

## 3종의 버섯균사체로 발효한 천년초 에탄올 추출물의 생리활성

\*김 미 현

경일대학교 식품과학부

### Biological Activity of Ethanol Extracts from Fermented *Opuntia humifusa* with 3 Different Mushroom Mycelia

\*Mi Hyun Kim

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

#### Abstract

The present study was carried out to investigate the biological activity of ethanol extracts from fermented *Opuntia humifusa* with 3 different mushroom mycelia: *Phellinus linteus*, *Lentinula edodes*, and *Pleurotus ostreatus*. Fermented *Opuntia humifusa* by *Phellinus linteus* (FOP) and *Lentinula edodes* (FOL) showed more DPPH and ABTS radical scavenging activities than non-fermented *Opuntia humifusa* (NFO) and fermented *Opuntia humifusa* by *Pleurotus ostreatus* (FOPO). At a concentration of 250 ppm, the ABTS radical scavenging activities of the FOP and FOL were similar to that of BHA, a synthetic antioxidant. The total polyphenol content had a similar tendency to that of the radical scavenging activity. However, the flavonoid content was increased in the order of NFO, FOL, FOPO, and FOP. At all concentrations, the tyrosinase inhibitory activity of FOP and FOPO were significantly higher than that of kojic acid. During adipocyte differentiation, NFO and FOL showed no significant difference in lipid accumulation in 3T3-L1 cells. FOP and FOPO showed a higher fat accumulation inhibitory effect than NFO and FOL. These results provide baseline data for *Opuntia humifusa* as a novel functional food.

Key words: antioxidant activity, fermentation, mushroom mycelia, *Opuntia humifusa*, tyrosinase inhibitory activity

#### 서 론

천년초(*Opuntia humifusa*)는 선인장과 식물(*Opuntia* 속)로 우리나라에서 자생하는 다년생 손바닥선인장이다. 열매를 맺는 손바닥선인장 중에서 가장 널리 알려져 있는 백년초(*Opuntia ficus-indica*)와 달리 천년초는 영하 20°C에서도 생존할 수 있으며, 병충해에 강하여 제초제나 화학비료를 사용하지 않고 재배가 가능하다(Choi 등 2005). 손바닥선인장의 열매와 줄기는 예로부터 이뇨 작용, 식욕 증진, 소염진통, 피부질환, 화상 치료, 기관지, 천식, 폐질환, 위염, 변비, 신장염, 당뇨 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다(Kim TJ 1996).

천년초의 줄기, 열매와 뿌리 등 각 부위에는 폐놀성 물질,

플라보노이드, 비타민 C, 칼슘, 아미노산, 식이섬유 및 복합다당류 등의 영양성분이 다량 함유되어 있다(Cho 등 2009; Jung & Shin 2011). 최근에는 천년초의 여러 약리학적 효과에 대한 연구가 다소 이루어지고 있다. Lee & Lee(2010)는 천년초 에탄올 추출물 분획 중에서 taxifolin을 정제하여 항산화 활성을 검증한 결과, 천연항산화제인  $\alpha$ -tocopherol과 합성항산화제인 BHA와 유사한 효과가 있음을 보고하였다. 또한 천년초 열수 및 80% 에탄올 추출물의 항산화 활성 및 항비만 활성을 측정된 Kim 등(2011)의 연구에서는 천년초 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 DPPH 라디칼 소거능과 PPAR $\gamma$  유전자 발현 억제에 의한 지방세포 분화 억제 활성이 더 큰 것으로 나타났다. 사염화탄소로 간 손상을 유발한 흰쥐에 천

\* 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

년초 줄기 열수 추출물을 투여한 연구에서는 추출물 처치군의 AST, ALT, ALC, ALP 활성과 간의 지질과산화 반응이 대조군에 비해 감소하였으며, SOD 및 GST 활성이 회복되었다 (Park 등 2005). 이외에도 MC3T3 세포를 이용하여 천년초 추출물의 조골세포 증식과 ALP 활성, collagen 합성 및 ROS 생성 저해 촉진 효과를 확인한 연구(Hwang 등 2011)와 천년초 씨 추출물의 혈류 흐름 개선 및 혈소판 응집 저해 효과를 보고한 연구(Hwang 등 2012), 천년초 뿌리 추출물의 염증 매개물질 생성 억제 활성에 대한 연구(Kim 등 2014) 및 지방세포에서 천년초 추출물의 ROS 생성 억제와 관련된 유전자 발현 양상을 분석한 연구(Yoon 등 2012)가 있다.

