

발효 천마 에탄올 추출물의 생리활성 검정

*김 미 현

경일대학교 식품과학부

Screening of Biological Activities of Ethanol Extracts from Fermented *Gastrodia elata* Blume

*Mi Hyun Kim

School of Food Science, Kyungil University, Gyeongsan 712-701, Korea

Abstract

This study was carried out to analyze the differences in *p*-hydroxybenzyl alcohol (HBA) content, antitumor and anti-obesity activities and tyrosinase inhibitory activity between non-fermented *G. elata* (NFGP) and fermented *G. elata* powder. The HBA content, which is an index-component of *G. elata* decreased from 1.58 mg/g before fermentation to 1.07, 0.32, and 0.13 mg/g after the 1st fermentation (1st FGP), 2nd fermentation (2nd FGP) and 3rd fermentation (3rd FGP), respectively. The anti-proliferation effects on the cell lines HT29 and AGS were significantly higher for the fermented *G. elata* than the NFGP. The antitumor activity was also increased in a fermentation number-dependent manner. During adipocyte differentiation, the ethanol extract of the 3rd FGP inhibited lipid accumulation in 3T3-L1 cells significantly better than NFGP and the 1st FGP, treated at the concentration of 10 µg/mL. The tyrosinase inhibitory activity of the 2nd FGP at 600 µg/mL over was higher than that of kojic acid. At the concentration of 1,000 µg/mL, the tyrosinase inhibitory activity was increased in a fermentation number-dependent manner. From these results, the fermented *G. elata*, especially the 3rd FGP, is expected to be good candidate for the development of functional food and agents with antitumor, anti-obesity, and tyrosinase inhibitory potential.

Key words: antitumor activity, anti-obesity activity, tyrosinase inhibition, *Gastrodia elata* Blume, fermentation

서 론

천마(*Gastrodia elata* Blume)는 난초과에 속하는 다년생 초본식물로 줄기의 색깔에 따라 홍천마 및 청천마(*Gastrodia elata*)와 녹천마(*Gastrodia gracilis*)로 구분된다. 천마는 엽록소와 뿌리가 없어 독자적인 생존이 어려워 뽕나무 버섯균(*Armillaria* sp.)과 공생하며 생육한다. 예로부터 천마의 줄기와 괴경은 약용으로 이용되어져 왔으며, 고혈압, 당뇨, 두통, 신경성질환, 간질, 중풍 등의 증상에 효능이 있는 것으로 알려져 있다(Lee YB 1990).

천마에 함유되어 있는 약리성분으로는 ergothioneine, gastrodin, vanillyl alcohol, vanillin, *p*-hydroxybenzyl alcohol과 페놀 배당

체 등이 있다(Taguchi 등 1996; Lee 등 2006; Lee 등 2012; Kim & Park 2013). Gastrodin은 천마에 가장 많이 함유되어 있는 물질로 항산화, 항경련, 항비만 및 항염증 활성이 있으며, 쥐의 혈관뇌관문을 통과하여 *p*-hydroxybenzyl alcohol로 분해된다(Liu 등 2002; Kim & Park 2013). Vanillyl alcohol은 DPPH, superoxide 및 hydroxyl 라디칼 소거 활성능이 높으며, 그 외에도 혈관 생성 억제 기능과 항염증 효과가 있다(Liu & Mori 1993). 천연의 수용성 아미노산인 ergothioneine은 강력한 항산화 활성과 항혈전, 신경전달 및 면역 조절작용과 세포 DNA 손상에 대한 보호 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Liu 등 2002; Franzoni 등 2006; Martin KR 2010).

최근에는 천마의 기능성 성분 및 생리활성에 대한 다양한

* Corresponding author: Mi Hyun Kim, School of Food Science, Kyungil University, Gyeongsan 712-701, Korea. Tel: +82-53-600-5741, Fax:+82-53-600-5759, E-mail: mhkim306@kiu.kr

연구가 이루어지고 있으며, 천마를 가공한 제품들에 대한 관심도 증가하고 있다. 천마에 관한 연구로는 건조방법에 따른 천마의 품질과 성분 변화를 살펴본 연구(Choi 등 2011), 천마 추출물의 성분 분석과 항균, 혈당 저하 및 암세포 증식 억제 효과를 보고한 연구(Kang 등 2002), 재배조건과 수확시기에 따른 천마의 기능성 물질 함량의 변화(Kim & Park 2013)와 천마 추출물의 항산화 효과와 항암 활성(Heo 등 2006)을 검증한 연구, 흰쥐의 혈청 및 간 조직에서 천마 분말의 지질 저하 효과(Cho 등 2008), 발효 천마 분말의 품질특성을 살펴본 연구(Kim 등 2010) 및 발효 천마의 총 폴리페놀 함량 변화와 라디칼 소거능(Park 등 2012)을 분석한 연구 등이 있다.

