

마카 품종별 조다당 획분의 대식세포 활성화

신현영 · 김 훈* · 정은진** · †유광원***

고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템융합전공 학생, *증양대학교 생명공학대학 연구교수,
한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, *한국교통대학교 식품영양학전공 교수

Macrophage Stimulating Activity of Crude Polysaccharide on Maca (*Lepidium meyenii*) Varieties

Hyun Young Shin, Hoon Kim*, Eun-Jin Jeong** and †Kwang-Won Yu***

Graduate School Student, Transdisciplinary Major in Learning Health Systems, Dept. of Integrated Biomedical and Life Science,
Graduate School, Korea University, Seoul 02841, Korea

*Research Professor, College of Biotechnology and Natural Resources, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

**Undergraduate Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

***Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

Maca roots (*Lepidium meyenii*) are an important medicinal herb that have long been used by the Andes-indigenous peoples and South Americans. In Korea, recently, it has attracted attention as a health food material because of nutritional values and physiological activities. The purpose of this study was to investigate the industrial applicability of maca (red and golden varieties; R&G) as immunostimulating materials. In the macrophage stimulating assay using RAW 264.7 cells at 125~500 µg/mL of non-cytotoxicity doses, G-HW showed the most potent production of TNF-α, IL-6 and nitric oxide compared to red maca or the other extracts. The general component analysis results showed that all extracts comprised more than 90% neutral sugars with small amounts of uronic acid and protein. Meanwhile, component sugar analysis showed the difference in the content of uronic acids of cold- and hot-water extract. Additionally, the further fractionation of G-HW into crude polysaccharide (G-CP) greatly enhanced the macrophage stimulating activity, and G-CP contained macromolecules over 144 kDa, comprised mainly of glucose and galacturonic acid (51.0 and 34.9%). In conclusion, crude polysaccharide from maca showed industrial applicability as immunostimulating material, and especially golden maca showed higher macrophage stimulating activity than red maca.

Key words: maca (*Lepidium meyenii*), hot-water extract, crude polysaccharide, macrophage stimulating activity

서 론

해발 4,000 m 이상의 안데스산맥을 원산지로서 하는 마카 (*Lepidium meyenii*, maca)는 십자화목(Brassicales) 배추과 (Brassicaceae) 다닥냉이속(*Lepidium*)에 속하는 식물의 일종이다(Balick & Lee 2002). 마카는 고지대의 척박한 환경에서 주로 재배되고 있어 생명력이 매우 강하고 영양가가 높아 오래 전부터 중요한 약용식물로 이용되었다(Jeon 등 2011). 생태형에 따라 여러 종으로 분류되고 있으며 색상에 따라 레드, 골

든 및 블랙 등으로 영양성분 및 효능이 유의한 차이를 나타낸다고 보고되고 있다(Gonzales 등 2009; Celement 등 2010). 국내에서는 ‘페루의 인삼(Peruvian ginseng)’이라고도 불리는 슈퍼푸드로 알려져 있고, 기능성 소재로서 관심을 받고 있으며 최근 국내 일부 지역에서 재배되는 것으로 보고되고 있다(Lee & Chang 2018). 식품의약품안전처에서는 식품원료사용 가능 여부를 뿌리에 제한적으로 허용하고 있어 뿌리를 건조하여 분말 형태로 섭취하거나 음료 및 차 등으로 섭취하는 것으로 알려져 있다(Ochoa C 2001).

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

최근 소득 수준이 향상됨에 따라 건강증진과 관련된 건강 기능식품의 섭취 및 생리 기능성 물질에 대한 관심이 증가하고 있으며(Hsieh & Ofori 2007), 마카는 현재까지 많은 기능성 효과를 입증하였고, 미국을 비롯한 일본 및 유럽 등에서 일부 건강기능식품으로 인정받고 있다(Choi S 2017). 현재 국내의 연구에 따르면 통증 조절 효과(Kim 등 2017), 뇌 손상 보호 효과(Lee 등 2010), 항산화 효과(Park 등 2017) 및 남성 성기능 개선효과(Choi 등 2018) 등이 보고되어 있으며, 국외에서는 스트레스 개선(Lopez-Fando 등 2004), 기억력 증진(Rubio 등 2007), 간 기능 개선 효과(Zheng 등 2018) 및 면역활성(Wang 등 2016; Zha 등 2018) 등의 효과가 알려져 있다. 한편, Kwon 등(2009)은 건조 분말 마카로부터 일반성분 분석을 통해 74.8%가 탄수화물, 12.8%가 단백질로 주로 탄수화물 및 단백질로 구성되어 있음이 보고되고 있으며, 단백 다당 및 다당류는 대식세포 관련 선천면역 자극뿐만 아니라, 장내 면역 등 다양한 면역계를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Kim 등 2011; Shin 등 2021). Zha 등(2018) 및 Wang 등(2016)과 같은 연구에서 마카 유래 고분자 다당류가 면역자극 활성이 우수하다고 보고되고 있지만, 생태형에 따른 선천면역계를 구성하는 대식세포의 활성 다당류에 대한 보고는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 마카의 일반종인 레드 및 골든 마카 추출물의 대식세포 자극 활성을 평가하고, 대식세포 자극 활성이 증진된 조다당 획분(crude polysaccharide)을 분획하여 화학적 특성을 살펴봄으로써 면역활성 소재로서의 산업적 활용에 필요한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료 및 추출 방법