이와 같이 천년초의 효능에 대한 다양한 연구가 보고됨에 따라 천년초를 가공한 기능성식품에 대한 관심도 증가하고 있다. 최근 천연물에 함유된 기능성 성분과 생리활성을 증가시키기 위하여 독성이 없는 미생물을 이용한 발효에 관한 연구들이 보고되고 있다(Jeon CP 2014; Kim 등 2014; Yang 등 2014). 그러나, 천년초 발효물에 대한 기존의 연구로는 *Leuconostoc mesenteroides*로 발효시킨 천년초 열매 발효물의 물리·화학적 특성을 분석한 Park & Lee(2013)의 보고 외에는 전문한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 기존에 식품 발효에 사용되고 있는 버섯균주 중에서 상황버섯균사체(*Phellinus linteus*), 표고버섯균사체(*Lentinula edodes*) 및 느타리버섯균사체(*Pleurotus ostreatus*)를 이용하여 천년초를 발효시킨 후, 3가지 종류의 천년초 발효물의 항산화 활성, 미백 효과 및 항비만 효능을 비교·분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료 및 발효균주

실험시료는 전남 목포 소재의 '풍성한 천년초'에서 2013년에 재배한 천년초 열매를 구입하여 사용하였다. 천년초 열매는 이물질들을 제거하기 위해 증류수로 세척한 다음 동결건조하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하면서 실험재료로 이용하였다.

천년초 발효에 사용한 균주인 상황버섯균사체(*Phellinus linteus*, KCTC 6190), 표고버섯균사체(*Lentinula edodes*, KCTC 6733) 및 느타리버섯균사체(*Pleurotus ostreatus*, KCTC 6198)는 한국 미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받아 사용하였다. 이들 균주는 PDA(potato dextrose broth, Becton Dickinson) 배지에서 3회 계대배양을 반복하여 균주의 변이를 확인한 후 실험에 사용하였다. 각각의 발효균주는 균사체 부분만 분리하여 증류수 1 L에 potato 4 g, dextrose 20 g, yeast extract 3 g을 혼합하여  $30^{\circ}\text{C}$ , 120 rpm의 shaking incubator에서 120시간 동안 배양하여 종균으로 사용하였다.

### 2. 천년초 발효물 및 에탄올 추출물 제조

멸균처리한 천년초 열매 500 g을 균사체 배양액 1 L에 혼합하여  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 20일간 배양하였다. 선행연구에서 균주별로 배지종류, 배양 온도 및 시간에 따른 진균 생육 상태를 분석한 결과, PDA 배지에서  $30^{\circ}\text{C}$ 의 온도로 10~20일간 배양하였을 때 균사의 생장이 가장 활발한 것으로 나타나, 본 연구에서는  $30^{\circ}\text{C}$ 의 배양기에서 20일 동안 배양하였다. 발효가 끝난 천년초 열매는  $121^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 멸균처리하여 미생물을 불활성하고, 동결건조한 다음 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

분쇄한 3종의 발효천년초 100 g에 70% 에탄올 1,000 mL를 가하여 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물을 5,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상층액을 수집한 후, 여과지(Whatman No. 4)로 여과하여 회전감압농축기(EYELA, Rikakikai, Co., Japan)로 농축하였다. 농축된 시료는 동결건조하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동보관하였다. 발효천년초 에탄올 추출물의 수율은 상황버섯균체 발효천년초, 표고버섯균사체 발효천년초 및 느타리버섯균사체 발효천년초가 각각 16.5%, 15.1%, 12.6%이었다.

### 3. Free radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 Blois MS(1958)의 방법에 의해 측정하였다. 발효천년초 추출물을 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.5)에 용해시키고, 2 mL의  $7.5 \times 10^{-5}$  M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)을 첨가하였다. 추출액 혼합액은  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer(HS 3300, Humas Co., Korea)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 합성항산화제인 BHA를 사용하였다. 발효천년초의 전자공여능(%)은  $[1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료무첨가구의 흡광도})] \times 100$ 의 계산식에 의해 구하였다.

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등(1999)의 방법에 따라 분석하였다. 즉, 2.45 mM  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 와 7 mM 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS, Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)를 1:1로 혼합하고, 14시간 반응시켜 ABTS+를 형성시킨 후, 413 nm에서 흡광도가 0.7~1.0이 되도록 0.005 M PBS buffer (pH 7.4)로 희석하였다. 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)를 이용하여 농도별로 희석한 발효 추출물 40  $\mu\text{L}$ 에 ABTS 용액 4 mL를 첨가하여 1분간 반응시키고, 413 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 ABTS 라디칼 소거능(%)은  $[1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료무첨가구의 흡광도})] \times 100$ 으로 계산하였다.

### 4. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

발효천년초의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 법에

의해 측정하였다(Pellegrini 등 1999). 발효물 1 mL에 Folin-Ciocalteu reagent(Sigma-Aldrich Co., LLC, USA) 0.5 mL와 증류수 5 mL를 첨가하여 8분간 반응시킨 다음, 7% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 mL를 첨가하였다. 이후 혼합액의 최종 부피가 25 mL가 되도록 증류수를 첨가하였다. 혼합액은 상온에서 2시간 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer(HS 3300, Humas Co., Korea)로 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid(Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)를 사용하여 표준 검량선을 구하고, 발효 추출물 시료의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

발효천년초의 플라보노이드 함량 분석을 위해 10% aluminum nitrite 100 µL와 1 M potassium acetate 100 µL, 80% 에탄올 4.3 mL를 혼합한 용액에 발효천년초 추출물을 0.5 mL 첨가하여 40분간 상온에서 반응시켰다. 이후 510 nm에서 혼합액의 흡광도를 측정하였다(Moreno 등 2000). Quercetin(Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)을 표준물질로 사용하여 표준 검량선을 구하고, 추출물의 플라보노이드 함량을 구하였다.