이와 같이 천마의 생리활성을 검증하기 위한 연구는 다소 이루어지고 있으나, 식용미생물이나 효모를 이용한 천마 발효물의 생리활성에 관한 연구는 부족한 실정이다. 천마의 소비 확대와 부가가치를 증대시키기 위해서는 천마를 이용한 다각도의 활용적인 연구가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 식용미생물인 상황버섯균사체(*Phellinus linteus*)를 이용하여 천마를 발효시킴으로써 발효를 통한 천마 유효성분의 변화와 항암 및 항비만 효과, 미백 활성을 분석하여 기능성 식품 및 신약 개발 소재로서의 활용성을 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 발효균주

2012년 무주안성 천마영농조합법인에서 재배 수확한 건조 천마(*Gastrodia elata* Blume) 슬라이스를 구입하여 실험재료로 이용하였다. 천마 분말은 건조 천마 슬라이스를 증류수로 세척하고, 70°C 열풍건조기로 수분율이 7%가 되도록 건조한 후, 80~100 mesh 정도의 입자 크기로 분쇄하여 제조하였다.

발효균주인 상황버섯균사체(*Phellinus linteus*)는 PDA 배지에 접종하여 25°C에서 7일 동안 배양한 후 cork borer로 절취하였다. 이후 균사체를 증류수 1 L에 당 30 g을 포함하는 배양배지에 5~10%(w/v)로 접종하여 25~30°C의 배양기에서 4~7일간 배양하였다. 배양한 균주는 분쇄기로 균질한 후 1 L를 배양배지 200 L가 들어있는 액체배양기에 접종하고, 25°C에서 4~7일간 배양하여 종균으로 사용하였다.

2. 발효 천마 분말 제조

균사체 배양액에 멸균처리한 천마 분말을 수분율이 15~30% 되도록 혼합한 후, 25°C, 습도 65~80%에서 7일간 발효하였다. 1차 발효 후 발효분말의 수분율이 7% 이하가 되도록 70°C에서 8~12시간 열풍건조하고, 121°C에서 15분 동안 멸균하였다. 1차 발효 천마 분말은 동일한 발효조건으로 2회 반복 발효한 후, 멸균하여 동결건조한 후 냉동보관하면서 시료로 사용하였다.

3. 시료 에탄올 추출

천마 분말과 1차, 2차 및 3차 발효 천마 분말의 에탄올 추출물은 시료 80 g에 70% 에탄올 800 mL를 가하여 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물은 5,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상층액을 수집하고, 여과지(Whatman No. 4)로 여과하여 회전감압농축기(EYELA, Rikakikai, Co., Japan)로 농축하였다. 농축된 시료는 동결건조한 다음 -20°C에서 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

4. 천마의 유효성분 함량 분석

천마에 함유된 지표성분인 *p*-hydroxybenzyl alcohol의 함량을 측정하였다. 비발효 및 발효 천마 분말을 분쇄하여 500 µm 이하로 정선된 시료 1 g을 3 반복으로 취하여 삼각플라스크에 넣고 메탄올 30 mL를 첨가하였다. 시료용액은 shaking incubator에서 180 rpm으로 24시간 동안 3회 추출하였다. 추출액은 100 mL로 정용하고, 0.45 µm filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 표준품은 *p*-hydroxybenzyl alcohol(Sigma-Aldrich Co., USA)를 사용하였다. HPLC 분석 조건은 Table 1과 같다. HBA 검량선은 모두 $R^2=0.9999$ 이상의 직선성을 나타내었다.

5. 암세포 증식 억제 효과 측정

세포주는 인체 대장암세포주인 HT29(human colon adenocarcinoma), 인체 위암세포주인 AGS(human stomach adenocarcinoma), 인체 자궁암세포주인 HeLa(human cervix adenocarcinoma)와 마우스 유래 태자세포인 NIH3T3를 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. HT29, AGS 및 HeLa 세포주는 배양액으로 10% fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. NIH3T3 세포주는 DMEM 배지에 10% bovine calf serum(BCS)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 각 세포주는 petri dish에서 주 2~3회 배지를 교환하며 배양하다가 5×10⁴ cells/mL 정도로 증식되면 phosphate buffered saline(PBS)로 2번 세척하고, trypsin-ethylenediamine

Table 1. Operating conditions of HPLC

Parameter	Conditions
Column	Zorbax eclipse XDB-C ₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 µm)
Column temperature	25°C
Injection volume	10 µL
Mobile phase	Water-CH ₃ CN (99:1, v/v)
Flow rate	1 mL/min
Wave length	270 nm

tetraacetic acid(EDTA, Gibco, Grand Island, NY, USA)를 처리하여 세포를 분리한 후, 세포배양용 petri dish에 10 mL를 분주하여 배양하였다.