본 연구에서 사용된 마카는 생태형에 따라 레드 마카(red maca; R) 및 골든 마카(golden maca; G)이며, 볼리비아에서 재배되어 건조된 것을 평택약초농원(Gyeonggi, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 입수된 마카는 품질 유지를 위해 -70°C 의 급속냉동기(Ilshin Biobase, Seoul, Korea)에 보관하며 실험에 사용되었다. 추출을 진행하기 위해 믹서(Hanil, Seoul, Korea)에 소량의 물을 첨가하여 파쇄하였으며, 이를 이용해 각각 냉수추출 및 열수추출을 진행하였다. 각각 건조 중량의 20배(w/w)에 해당하는 양의 증류수를 가하고 냉수추출은 4°C 냉장고에서 24시간 동안 교반하여 추출하였으며, 열수추출은 90°C 이상에서 4시간 동안 decoction 방법을 통해 추출하였다. 이후 감압농축기(Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 적절한 농도로 농축을 진행하였으며, 5,500×g에서 30분간 원심분리(Gyrogen Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 진행하여 불용성 침전물을 제거하였다. 이후 상등액을 동결건조하여 각각 냉수

추출물(cold-water extract; CW) 및 열수 추출물(hot-water extract; HW)을 조제하였다. 또한, 활성 추출물은 소량의 증류수를 첨가하여 완전히 용해시키고 5배(v/v)의 주정을 첨가한 후 상온에서 충분히 교반하고 원심분리하여 침전물을 회수하고 증류수에 재용해하여 냉장고에서 투석(MWCO 12~14 kDa, Spectra/Por, Spectrum Lab. Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)을 3일간 진행한 후 농축 및 동결건조하여 조다당(crude polysaccharide; CP)으로 분획하였다.

2. 대식세포 활성

한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 입수한 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum(Gibco, Waltham, Massachusetts, USA) 및 1% penicillin-streptomycin(GenDEPOT, Katy, TX, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Hyclone, San Angelo, TX, USA) 배지에서 배양하면서 37°C , 5% CO_2 조건의 배양기(Sanyo, Gunma, Japan)에서 70~80% confluence 되었을 때 계대배양하여 이용하였다. 대식세포 활성을 평가하기 위해 먼저, 배양한 RAW 264.7 세포주를 1×10^6 cells/mL로 조정 후 96 well plate에 200 μL 씩 분주하여 배양기에서 약 80% confluent 될 때까지 배양하여 세포를 안정시킨 후 배양 상등액을 제거하고 FBS가 함유되지 않은 serum-free DMEM 180 μL 와 적당한 농도로 희석한 시료 20 μL 를 첨가하여 24시간 동안 재배양하였다. 다음으로 배양 상등액을 회수하여 대식세포 활성인자인 tumor necrosis factor-alpha(TNF- α ; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 및 interleukin-6(IL-6; BD Biosciences, San Diego, CA, USA)와 함께 산화질소(nitric oxide, NO)를 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 및 griess assay(Tursun 등 2016)로 측정 후 각각의 reference standard 및 sodium nitrate(NaNO_2)로 표준곡선을 작성하여 함량을 계산하였다. 한편, 시료의 세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Invitrogen, Eugene, OR, USA)법으로 550 nm의 흡광도에서 보라색 pigment를 DMSO에 용해하여 측정하였으며 시료 무처리군에 대한 세포생존율(cell viability, %)로 나타내었다.

3. 구성성분 분석

시료에 함유된 구성성분을 확인하기 위해 증성당, 산성당, 단백질 및 총 폴리페놀 함량을 phenol-sulfuric acid법(Dubois 등 1956), *m*-hydroxybiphenyl법(Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973), Bradford법(Bradford 1976) 및 Folin-Ciocalteu assay(Shin 등 2021)를 이용하여 분석하였으며, 표준물질로는 galactose(Gal), galacturonic acid(GalA), bovine serum albumin(BSA) 및 gallic acid(GA)를 이용하여 각각 mg Gal/g 시료, mg GalA/g

시료, mg BSA/g 시료 및 mg GA/g로 산출하여 백분율(w/w, %)로 나타내었다.