### 5. Tyrosinase 저해 활성 측정

천년초 발효물의 Tyrosinase 저해활성은 Yagi 등(1986)의 방법에 의해 분석하였다. 발효천년초 추출물 0.1 mL와 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL, 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL를 혼합한 반응액에 0.2 mL의 mushroom tyrosinase(50 U/mL)를 첨가하였다. 반응액을 25°C에서 2분간 방치한 후 UV/Visible spectrophotometer(Milton Roy, Inc., Rochester, NY, USA)로 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 Kogic acid를 사용하였으며, 표준 검량선은  $R^2=0.99$ 로 직선성을 나타내었다.

### 6. 세포독성 측정

3종의 버섯균사체로 발효시킨 천년초의 항비만 활성을 평가하기 위해 XTT[2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxy-anilideinnersalt] assay kit를 사용하여 3T3-L1 지방세포에 대한 세포독성을 측정하였다. 3T3-L1 지방세포는  $1 \times 10^5$  cell 농도로 96 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. Working solution으로 XTT reagent 1 mL와 PMS reagent 20 µL를 혼합하여 배지 부피의 20%에 해당하는 양을 각 well에 첨가하였다. 이후 배양액은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 세포독성 값은 UV/Vis spectrophotometer(Milton Roy, Inc., Rochester, NY, USA)를 이용하여 450 nm 흡광도를 측정한 값에서 690 nm의 흡광도 측정값으로 보정하여 구하였다.

### 7. 지방세포 분화 및 지방 축적량 측정

지방세포의 지방축적량을 측정하기 위해 3T3-L1 세포를

한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 3T3-L1 세포는 10% BCS와 1% penicillin-streptomycin(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 첨가한 DMEM 배지에서 배양하였다. 배지에 분화유도물질로 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 uM dexamethasone, 5 µg/mL insulin 및 시료추출물을 처리하여 지방세포로의 분화를 유도하였다. 이후 2일마다 10% FBS, 5 µg/mL insulin 및 여러 농도의 시료추출물이 함유된 DMEM 배지로 배양하면서 지방축적량의 변화를 관찰하였다.

3T3-L1 세포의 지방축적량은 다음과 같이 측정하였다(Blumberg 등 2006). 3T3-L1 세포를 12 well plate에 분화하고, 배지를 제거한 후 PBS로 세척하였다. 지방세포에 10% formaldehyde를 처리하고, 5분 동안 상온에서 방치한 다음 PBS로 세척하였다. 10% formaldehyde를 세척된 세포에 넣고 4°C에서 1시간 동안 배양한 후 10% formaldehyde를 제거하고, PBS로 2번 세척한 다음 세포를 완전히 건조시켰다. 각 Well에 Oil red O working solution 500 µL를 첨가하고, 30분간 상온에서 배양하여 지방세포 내에 축적된 지방성분을 염색시켰다. 이후 100% isopropanol을 첨가하여 세포 내 염색된 Oil red O working solution을 제거하고, 증류수로 3회 세척하여 UV/Vis spectrophotometer(Milton Roy, Inc., Rochester, NY, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 8. 통계처리

모든 실험결과는 Statistical Package for the Social Science Program(version 21)을 이용하여 산출하였다. 실험의 모든 측정은 3회 반복하였으며, 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 그룹간의 유의성을 검정하기 위해 일원분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 다음, Duncan's multiple range test로  $p < 0.05$  수준에서 사후검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 버섯균사체에 따른 발효천년초 추출물의 라디칼 소거 활성 비교

3종의 버섯균사체로 발효시킨 천년초 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 비발효천년초와 3종의 버섯균사체 발효천년초 모두 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능이 증가하였다. 에탄올 추출물의 농도 125 ppm에서 DPPH 라디칼 소거능은 상황버섯균사체(FOP, 30.2%), 표고버섯균사체(FOL, 27.4%) 및 느타리버섯균사체(FOPO, 30.0%) 발효천년초 모두 비발효천년초(NFO, 12.4%)보다 전자공여능이 유의적으로 높았다. 추출물의 농도 500 ppm에서는 느타리버섯균사체 발효천년초(80.6%)