발효 천마 에탄올 추출물의 암세포 증식 억제 효과는 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-yl tetrazolium bromid) assay에 의해 측정하였다. 각 세포주를 1×10^4 cells/well의 농도로 96 well plate의 각 well 당 200 μ L씩 접종하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배지에 희석한 시료를 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 μ g/mL의 농도로 배양액에 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 이후 각 well에 MTT 100 μ L를 첨가하여 3시간 배양하였다. 배양액의 상층액을 제거한 다음 dimethyl sulfoxide(DMSO) 100 μ L를 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 암세포 성장 억제율은 대조군의 세포주를 100%로 하여 상대적인 성장 억제율을 산출하였다.

6. XTT assay

발효 천마 에탄올 추출물의 항비만 활성을 평가하기 위해 먼저 3T3-L1 지방세포에 대한 발효 천마 추출물의 세포독성을 평가하였다. 세포독성 평가는 XTT[2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carbox-anilideinnersalt] assay kit를 이용하였다. 3T3-L1 지방세포는 1×10^5 cell 농도로 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 1 mL XTT reagent와 20 μ L PMS reagent를 혼합하여 working solution을 만든 후, 각 well에 배지 부피의 20%에 해당하는 양을 혼합하였다. 혼합액은 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 배양한 후 450 nm 흡광도 측정값에서 690 nm의 흡광도 측정값을 제하여 결과 값으로 산출하였다.

7. 항비만 활성

발효 천마 에탄올 추출물의 항비만 활성을 평가하기 위해 사용한 마우스 유래 섬유아세포인 3T3-L1 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 3T3-L1 전구지방세포(pre-adipocyte)는 DMEM에 10% BCS와 1% penicillin-streptomycin(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 첨가한 배지에서 배양하다가 100% confluence 상태가 되면 2일 간 배양한 후 DMEM에 분화유도물질로 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μ M dexamethasone 및 5 μ g/mL insulin과 발효 천마 에탄올 추출물을 처리하여 지방세포로의 분화를 유도하였다. 이후 2일마다 10% FBS, 5 μ g/mL insulin 및 여러 농도의 시료 추출물이 함유된 DMEM 배지로 배양하면서 지방축적량의 변화를 관찰하였다.

지방세포의 지방축적량의 측정은 Blumberg 등(2006)의 방법에 의해 수행되었다. 즉, 12 well plate에 분화된 3T3-L1 세

포의 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 10% formaldehyde를 처리하여 5분 간 상온에서 방치하였다. 다시 PBS로 세척한 후 10% formaldehyde를 넣고 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 10% formaldehyde를 제거하고 PBS로 2번 세척하여 완전히 건조시켰다. 건조된 세포에 Oil red O working solution을 500 μ L씩 첨가하고, 30분 간 실온에서 배양하여 세포 내 축적된 지방성분을 염색시켰다. 이후 100% isopropanol을 첨가하여 세포 내 염색된 Oil red O working solution을 제거하고 증류수로 3회 세척한 다음, UV/Vis spectrophotometer(Milton Roy, Inc., Rochester, NY, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 미백 활성

시료 추출물의 Tyrosinase 저해 활성은 Yagi 등(1986)의 방법에 의해 측정하였다. 반응구에는 0.5 mL의 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8), 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(50 U/mL) 0.2 mL를 첨가하였다. 반응액을 25°C에서 2분 간 방치한 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Kojic acid는 곰팡이류의 신진대사 부산물로 피부색소인 멜라닌 생합성 과정에서 필수효소인 tyrosinase의 갈변화 반응을 억제하므로 본 실험에서 대조군으로 사용하였다. Kojic acid 검량선은 $R^2=0.99$ 로 직선성을 나타내었다.

9. 통계처리

모든 결과는 Statistical Package for the Social Science Program (SPSS, version 21)을 사용하여 산출하였다. 모든 측정값은 3회 반복 측정하여 평균±표준편차로 나타내었다. 그룹 간의 유의성을 분석하기 위해 일원분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 다음 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 사후검정하였다.

결과 및 고찰

1. 발효에 따른 천마의 유효성분 함량 변화

비발효 천마와 발효 천마 분말에 함유된 지표성분인 *p*-hydroxybenzyl alcohol의 함량을 분석한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. *p*-Hydroxybenzyl alcohol은 페놀성 화합물의 일종으로 천마에 함유되어 있는 hydroxybenzyl alcohol, vanillin, hydroxybenzaldehyde 등과 비교 시 항산화 효과가 가장 크다고 보고되었다(Jung 등 2007). *p*-Hydroxybenzyl alcohol의 함량은 비발효 천마가 1.58 mg/g이었고, 1차 발효 천마는 1.07 mg/g, 2차 발효 천마는 0.32 mg/g, 3차 발효 천마는 0.13 mg/g으로 발효 횟수가 증가함에 따라 감소하였다($p < 0.05$). 효모균을 이