4. 구성당 분석

시료의 구성당 분포는 Honda 등(1989)의 방법을 이용하여 분석하였다. 시료에 2 M trifluoroacetic acid(TFA)로 90분간 처리하여 산 가수분해시킨 후 NaOH와 PMP(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline)를 첨가하여 당-PMP 유도체로 전환시킨다. 당-PMP 유도체는 NaOH와 동일한 농도의 HCl로 중화하여 완전히 건조시킨 후 물과 클로로포름(2상 용매계) 분획으로 물층만을 회수하고 PVDF membrane filter(0.45 μ m, Jaema Trade Inc., Gwangwon-do, Korea)로 여과하여 Table 1과 같은 조건으로 분석하였다. Glucosamine(GlcN)을 내부표준물질(IS, internal standard)로 이용하였으며, 구성당은 peak area와 response factor로부터 mole%로 계산하였다.

5. 분자량 측정

시료의 분자량을 확인하기 위해 gel permeation chromatography(GPC)를 이용하였으며 적당한 농도로 희석하고 PVDF membrane filter로 여과한 후 Table 1과 같은 조건으로 분석하였다. 검출기인 ELSD의 온도는 50°C, 질소의 압력은 3.3 bar로 설정하였으며, 표준물질로 분자량별 dextran(American Polymer Standard; Mentor, OH, USA)을 이용하여 도출된 retention time을 통해 시료의 분자량(kDa)을 계산하였다.

6. 통계처리

모든 시험은 3번 반복하여 분석하였으며 결과는 평균 \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 대식세포 자극 활성의 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for

the Social Science, Ver. 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's *t*-test로 계산하여 각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 대조군과의 유의성을 검정하였으며, 구성 성분은 유의성 평가를 위해 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 각 측정값간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 마카 품종별 추출물 조제 및 조다당의 분획

Kwon 등(2009)은 마카의 용매 추출물 조제 시 용매에 따른 수율이 확연히 다르게 나타나 메탄올(21.4%) 및 에탄올(16.8%) 추출에 비해 물 추출은 46%로 가장 우수한 수율을 나타내는 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 추출 수율에 따른 산업적 활용성을 고려하여 물 추출물만을 조제한 후 이들에 대한 대식세포 활성을 측정하여 면역증진 기능성 식품원료로서의 활용 가능성을 평가하고자 하였다. 2종의 마카(레드 및 골든 마카)로부터 증류수를 이용하여 냉수추출물(R-CW 및 G-CW) 및 열수추출물(R-HW 및 G-HW)로 조제한 뒤 수율을 비교한 결과, 레드 마카의 경우 열수추출물(HW; 39.9%)이 냉수추출물(CW; 33.8%)보다 높은 수율을 나타내었으나 골든 마카의 경우에는 CW(37.6%)와 HW(37.7%)의 수율이 거의 유사한 수준으로 확인되었다(Table 2). 특히 레드 마카의 열수 추출물이 냉수 추출물과 골든 마카보다 높은 수율을 나타냈으며, 이는 산업적으로 유용할 것으로 사료되었다. 한편, 면역활성 G-HW를 이용하여 에탄올 침전에 의해 조다당 획득을 조제하였을 때 G-CP는 원료 대비 1.4%의 수율을 나타냈다(Table 3).

Table 1. Analytical condition of HPLC applied for determining the sugar composition and molecular weight of maca

Analysis	Sugar composition	Molecular weight
Instrument	Agilent HPLC 1120 series (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA)	
Detector	UV detector at 254 nm	Evaporative light scattering detector (Agilent 1200; Agilent Technologies)
Column	YMC-Triart C18 (250 \times 4.6 mm, 5 μ m; YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)	Superdex 200 Increase 10/300 GL (300 \times 100 mm, 8.6 μ m; GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden)
Column temperature	30°C	Room temperature (RT)
Flow rate	1 mL/min	1.1 mL/min
Eluent	0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.7): acetonitrile (82:18)	Deionized water
Injection volume	20 μ L	10 μ L

Table 2. Yields and chemical properties of various water extracts from red and golden maca