**Table 1. The electron donating ability of fermented *O. humifusa* with different mushroom mycelia**

	Concentration (ppm)	NFO <sup>1)</sup>	FOP	FOL	FOPO	BHA
DPPH	125	12.4±1.2 <sup>2)a3)</sup>	30.2±0.3 <sup>b</sup>	27.4±1.4 <sup>b</sup>	30.0±1.3 <sup>b</sup>	85.2±0.1 <sup>c</sup>
	250	47.0±3.6 <sup>a</sup>	50.9±1.9 <sup>b</sup>	56.2±0.6 <sup>b</sup>	53.6±4.9 <sup>b</sup>	89.1±1.1 <sup>c</sup>
	500	75.1±4.2 <sup>a</sup>	85.4±0.2 <sup>bc</sup>	88.3±1.2 <sup>bc</sup>	80.6±1.7 <sup>ab</sup>	91.1±0.4 <sup>c</sup>
ABTS	31.25	13.8±1.4 <sup>a</sup>	26.7±0.5 <sup>c</sup>	24.4±0.2 <sup>c</sup>	17.2±1.7 <sup>b</sup>	88.5±0.6 <sup>d</sup>
	62.75	25.6±0.0 <sup>a</sup>	40.7±1.8 <sup>b</sup>	42.9±0.9 <sup>b</sup>	28.7±1.3 <sup>a</sup>	91.4±0.1 <sup>c</sup>
	125	42.9±1.8 <sup>a</sup>	70.9±5.5 <sup>c</sup>	71.0±1.1 <sup>c</sup>	56.6±2.1 <sup>b</sup>	92.9±0.5 <sup>d</sup>
	250	81.1±3.3 <sup>a</sup>	94.7±0.1 <sup>c</sup>	96.2±0.2 <sup>c</sup>	86.4±3.6 <sup>b</sup>	95.1±0.6 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup> NFO: 70% ethanol extract of non-fermented *O. humifusa*, FOP: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Phellinus linteus*, FOL: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Lentinula edodes*, FOPO: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Pleurotus ostreatus*.

<sup>2)</sup> Values(%) represent the mean±S.D.(n=3).

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

는 비발효천년초(75.1%)와 전자공여능에 있어 유의한 차이가 없었으나, 상황버섯균사체(85.4%)과 표고버섯균사체 발효천년초(88.3%)는 비발효천년초에 비해 전자공여능이 증가하여 합성항산화제인 BHA(91.1%)와 유사한 소거 활성을 나타내었다. 영지버섯, 상황버섯 및 노루궁뎅이버섯으로 발효시킨 가시오가피 에탄올 추출물의 항산화 활성을 측정된 Kim 등(2014)의 연구결과, 추출물의 농도 3,000 ppm에서 영지버섯 발효 추출물이 50.1%로 가장 높은 소거능을 보였고, 상황버섯 발효 추출물의 소거능은 39.6%로 세 가지 버섯균사체로 발효시킨 추출물 중에서 가장 낮은 값을 나타내었다. 본 연구 결과는 Kim 등(2014)의 연구와는 측정된 발효추출물의 농도가 달라 정량적인 비교는 어려우나, 천년초의 DPPH 라디칼 소거활성이 가시오가피보다 우수함을 알 수 있다.

버섯 균사체에 따른 ABTS 라디칼 소거능은 농도별로 다른 양상을 보였다(Table 1). 추출물의 농도 62.75 ppm에서는 비발효(25.6%)와 느타리버섯균사체 발효천년초(28.7%)가 유사한 공여능을 나타내었다. 그 다음으로 상황버섯균사체(40.7%)와 표고버섯균사체 발효천년초(42.9%)의 순으로 전자공여능이 증가하였다. 에탄올 추출물의 농도 31.25, 125, 250 ppm에서는 비발효천년초에 비해 모든 버섯균사체 발효물에서 ABTS 라디칼 소거 활성이 증가하였다. 3종의 균사체 중에서는 느타리버섯균사체에 비해 상황버섯균사체와 표고버섯균사체에 의한 발효천년초의 공여능이 유의적으로 높았다. 또한, 250 ppm의 농도에서는 상황버섯균사체 발효천년초는 94.7%, 표고버섯균사체 발효천년초는 96.2%의 공여능을 보여, 합성항산화제인 BHA(95.1%)의 활성과 유사하였다. 본 연구에서 발효천년초의 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거능이 증가하였는데, 이는 버섯균사체를 달리한 가시오가피 추출물의 ABTS 소거능을 측정된 Kim 등(2014)의 연구에서 추출물의

농도가 5~20 mg/mL의 범위에서 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거능이 유의적으로 증가한 것과 유사하였다. 발효버섯균사체 중에서는 가시오가피 영지버섯발효 에탄올 추출물(27.9~81.2%)이 가장 높은 활성을 나타내었으며, 상황버섯발효 추출물(7.73~43.5%)은 활성이 가장 낮았다. 추출물의 측정 농도를 감안한다면 본 연구의 상황버섯균사체 발효천년초 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성이 가시오가피발효 추출물보다 더 높음을 알 수 있다.