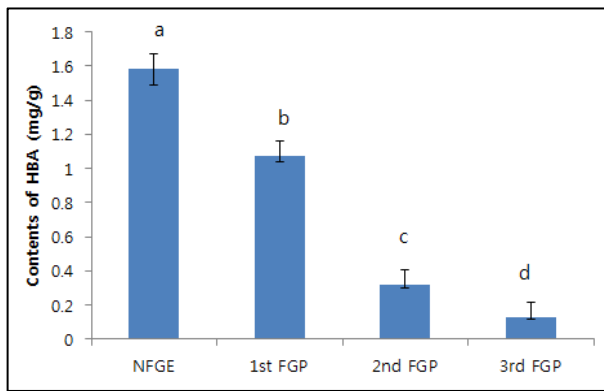


Fig. 1. Comparative analysis of index-component of the non-fermented and fermented *Gastrodia elata* Blume powder. NFGF: non-fermented *G. elata* powder, 1st FGP: fermented *G. elata* powder, 2nd FGP: fermented *G. elata* powder two times, 3rd FGP: fermented *G. elata* powder three times, Values represent the mean±S.D. (n=3), Mean with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

용하여 천마를 발효시킨 Park 등(2012)의 연구에서는 발효 전의 HBA 함량이 2.46 mg/g에서 발효 후에 7.94 mg/g으로 증가되어 본 연구에서의 결과와는 일치하지 않았다. Choi 등(2011)은 천마 괴경의 절단 여부와 건조 방법, 증자 여부 등에 따라 유리당 함량, 총 폴리페놀, gastrodin 및 *p*-hydroxybenzyl alcohol의 함량이 변화가 있다고 보고하였다. 따라서 본 연구와 Park 등(2012)의 연구 결과가 차이가 나는 이유로 발효에 사용한 균주의 종류 및 천마의 재배나 수확시기, 건조방법 등에 따른 차이를 유추해 볼 수 있겠다. 또한 본 연구에서는 나타내지 않았지만, 선행연구에서 천마에 가장 많이 함유되어 있는 유효성분인 gastrodin의 함량 역시 발효에 따라 감소하여 *p*-hydroxybenzyl alcohol과 같은 경향을 보여주었다. Gastrodin은 쥐의 혈관뇌관문을 통과하여 *p*-hydroxybenzyl alcohol로 분해된다고 알려져 있으므로(Kim & Park 2013), 발효에 의해 gastrodin의 함량이 감소함에 따라 gastrodin의 aglycon인 *p*-hydroxy benzyl alcohol의 함량도 감소한 것으로 사료된다.

2. 발효에 따른 천마의 암세포 생육 저해 효과

비발효 및 발효 천마 70% 에탄올 추출물의 1, 5, 10, 50, 100, 500 및 1,000 µg/mL 농도 범위에서 정상세포주인 NIH3T3에 대한 세포독성을 살펴본 결과는 Fig. 2와 같다. 추출물의 농도 100 µg/mL에서는 모든 시료 추출물이 정상세포주인 NIH3T3에 대해 97.4~99.8%의 세포생존율을 보였으나, 500 µg/mL의 농도에서의 세포 생존율은 비발효 천마가 98.8%, 발효 천마는 14.3~16%로 세포독성을 보였다. 따라서 1~100 µg/

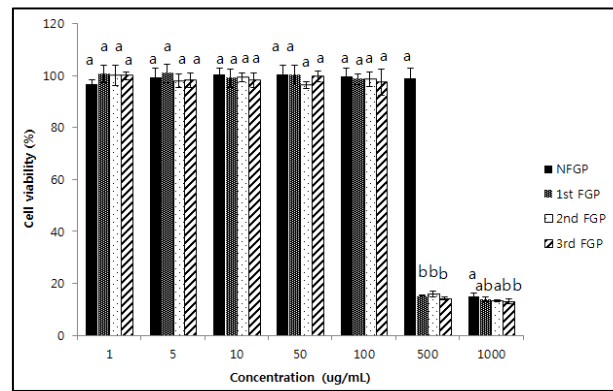


Fig. 2. Cell viability of ethanol extracts from non-fermented and fermented *Gastrodia elata* Blume powder on NIH3T3 by MTT assay. NFGF: non-fermented *G. elata* powder, 1st FGP: fermented *G. elata* powder, 2nd FGP: fermented *G. elata* powder two times, 3rd FGP: fermented *G. elata* powder three times, Data are expressed as Mean±S.D. (n=3), Mean with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

mL 농도 범위에서 각 암세포주에 대한 비발효 및 발효 천마 에탄올 추출물의 암세포 성장 저해 효과를 평가하였다.

