가하였다. *Fig.* 5에서 확인할 수 있는 바와 같이 발효추출물의 AChE 저해 활성도가 비발효추출물에 비해 높았으며, 발효 추출물 중에서도 *L. plantarum*를 이용한 발효추출물이 *L. fermentum* 발효추출물보다 AChE 저해 활성도가 높았다. 또한 *L. plantarum* 발효추출물 (IC_{50}=12.56 mg/mL)과 *L. fermentum* 발효추출물 (IC_{50}=17.71 mg/mL)의 IC_{50} 값은 비발효추출물 (IC_{50}=28.35 mg/mL)의 IC_{50} 값에 비해 2.26배, 1.60배 증가하였다 (*Table* 4). 이와 같은 결과는 손바닥선인장 줄기추출물은 발효에 의해서 AChE 저해 활성도가 더욱 증가하며, 인지능력 개선에도 보다 효과적으로 작용할 것으로 사료된다.

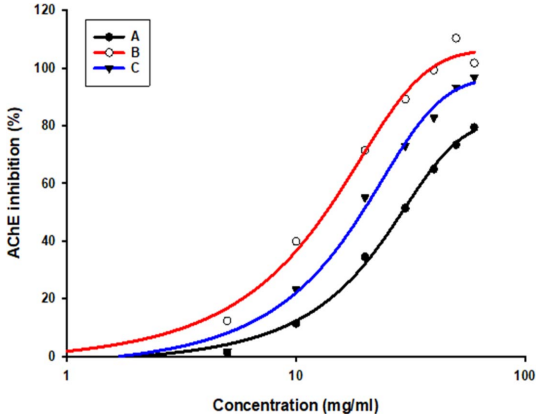

Fig. 5. Acetylcholinesterase inhibitory activity of OFS stem extract: non-fermented (A), fermented with *L. plantarum* (B), and fermented with *L. fermentum* (C).

Table 4. AChE inhibitory activity of OFS stem extracts

Fermentation	IC_{50} (mg/mL)
Non-fermentation	28.35
L. plantarum	12.56
L. fermentum	17.71

4. 결 론

기존 연구에서 인삼을 발효하였을 때 흡수율이 증가[13]하였고, 항염·항통증[14] 및 항산화[15] 효과가 향상되는 것이 확인된 보고가 있어 본 연구에서는 손바닥선인장 줄기추출물을 *L. plantarum*과 *L. fermentum*로 유산균 발효하였을 때 인지능력 개선 효능의 변화를 확인하기 위해 AChE 저해 활성을 평가하였다. 유산균 발효추출물은 비발효추출물에 비해 높은 AChE 저해 활성이 보였으며, *L. plantarum* 발효추출물 (IC_{50}=12.56 mg/mL)이 *L. fermentum* 발효추출물 (IC_{50}=17.71 mg/mL)보다 상대적으로 높은 AChE 저해 활성도를 나타냈다. 따라서 손바닥선인장 발효추출물은 비발효추출물에 비해 AChE 저해 활성이 더욱 증가하여 인지장

www.kci.go.kr

애 개선에 보다 효과적일 것으로 사료된다.

또한, HPLC를 이용하여 비발효추출물과 유산균 발효추출물 간의 지표성분 함량을 비교하였다. 지표물질은 손바닥선인장 줄기 및 열매추출물에 대한 구조분석 연구[12]와 HPLC-PDA로 손바닥선인장 줄기추출물의 성분을 profiling하고 method validation한 연구[10]를 기반으로 손바닥선인장 줄기 중 함량이 높은 DHK와 항산화 효능이 우수하다고 알려진 3-MeQ로 선정하였다. 본 연구에서는 각각의 최대 흡광도인 280 nm와 360 nm에서 지표성분으로 선정된 DHK와 3-MeQ를 HPLC로 함량을 분석하였다. 손바닥선인장 추출물의 DHK 함량은 비발효추출물 대비 *L. plantarum*과 *L. fermentum* 발효추출물 모두 동일하게 16.7% 증가하였고, 3-MeQ의 함량은 비발효추출물 대비 *L. plantarum*과 *L. fermentum* 발효추출물에서 각각 28.6 %, 21.4 % 증가하였다. 이러한 결과는 유산균 발효추출물의 지표물질 함량이 비발효추출물에 비해 높기 때문에 손바닥선인장 줄기추출물은 발효를 통하여 항산화, 인지능력 개선 등 관련 효능을 증가시킬 수 있다는 것을 시사해 준다.