이상과 같은 결과로 볼 때, 발효에 의해서 천년초의 라디칼 소거능은 증가하였으며, 발효균주로 사용된 3종의 버섯균사체 중에서는 상황버섯균사체와 표고버섯균사체에 의한 발효천년초의 활성이 가장 증대된 것으로 나타났다. DPPH와 ABTS는 라디칼 결합물질의 종류와 결합 정도가 다르므로, 라디칼 소거능에 있어서도 차이를 보인다고 알려져 있다. 본 연구에서도 전반적으로 ABTS 라디칼 소거능이 DPPH 전자공여능에 비해 더 높게 나타났다. 또한 본 연구에서 추출물의 농도에 따라 3종의 버섯균사체 발효천년초의 ABTS 라디칼 소거 활성이 다른 경향을 보였는데, 이에 대해 Bolling 등(2012)은 항산화 활성 실험에서는 측정 시료 농도에 따라 항산화 물질 사이에 상호작용이 일어날 수 있음을 설명하고 있다. 따라서 향후 발효천년초를 이용한 항산화 활성 측정 시 시료의 추출조건과 유효성분 정제 이외에도 여러 종류의 버섯균사체와 항산화 모델 및 시료 농도에 의한 기능성 평가가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 2. 버섯균사체에 따른 발효천년초 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 비교

버섯균사체를 달리하여 발효시킨 천년초 에탄올 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 2

에 제시하였다. 총 폴리페놀 함량은 비발효천년초가 110.5 mg GAE/g으로 가장 낮았으며, 그 다음 순으로 느타리버섯균사체(204.0 mg GAE/g), 상황버섯균사체(232.5 mg GAE/g), 표고버섯균사체(254.0 mg GAE/g) 발효천년초로 유의하게 증가하였다. 발효에 따라 천년초의 총 폴리페놀 함량이 증가하였으며, 3종의 버섯균사체 중에서는 표고버섯에 의한 발효물의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 이에 비해 플라보노이드 함량은 총 폴리페놀과는 조금 다른 양상을 보였다. 비발효천년초 추출물의 플라보노이드 함량은 2.5 mg QCE/g이었다. 발효 후에는 함량이 유의적으로 증가하였으며, 표고버섯균사체 발효천년초가 5.5 mg QCE/g, 느타리버섯균사체 발효천년초는 9.0 mg QCE/g, 상황버섯균사체 발효천년초는 11.0 mg QCE/g

**Table 2. Contents of total polyphenol and flavonoid of *O. humifusa* with different mushroom mycelia**

Sample <sup>1)</sup>	Total polyphenol <sup>2)</sup> (mg GAE/g)	Flavonoid <sup>3)</sup> (mg QCE/g)
NFO	110.5±2.1 <sup>4)a5)</sup>	2.5±0.1 <sup>a</sup>
FOP	232.5±0.7 <sup>c</sup>	11.0±2.8 <sup>c</sup>
FOL	254.0±14.1 <sup>d</sup>	5.5±0.1 <sup>ab</sup>
FOPO	204.0±1.4 <sup>b</sup>	9.0±0.4 <sup>bc</sup>

<sup>1)</sup> NFO: 70% ethanol extract of non-fermented *O. humifusa*, FOP: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Phellinus linteus*, FOL: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Lentinula edodes*, FOPO: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Pleurotus ostreatus*.

<sup>2)</sup> mg of total polyphenol content/g of non-fermented and fermented *O. humifusa* based on hesperitin as standard.

<sup>3)</sup> mg/of flavonoid content/g of non-fermented and fermented *O. humifusa*, based on quercetin as standard.

<sup>4)</sup> Values represent the mean±S.D.(n=3).

<sup>5)</sup> Mean with the different letters are significantly different( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

g으로 3종의 버섯균사체 중에서 상황버섯균사체 발효천년초의 플라보노이드 함량이 가장 높게 나타났다.

Kim 등(2014)의 연구에서 발효가시오가피의 총 폴리페놀 함량은 영지버섯 발효 추출물이 41.0 mg GAE/g, 노루궁뎅이버섯 발효 추출물이 29.7 mg GAE/g, 상황버섯 발효 추출물이 29.5 mg GAE/g으로 나타났다. 전반적으로 본 연구에서 사용한 3종의 버섯으로 발효시킨 천년초 추출물이 발효가시오가피에 비해 총 폴리페놀 함유량이 높았으며, 동일한 상황버섯으로 발효시킨 경우에도 천년초 발효물의 총 폴리페놀 함량이 가시오가피보다 더 높았다. 이러한 차이는 천연물 자체에 함유된 성분의 차이 외에도 본 연구와 Kim 등(2014)의 연구에서 사용한 발효방법, 배양시간 및 배양온도 등에도 기인하는 것으로 사료된다. Kim 등(2014)의 결과에서 상황버섯 발효가시오가피에 함유된 플라보노이드 함량은 15.2 mg QCE/g으로 본 연구의 상황버섯 발효천년초와 유사하였다. Park 등(2012)은 발효에 의해 protease와 amylase 등 효소의 작용으로 폴리페놀과 폴리페놀 화합물의 종류인 플라보노이드의 함량이 증가하는 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 3종의 버섯균사체를 이용한 발효가 진행됨에 따라 천년초의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 증대되었으며, 이에 의해 발효천년초의 전자공여능이 증가하여 항산화 활성이 증대된 것으로 보인다. 또한 이러한 항산화 활성은 상대적으로 느타리버섯에 비해 상황버섯과 표고버섯균사체로 발효시킬 경우 더 증가하는 것으로 나타났다.