비발효 및 발효 천마 에탄올 추출물의 HT29, HeLa 및 AGS 세포에 대한 암세포 증식 억제 효과는 Fig. 3과 같다. 추출물의 농도 100 µg/mL에서 HT29 세포는 1차 발효 천마(12.1%) < 2차 발효 천마(16.3%) < 비발효 천마(18.2%) < 3차 발효 천마 추출물(23.4%)의 순으로 세포독성을 나타내었다($p<0.05$). HeLa 세포주에서는 추출물의 농도가 높아짐에 따라 암세포 증식이 억제되는 것으로 나타났으나, 발효에 따른 유의한 차이가 없었다. AGS 세포주에서는 100 µg/mL의 농도에서 비발효 천마는 16.8%, 1차 발효 천마는 18.3%, 2차 발효 천마는 22.8%, 3차 발효 천마는 24.6%의 세포독성을 보여, 발효 횟수가 증가함에 따라 암세포 생육 저해에 효과적인 것으로 나타났다. 천마열수추출물의 인간 간암세포(Hep3B), 유방암세포(MCF-7), 폐암세포(A549) 및 위암세포(AGS)에 대한 생육 저해능을 SRB assay로 살펴본 Kang 등(2002)의 연구에서는 0.8 mg/mL의 농도에서 모든 암세포의 생육 저해능이 70% 이상으로 나타났다. 본 연구결과와의 차이는 천마 시료의 추출용매와 암세포 생육저해 실험방법 및 시료 농도 등에 기인하는 것으로 보인다. 따라서 향후 연구에서는 천마 건조 및 추출조건과 실험방법 등에 따른 기능성 평가가 다양하게 이루어져야 할 것으로 사료된다.

또한 Choi 등(2005)은 손바닥 선인장(*O. humifusa*)의 열매와 줄기를 물, 에탄올, 메탄올로 추출하여 자궁경부암 세포주(CaSki, SiHa, HaCaT)에 처리하였을 때 항암 활성이 나타나지

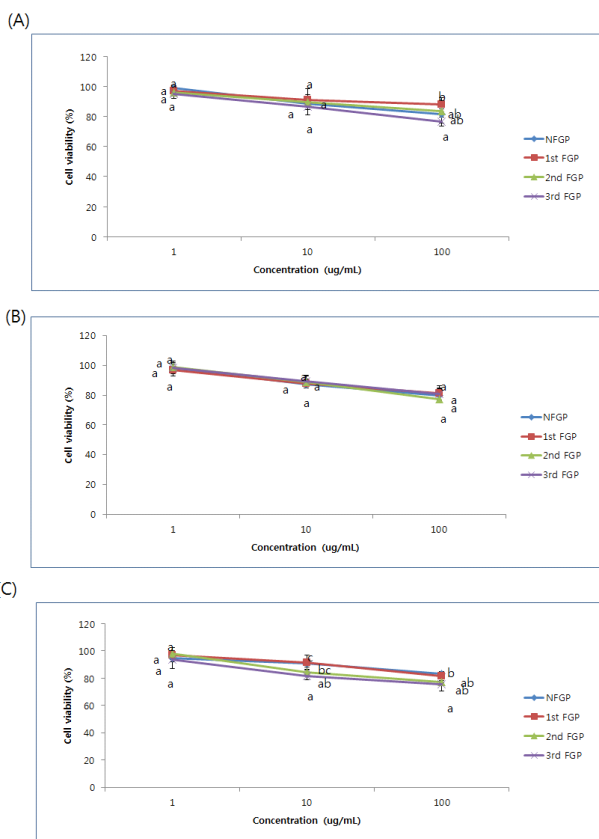


Fig. 3. Cell viability of ethanol extracts from non-fermented and fermented *Gastrodia elata* Blume powder. NFGP: non-fermented *G. elata* powder, 1st FGP: fermented *G. elata* powder, 2nd FGP: fermented *G. elata* powder two times, 3rd FGP: fermented *G. elata* powder three times, (A): HT29 (human colon adenocarcinoma) (B): HeLa (human cervix adenocarcinoma) (C): AGS (human stomach adenocarcinoma), Date are expressed as Mean±S.D. (n=3), Mean with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

않았으나, 선인장 열매를 효모균으로 발효하여 처리한 결과, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서부터 세포독성이 관찰되었다고 보고하였다. 이는 본 연구에서의 결과와 유사한 것으로 미생물이나 효모를 이용한 발효로 생성된 2차 발효산물에 의해 항암 활성이 증대되는 것으로 생각된다.