결론적으로 손바닥선인장 줄기추출물은 유산균 발효에 의해서 지표성분의 함량과 인지개선 효과가 증가되었다. 이는 효능이 향상된 고부가가치의 손바닥선인장 제품 개발에 유용한 자료로 활용될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 서울시 산학연 협력사업 (CI152006)의 지원에 의한 연구 결과로 이에 감사드립니다.

References

1. D. J. Kim, J. H. Jung, S. G. Kim, H. K. Lee, S. K. Lee, H. D. Hong, B. Y. Lee, and O. H. Lee, *Korean J. Food Preserv.,* **18**(3), 366-373 (2011).
2. E. H. Park, J. H. Kahng, S. H. Lee, and K. H. Shin, *Fitoterapia,* **72**(3), 288-290 (2001).
3. E. H. Park, J. H. Kahng, and E. A. Paek, *Arch. Pharm. Res.,* **21**(1), 30-34 (1998).
4. M. C. Kwon, J. G. Han, H. S. Jeong, S. A. Qadir, Y. B. Choi, J. R. Ko, T. I. Lim, and H. Y. Lee, *Korean J. Medicinal Crop Sci.,* **16**(1), 1-8 (2008).
5. J. M. Kim, D. H. Kim, S. J. Park, D. H. Park, S. Y. Jung, H. J. Kim, Y. S. Lee, C. Jin, and J. H. Ryu, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry,* **34**(6), 1011-1017 (2010).
6. H. Dok-Go, K. H. Lee, H. J. Kim, E. H. Lee, J. Lee, Y. S. Song, Y. H. Lee, C. Jin, Y. S. Lee, and J. Cho, *Brain Res.*, **965**(1-2), 130-136 (2003).
7. M. R. Park, C. Yoo, Y. N. Chang, and B. Y. Ahn, *Korean J. Plant Res.,* **25**(4), 379-386 (2012).
8. S. S. Suhr and S. K. Jung, *Kor. J.Orient. Int. Med,* **30**, 465-680 (2009).
9. M. Tsukahara, N. Shinzato, Y. Tamaki, T. Namihira, and T. Matsui, *Appl. Biochem. Biotechnol.,* **158**(2), 476-482 (2009).
10. D. H. K. Seungbae Park, Changbae Jin, Hyoung Ja Kim, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **46**(2), 210-219 (2017).
11. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr, and R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.,* **7**(1), 88-95(1961).
12. E. H. Lee, H. J. Kim, Y. S. Song, C. Jin, K. T. Lee, J. Cho, and Y. S. Lee, *Arch. Pharm. Res.,* **26**(12), 1018-1023 (2003).
13. H. Jin, J. H. Seo, Y. K. Uhm, C. Y. Jung, S. K. Lee, and S. V. Yim, *J. Ethnopharmacol.,* **139**(2), 664-647 (2012).
14. H. J. Jung, H. Choi, H. W. Lim, D. Shin, H. Kim, B. Kwon, J. E. Lee, E. H. Park, and C. J. Lim, *J. Pharm. Pharmacol*., **64**(5), 756-62 (2012).
15. S. J. Hur, S. Y. Lee, Y. C. Kim, I. Choi, and G. B. Kim, *Food Chem*, **160**, 346-356 (2014).

Authors' Positions

Shin Dong Won : Research Scientist
Sang Ho Lee : Research Scientist
Soyeon Lee : Research Scientist
Eun Hye Han : Principal Research Scientist

www.kci.go.kr