### 3. 버섯균사체에 따른 발효천년초 추출물의 미백 활성 비교

발효천년초 추출물의 tyrosinase 저해 활성 결과는 Table 3과 같다. 비발효와 3종의 발효천년초 모두 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 저해 활성이 증가하였다. 대조군으로 사용한 Kojic acid는 피부의 멜라닌 생합성 과정에 필수적으로 작용

**Table 3. Inhibitory activity against tyrosinase of fermented *O. humifusa* with different mushroom mycelia**

Concentration (ppm)	Tyrosinase inhibitory activity(%)				
	NFO <sup>1)</sup>	FOP	FOL	FOPO	Kojic acid
200	61.3±0.8 <sup>2)b3)</sup>	91.2±0.5 <sup>c</sup>	11.0±0.6 <sup>a</sup>	85.3±0.6 <sup>d</sup>	82.5±0.3 <sup>c</sup>
400	73.7±1.3 <sup>b</sup>	97.3±0.8 <sup>c</sup>	30.5±1.1 <sup>a</sup>	88.1±1.0 <sup>d</sup>	84.2±0.5 <sup>c</sup>
600	79.9±1.1 <sup>b</sup>	98.4±0.6 <sup>d</sup>	48.9±1.5 <sup>a</sup>	91.5±1.1 <sup>c</sup>	80.7±0.5 <sup>b</sup>
800	87.3±0.3 <sup>c</sup>	98.9±1.5 <sup>c</sup>	75.5±0.3 <sup>a</sup>	93.1±1.9 <sup>d</sup>	80.0±0.3 <sup>b</sup>
1,000	91.0±0.5 <sup>b</sup>	99.9±0.8 <sup>c</sup>	96.4±0.3 <sup>c</sup>	98.8±2.3 <sup>d</sup>	79.7±0.5 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> NFO: 70% ethanol extract of non-fermented *O. humifusa*, FOP: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Phellinus linteus*, FOL: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Lentinula edodes*, FOPO: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Pleurotus ostreatus*.

<sup>2)</sup> Values represent the mean±S.D.(n=3).

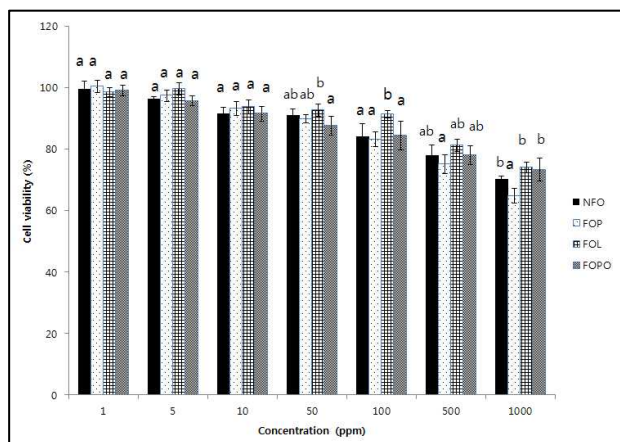
<sup>3)</sup> Mean with the different letters are significantly different( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

하는 tyrosinase에 의한 갈변화 반응을 억제한다. 따라서 천연물의 tyrosinase 억제 활성은 피부 미백에 있어서 매우 중요한 기능 중 하나이다. 에탄올 추출물의 농도 200 ppm에서는 표고버섯 발효추출물(11.0%)의 활성이 가장 낮았으며, 비발효(61.3%), kojic acid(82.5%), 느타리버섯(85.3%), 상황버섯 발효추출물(91.2%) 순으로 활성이 증가하였다. 모든 측정 농도에서 상황버섯균사체와 느타리버섯균사체 발효천년초는 대조군인 kojic acid보다 더 높은 활성을 나타내었으며, 1,000 ppm의 농도에서는 비발효와 3종의 균사체 발효천년초의 미백활성은 동일한 농도에서의 발효천년초 에탄올 추출물(42.5~78.7%) 및 제주산 함초(*Salicornia herbacea*, 10%)에 비해 비교적 우수한 미백 활성을 가진 것으로 보인다(Lee 등 2002; Kim MH 2014).

#### 4. 버섯균사체에 따른 발효천년초 추출물의 지방축적 억제 효과 비교

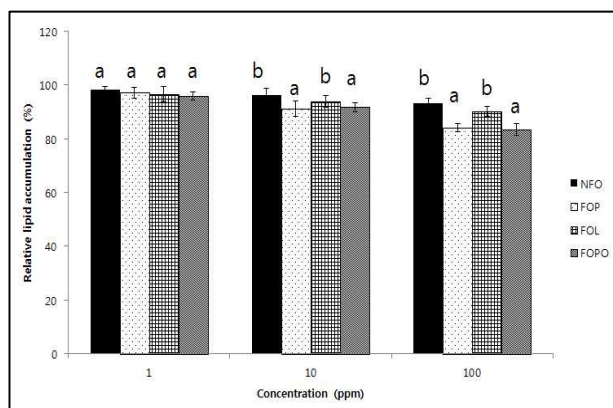
버섯 발효천년초의 3T3-L1 지방세포에 대한 세포독성을 1, 5, 10, 50, 100, 500 및 1,000 ppm 농도 범위에서 XTT assay로 측정된 결과, 모든 에탄올 추출물에서 100 ppm의 농도까지는 3T3-L1 세포의 생존율이 83.2% 이상으로 생장에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1).