3. 발효에 따른 천마의 항비만 활성

항비만 활성을 평가하기 위해 사용된 3T3-L1 세포에 대한 발효 천마 에탄올 추출물의 세포독성을 XTT assay로 측정된 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 천마 추출물의 1, 5, 10, 50, 100, 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 범위에서 세포독성을 측정된 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도까지는 세포 성장에 영향을 미치지 않는 것

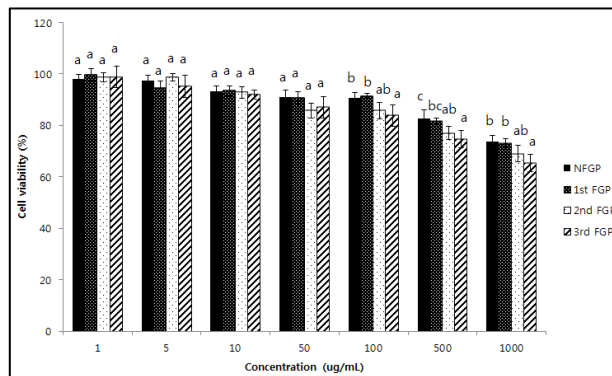


Fig. 4. Cell viability of ethanol extracts from non-fermented and fermented *Gastrodia elata* Blume powder on 3T3-L1 by XTT assay. NFGP: non-fermented *G. elata* powder, 1st FGP: fermented *G. elata* powder, 2nd FGP: fermented *G. elata* powder two times, 3rd FGP: fermented *G. elata* powder three times, Date are expressed as Mean±S.D. (n=3), Mean with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

로 나타났다. 따라서 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 범위에서 비발효 및 발효 천마 에탄올 추출물의 항비만 활성을 측정하였다.

3T3-L1 지방세포의 분화 7~10일째에 측정된 지방 함량에 대한 발효 천마 에탄올 추출물의 효과를 살펴본 결과(Fig. 5), 비발효 천마 및 발효 천마 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 지방축적량이 감소하였으며, 모든 농도에서 대조군에 비해 유의적으로 지방축적이 억제된 것으로 나타났다. 추출물의 농도 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 비발효 천마 및 1차 발효 천마에 비해 3차 발효 천마 추출물의 지방축적량이 유의적으로 적어, 3차 발효 천마 추출물의 지방 축적 억제 효과가 가장 효과적인 것으로 나타났다($p<0.05$). 천년초의 항비만 활성을 측정된 Kim 등(2011)의 연구에서는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 열수 추출물은 약 40%의 지방축적량을 보였고, 80% 에탄올 추출물은 20%로 열수에 비해 지방축적 억제 효과가 더 높은 것으로 나타나, 본 연구의 비발효 및 발효 천마 에탄올 추출물에 비해 더 높은 활성을 보였다. 반면, 기와층버섯 메탄올 및 에틸 아세테이트 추출물과 차가버섯 에틸아세테이트 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 전지방세포의 지방세포로의 분화율이 대조군(100%)과 비교하여 각각 76.4-80.9%로 감소하여 본 연구의 발효 천마 에탄올 추출물과 유사하였다(Kang 등 2007). 현재까지 천마 및 발효 천마 추출물의 3T3-L1 세포 지방축적 억제 효과에 대한 보고는 없다. 본 연구 결과를 바탕으로 볼 때 천마 및 발효 천마 에탄올 추출물은 지방세포 생성 억제에 따른 체지방 감소 효과를 가지는 것으로 사료되며, 이러한 효과는 발효에 의해 더 증대되는 것으로 보인다. 향후 발효 천마의 기능성식품 및 신약 개발의 원료로서 활용 가능성을 높

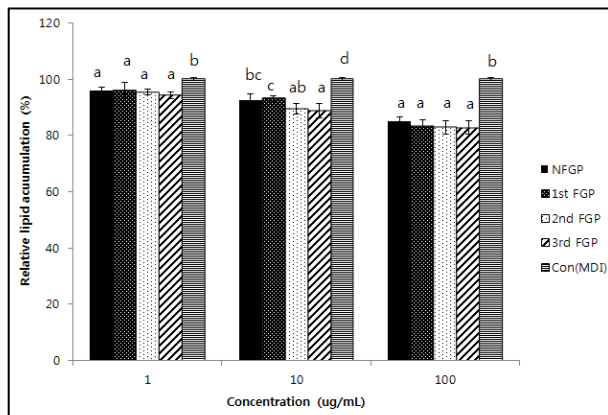


Fig. 5. Effect of ethanol extract obtained from *Gastrodia elata* powder on adipose conversion during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. NFGP: non-fermented *G. elata* powder, 1st FGP: fermented *G. elata* powder, 2nd FGP: fermented *G. elata* powder two times, 3rd FGP: fermented *G. elata* powder three times, Con (MDI): Control, Date are expressed as Mean±S.D. (n=3), Mean with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

이기 위해 발효 천마 추출물의 항비만 효과를 *in vivo*에서 탐색하는 실험이 이루어져야 할 것이다.

4. 발효에 따른 천마의 미백 활성

비발효 및 발효 천마 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과는 Table 2에 나타내었다. Tyrosinase는 피부 기저층의 멜라노사이트에서 tyrosin을 산화시켜 멜라닌의 생성을 촉진시키므로 tyrosinase의 활성을 억제하는 것은 피부 미백에 있어서 중요한 역할을 한다(Jo & Cho 2012). 모든 에탄올 추출물은 200, 400, 600, 800, 1,000 µg/mL의 농도에서

농도 의존적으로 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다. 2차 발효 천마 에탄올 추출물의 경우, 600과 800 µg/mL 농도에서 대조군으로 사용한 kojic acid 보다 더 높은 미백 활성을 나타내었다($p<0.05$). 추출물 농도 1000 µg/mL에서는 비발효 천마가 kojic acid와 유사한 저해 활성을 보였으며, 발효가 진행됨에 따라 더 효과적인 것으로 나타났다. Jo & Cho(2012)의 연구에서 오가피 열매 에탄올 추출물이 200 µg/mL 농도에서 58.8%의 tyrosinase 억제 효과를 보였으며, 제주산 식물을 이용하여 tyrosinase 억제 활성을 측정된 Lee 등(2002)은 1,000 ppm의 농도에서 10%의 저해 효과를 나타내었다고 하였다. 이와 같은 결과로 볼 때 발효 천마 분말의 미백 활성은 비교적 우수한 것으로 보인다.

요약 및 결론

본 연구는 상황버섯균사체를 이용하여 천마를 발효시킴으로써 발효를 통한 천마 유효성분의 변화와 항암 및 항비만 효과와 미백 활성을 분석하였다. 비발효 천마와 발효 천마 분말에 함유된 지표성분인 *p*-hydroxybenzyl alcohol의 함량은 발효 횟수가 증가함에 따라 감소하였다. 에탄올 추출물의 농도 100 µg/mL에서 HT29 세포는 비발효 천마에 비해 3차 발효 천마 추출물의 세포독성이 유의적으로 높은 것으로 나타났다. HeLa 세포주에서는 추출물의 농도가 높아짐에 따라 암세포 증식이 억제되는 것으로 나타났으나, 발효에 따른 유의한 차이는 없었다. AGS 세포주에서는 100 µg/mL의 농도에서 발효 횟수 의존적으로 암세포 생육 저해 활성이 높아 3차 발효 천마 추출물의 항암 활성이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 비발효 천마 및 발효 천마 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 지방축적량이 감소하였으며, 모든 농도에서 대조군에 비해 유의적으로 지방축적이 억제된 것으로 나타났다. 특히, 추출

Table 2. Inhibitory activity against tyrosinase of ethanol extract from non-fermented and fermented *Gastrodia elata* Blume powder

Concentration (µg/mL)	Tyrosinase inhibitory activity(%)				
	NFGP ¹⁾	1 st FGP	2 nd FGP	3 rd FGP	Kojic acid
200	75.9±6.3 ^{2) b3)}	42.5±4.3 ^a	79.2±1.0 ^b	38.8±3.3 ^a	82.6±0.3 ^b
400	81.9±6.6 ^b	48.0±0.8 ^a	80.9±1.0 ^b	49.1±1.3 ^a	84.2±0.5 ^b
600	82.3±6.2 ^b	62.4±3.6 ^a	86.9±1.0 ^b	64.3±1.3 ^a	80.7±0.5 ^b
800	84.7±0.3 ^c	76.4±1.9 ^a	90.5±0.5 ^d	76.2±1.0 ^a	80.0±0.3 ^b
1,000	90.7±0.3 ^b	78.7±0.3 ^a	94.1±1.3 ^c	95.8±2.3 ^c	79.7±0.5 ^a

¹⁾ NFGP: non-fermented *G. elata* powder, 1st FGP: fermented *G. elata* powder, 2nd FGP: fermented *G. elata* powder two times, 3rd FGP: fermented *G. elata* powder three times

²⁾ Date are expressed as Mean±S.D. (n=4)

³⁾ Mean with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

물의 농도 10 µg/mL에서는 비발효 천마 및 1차 발효 천마에 비해 3차 발효 천마 추출물의 지방축적량이 유의적으로 적어, 3차 발효 천마 추출물의 지방축적 억제 효과가 가장 높았다. 2차 천마 발효 추출물은 600 µg/mL 이상의 농도에서는 kojic acid보다 더 높은 미백 활성을 나타내었으며, 1,000 µg/mL의 농도에서는 발효가 진행됨에 따라 미백 활성이 증가하였다. 따라서 발효 천마, 특히 3차 발효 천마 에탄올 추출물은 항암, 항비만 및 미백 활성이 있는 것으로 나타나, 기능성 식품 및 신약 개발 소재로서의 활용 가능성이 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

발효 천마 분말을 제공해주신 (주)내츄럴씨엔에프의 최재홍 대표이사께 감사드립니다.