따라서 추출물의 농도 1, 10 및 100 ppm 범위에서 3종의



**Fig. 1.** Cell viability of fermented *O. humifusa* with different mushroom mycelia on 3T3-L1 by XTT assay. NFO: 70% ethanol extract of non-fermented *O. humifusa*, FOP: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Phellinus linteus*, FOL: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Lentinula edodes*, FOPO: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Pleurotus ostreatus*. Each bar represent the mean±S.D. of triplicate determinations. Mean with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

버섯균사체 발효천년초의 지방축적 억제효과를 측정하여 Fig. 2에 결과를 제시하였다. 버섯발효 천년초 에탄올 추출물을 3T3-L1에 첨가한 후, 분화 7~10일째에 지방 축적량을 측정하였다. 비발효 및 3종의 버섯균사체 발효천년초 모두 농도 증가에 따라 지방축적량이 감소하였다. 추출물의 농도 1 ppm의 낮은 농도에서는 발효 및 버섯균사체 종류에 따른 지방축적량에 유의한 차이가 없었다. 추출물의 농도 10 ppm에서는 비발효천년초(96%)와 표고버섯균사체 발효천년초(93.8%)가 유의한 차이가 없었으나, 상황버섯균사체 발효천년초(91.2%)와 느타리버섯균사체 발효천년초(91.8%)의 지방축적량이 유의적으로 감소하였다. 이러한 경향은 100 ppm의 농도에서도 유사하였는데, 특히 상황버섯균사체 발효천년초의 지방축적량이 84.1%, 느타리버섯균사체 발효천년초가 83.3%로 지방축적 억제효과가 비발효 및 표고버섯균사체 발효천년초에 비해 높은 것으로 나타났다. 본 연구의 상황버섯균사체와 느타리버섯균사체 발효천년초의 지방 축적량은 Kim MH(2014)의 상황버섯 발효천년초 70% 에탄올 추출물과 유사하였다. Kim 등(2011)의 연구에서는 천년초 80% 에탄올 추출물을 100 ppm 처리 시 약 20% 지방 축적량 억제효과를 보여 본 연구의 비발효천년초에 비해 축적량이 적었는데, 이는 추출용매 및 분화 조건 등의 차이에 의한 영향이 있는 것으로 보인다. Kim 등(2011)은 천년초 추출물에 함유된 폴리페놀과 플라보노이



**Fig. 2.** Effect of fermented *O. humifusa* with different mushroom mycelia on adipose conversion during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. NFO: 70% ethanol extract of non-fermented *O. humifusa*, FOP: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Phellinus linteus*, FOL: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Lentinula edodes*, FOPO: 70% ethanol extract of fermented *O. humifusa* with *Pleurotus ostreatus*. Each bar represent the mean±S.D. of triplicate determinations. Mean with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

드 화합물이 지방세포 분화에 관련된 전사인자인 PPAR $\gamma$  유전자의 발현을 억제하여 지방세포 분화를 억제하는 항비만 활성을 가지는 것으로 보고하였다. 이에 의하면 본 연구에서도 상황버섯 발효천년초의 항비만 활성 증가는 발효에 의해 증가된 총 폴리페놀과 플라보노이드에 의한 것으로 볼 수 있겠으나, 느타리버섯균사체 발효천년초의 경우에는 플라보노이드 이외의 다른 지방축적 억제 기전이 있는 것으로 생각된다. 본 연구 결과, 천년초를 발효함에 의해 지방세포의 분화율이 감소하였으며, 그 효과는 발효균주로 표고버섯보다는 상황버섯과 느타리버섯을 사용하였을 때 더 증대되는 것으로 보인다. 향후 지방세포의 분화 및 지방축적과 관련된 유전자 발현 기전이 규명된다면 기능성식품 및 의약품 신소재로서 발효천년초의 활용가능성이 높아질 것으로 사료된다.

## 요약 및 결론

본 연구는 식용 및 식품발효에 사용되어온 상황버섯, 표고버섯 및 느타리버섯을 이용하여 3종류의 천년초 발효물을 제조하고, 이들의 항산화 및 항비만 활성과 미백 효과를 비교하고자 하였다. DPPH 라디칼 소거능은 비발효천년초와 느타리버섯균사체 발효천년초가 유의적인 차이가 없었으며, 상황버섯균사체와 표고버섯균사체 발효천년초는 이들에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. ABTS 라디칼 소거능은 추출물의 농도 62.75 ppm을 제외한 나머지 농도에서는 비발효천년초에 비해 모든 버섯 발효천년초에서 활성이 증가하였으나, 느타리버섯균사체 발효천년초에 비해 상황버섯균사체와 표고버섯균사체 발효천년초의 소거 활성이 큰 것으로 나타났다. 또한 250 ppm의 농도에서는 상황버섯균사체와 표고버섯균사체 발효천년초의 경우, 합성항산화제인 BHA와 유사한 항산화 활성을 보였다. 총 폴리페놀 함량도 라디칼 소거능과 같은 양상을 보였다. 비발효천년초에 비해 발효천년초에서 이들 페놀성 물질의 함량이 증대되었으며, 특히 느타리버섯균사체에 비해 상황버섯균사체와 표고버섯균사체로 발효시킬 경우 항산화 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 시료의 플라보노이드 함량은 위와 다른 경향을 보였다. 비발효천년초, 표고버섯균사체 발효천년초, 느타리버섯균사체 발효천년초, 상황버섯균사체 발효천년초의 순으로 플라보노이드 함량이 증가하였다. Tyrosinase 저해 활성은 추출물의 농도 200~600 ppm 범위에서 표고버섯균사체 발효천년초, 비발효천년초, 느타리버섯균사체 발효천년초, 상황버섯균사체 발효천년초의 순으로 증가하였다. 모든 측정 농도에서 상황버섯과 느타리버섯균사체 발효천년초는 대조군인 kojic acid 보다 더 높은 미백 활성을 나타내었다. 천년초를 발효함에 의해 지방세포의 지방 축적량이 감소하였으며, 특히 표고버섯