References

- Blumberg JM, Tzamelis I, Astapova I, Lam FS, Flier JS, Hollenberg A. 2006. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 28:11205-11213
- Cho HE, Choi YH, Park SH, Park YS, Ahn BY. 2008. Effect of *Gastrodiae rhizoma* powder on serum and liver lipid levels of rats with high fat diet. *Korean J Food & Nutr* 21:64-70
- Choi HJ, Park SC, Hong TH. 2005. Anti-tumor activity of fermented liquid *Opuntia humifusa* in cervical cancer cells and its chemical composition. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34:1525-1530
- Choi SR, Jang I, Kim CS, You DH, Kim JY, Kim YG, Ahn YS, Kim JM, Kim YS, Seou KW. 2011. Changes of components and quality in *Gastrodia rhizoma* by different dry methods. *Korean J Med Crop Sci* 19:354-361
- Franzoni F, Colognato R, Galeata F. 2006. An *in vitro* study on free radical scavenging capacity of ergothioneine, comparison with reduced glutathione, nicotinic acid and trolox. *Biomed Pharmacother* 60:453-457
- Heo JC, Park JY, An SM, Lee JM, Yun CY, Shin HM, Kwon TK, Lee SH. 2006. Anti-oxidant and anti-tumor activities of crude extracts by *Gastrodia elata* Blume. *Korean J Food Preserv* 13:83-87
- Jo BS, Cho YJ. 2012. Biological activity of extracts from *Acanthopanax sessiliflorum* fruit. *Korean J Food Preserv* 19:586-593
- Jung TY, Suh SI, Lee H, Kim IS, Kim HJ, Yoo JS, Lee SR. 2007. Protective effects of several components of *Gastrodia elata* on lipid peroxidation in gerbil brain homogenates. *Phytother Res* 21:960-964
- Kang EH, Lee IK, Hwang MH, Choi JY, Chang ZQ, Rhee MH, Yun BS, Jiang CZ, Kim KS, Park SC. 2007. Anti-obesity activity, anti-cancer activity and single oral dose toxicity of *Inonotus xeranticus* extracts. *J Toxicol Pub Health* 23:253-261
- Kang TS, Kong YJ, Kwon HJ, Choi BK, Hong JG, Park YK. 2002. A studies on the chemical composition and *in vitro* biological activities of a hot water extracts of *Gastrodia elata*. *Korean J Mycol* 30:136-141
- Kim DJ, Jung JH, Kim SG, Lee HK, Lee SK, Hong HD, Lee BY, Lee OH. 2011. Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Preserv* 18:366-373
- Kim HT, Park EJ. 2013. Change of major functional components of *Gastrodia elata* Blume with cultivation conditions and harvest times. *Korean J Med Crop Sci* 21:282-288
- Kim JM, Moon YS, Yoon KY, Suh SG. 2010. Quality properties and preference of fermented *Gastrodia elata* Blume. *Kor J Hort Sci Technol* 28:507-514
- Lee JT, Jeong YS, An BJ. 2002. Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials. *Korean J Herbolo* 17:51-60
- Lee JY, Jang YW, Kang HS, Moon H, Sim SS, Kim CJ. 2006. Anti-inflammatory action of phenolic compounds from *Gastrodia elata* root. *Arch Pharm Res* 29:849-858
- Lee YB. 1990. Dictionary of Oriental Medicine. Sam Moon Dang. p.814
- Lee YR, Kim KY, Lee SH, Kim MY, Park HJ, Jeong JS. 2012. Antioxidant and antitumor activity of methanolic extracts from *Humulus japonicus*. *Korean J Food & Nutr* 25:357-361
- Liu CL, Liu MC, Ahu PL. 2002. Determination of gasterodin, *p*-hydroxybenzyl alcohol, vanillyl alcohol, *p*-hydroxybenzaldehyde and vanillin in tall *Gastrodia* tuber by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 55:317-320
- Liu J, Mori A. 1993. Antioxidant and pro-oxidant activities of *p*-hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA. *Neuropharmacology* 32:659-669

- Martin KR. 2010. The bioactive agent ergothioneine, a key component of dietary mushrooms, inhibits monocyte binding to endothelial cells characteristics of early cardiovascular disease. *J Med Food* 13:1340-1346
- Park MR, Yoo C, Chang YN, Ahn BY. 2012. Change of total polyphenol content of fermented *Gastrodia elata* Blume and radical scavenging. *Korean J Plant Res* 25:379-386
- Taguchi H, Yosioka I, Yamasaki K, Kim IL. 1996. Studies on the constituents of *Gastrodia elata*. *Phytochemistry* 42:549-551
- Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. 1986. Ther effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Meddica* 3981:517-519
-
- 접 수 : 2014년 8월 4일
최종수정 : 2014년 9월 24일
채 택 : 2014년 9월 30일