균사체에 비해 상황버섯균사체와 느타리버섯균사체로 발효시켰을 때 지방축적 억제효과가 더 높았다. 본 연구결과에서 상황버섯균사체 발효천년초는 발효에 의해 증대된 총 폴리페놀과 플라보노이드 화합물의 항산화 활성이 미백 작용과 항비만 활성에 기여하는 것으로 보인다. 그러나, 느타리버섯균사체 발효천년초는 플라보노이드와 이외의 다른 기전이 작용하는 것으로 보이며, 추후에 지방세포 분화 관련 유전자를 이용한 지방축적 억제기전에 대한 명확한 규명이 이루어져야 할 것이다.

## 감사의 글

천년초 발효분말을 제공해주신 (주)내츄럴씨엔에프의 최재홍 대표이사께 감사드립니다.

## References

- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- 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 cell. *J Biol Chem* 28:11205-11213
- Bolling BW, Chen YY, Kamil AG, Chen CY. 2012. Assay dilution factors confound measures of total antioxidant capacity in polyphenolrich juices. *J Food Sci* 77:69-75
- Cho IK, Jin SW, Kim YD. 2009. Analysis of components in the parts of *Opuntia ficusindica* from Shinan Korea. *Korean J Food Preserv* 16:741-716
- 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
- Hwang HJ, Jung BK, Kim MH. 2011. ROS scavenging effect and cell viability of *Opuntia humifusa* extract on osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Life Sci* 21:1752-1760
- 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* 22:1680-1687
- Jeon CP. 2014. Antioxidant activities and monacolin K production of fermented chinese yam by *Monascus* sp. MK805. *Korean J Microbiol* 50:46-52
- Jung BM, Shin MO. 2011. Physiological activities of *Opuntia*

- humifusa* petal. *Korean J Food Cookery Sci* 27:523-530
- Kim DB, Shin GH, Lee JS, Lee OH, Park IJ, Cjp JH. 2014. Antioxidant and nitrite scavenging activities of *Acanthopanax senticosus* extract fermented with different mushroom mycelia. *Korean J Food Sci Technol* 46:205-212
- Kim DJ, Jung JH, Kim SG, Lee HK, Lee SK. 2011. Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Preserv* 18:366-373
- Kim MH. 2014. Screening of biological activities of ethanol extracts from fermented *Gastrodia elata* Blume. *Korean J Food & Nutr* 27:837-844
- Kim TJ. 1996. Illustrated guide to Korean flora. pp. 140-141. Seoul National University Press.
- Lee JT, Jeong YS, An BJ. 2002. Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials. *Korean J Herbol* 17:51-60
- Lee KS, Lee KY. 2010. Biological activity of phenol compound from a cactus cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:1132-1136
- Moreno MI, Isia MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentinian. *J Ethnopharmacol* 71:109-114
- Park MJ, Lee SP. 2013. Pysicochemical characteristics of cheonnyuncho fruit (*Opuntia humifusa*) fermented by *Leuconostoc mesenteroides* SM. *Korean J Food Sci Technol* 45:434-440
- Park MK, Lee YJ, Kang ES. 2005. Hepatoprotective effect of cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) extract in rats treated carbon tetrachloride. *Korean J Food Sci Technol* 37:822-826
- 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
- 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-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Meth Enzymol* 299:379-389
- 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
- Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. 1986. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Meddica* 3981:517-519
- Yang HS, Choi YJ, Oh HH, Moon JS, Jung HK, Kim KJ, Choi BS, Lee JW, Huh CK. 2014. Antioxidative activity of mushroom water extracts fermented by lactic acid bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43:80-85
- Yoon BR, Lee YJ, Kim SG, Jang JY, Lee HK, Rhee SK, Hong HD, Choi HS, Lee BY, Lee OH. 2012. Antioxidant effect of hot water and ethanol extracts from cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) on reactive oxygen species (ROS) production in 3T3-L1 adipocytes. *Korean J Food Preserv* 19:443-450

---

Received 22 July, 2015

Revised 5 August, 2015

Accepted 11 August, 2015