Sample	Red maca		Golden Maca	
	R-CW	R-HW	G-CW	G-HW
Yield (%) ¹⁾	33.8	39.9	37.6	37.7
Neutral sugar (%)	94.3±6.4 ^{a2)}	93.4±2.5 ^a	94.8±4.1 ^a	92.6±3.1 ^a
Uronic acid (%)	2.4±0.2 ^b	3.8±0.1 ^b	2.3±0.0 ^b	5.0±0.1 ^b
Protein (%)	0.4±0.0 ^b	0.5±0.0 ^c	0.4±0.0 ^b	0.6±0.0 ^c
Polyphenol (%)	2.9±0.1 ^b	2.3±0.1 ^{bc}	2.5±0.1 ^b	1.8±0.1 ^c
Sugar composition (mol%)				
Mannose	0.9	0.8	0.7	0.6
Rhamnose	0.1	0.2	0.1	0.2
Glucuronic acid	-	-	-	-
Galacturonic acid	-	5.0	-	9.4
Glucose	96.4	90.5	97.0	86.4
Galactose	0.8	0.8	0.7	0.7
Xylose	-	-	-	-
Arabinose	1.8	2.7	1.5	2.6
Fucose	-	-	-	-

After maca extracts were prepared into PMP-sugar derivative, the sugar composition was calculated as a mole % by comparison with the peak of the standards.

¹⁾ Yield (%) was calculated against the dried maca.

²⁾ The difference in the superscript letter of the content value means a significant difference at $p < 0.05$.

2. 마카 품종별 추출물의 대식세포 자극활성 비교

본 연구에서는 마우스 유래 대식세포인 RAW 264.7을 이용하여 대식세포 자극활성을 평가하였다. 먼저, Fig. 1A에 나타난 바와 같이 RAW 264.7 세포에 대한 시료의 독성이 없는 농도 범위를 확인한 결과, 추출물 4종 모두 125~500 µg/mL 농도범위에서 시료 무처리군(negative control; NC) 대비 80% 이상의 세포 생존율을 보였다. López-García 등(2014)의 연구에 따르면 시료 처리에 따라 세포 생존율이 80% 이상으로 확인되면 독성이 나타나지 않는다고 판단하기 때문에 2종 마카로부터 조제한 물 추출물은 독성이 없는 125~500 µg/mL의 농도 범위에서 대식세포 활성화 관련 인자인 TNF-α와 IL-6의 사이토카인과 산화질소(nitric oxide) 생성능으로 대식세포 활성을 평가하였다. 대표적인 대식세포 활성화 사이토카인 중 하나인 TNF-α의 생산에서는 R-CW를 제외한 다른 추출물은 250과 500 µg/mL 농도에서 NC 대조군 대비 농도-의존적으로 유의한 TNF-α 생산활성을 확인하였다(Fig. 1B). 특히 골든 마카의 CW와 HW는 125~500 µg/mL의 농도 범위에서 NC 대조군 대비 각각 0.7~3.4 ng/mL(3.8~17.4배)과 1.7~2.8 ng/mL(8.8~14.2배)의 생성 증진 효과를 나타내어 고농도

Table 3. Chemical property of crude polysaccharide from hot-water extract of golden maca

G-CP	
Yield ¹⁾	1.4
Neutral sugar (%)	69.9±2.4 ^{a2)}
Uronic acid (%)	22.9±1.0 ^b
Protein (%)	6.0±0.3 ^c
Polyphenol (%)	1.2±0.1 ^d
Sugar composition (mol%)	
Mannose	0.8
Rhamnose	1.1
Glucuronic acid	-
Galacturonic acid	34.9
Glucose	51.0
Galactose	3.2
Xylose	0.3
Arabinose	8.8
Fucose	-

After G-CP was prepared into PMP-sugar derivative, the sugar composition was calculated as a mole % by comparison with the peak of the standards.

¹⁾ Yield (%) was calculated against the dried maca.

²⁾ The difference in the superscript letter of the content value means a significant difference at $p < 0.05$.

에서는 G-HW가, 저농도에서는 G-CW가 다소 높은 활성을 보였다. LPS 대조군은 1 µg/mL 농도에서 NC 대조군 대비 26.9배(5.3 ng/mL)의 생산을 나타내는 것으로 확인되었다. 한편, 또 다른 대식세포 활성화 관련 사이토카인인 IL-6의 결과는 Fig. 1C에 나타내었는데, TNF-α의 생산능 결과와 달리 저농도에서는 모든 추출물이 낮은 IL-6 생산을 보였고 500 µg/mL 농도에서도 골든 마카만이 3.5 ng/mL(CW, 5.8배)와 6.5 ng/mL(HW, 10.7배)의 유의한 생산 증진 효과를 나타내어 가장 우수하였다. LPS 대조군은 1 µg/mL의 농도에서 NC 대조군 대비 71.5배(43.1 ng/mL)의 IL-6 생산을 나타내었다. 마지막으로, NO 생산은 Fig. 1D에 나타내었는데 R-CW를 제외한 다른 추출물은 모든 농도 범위에서 통계적으로 유의한 생산 증진 효과가 확인되었으며, 특히 G-HW는 125~500 µg/mL의 농도 범위에서 36.9~61.1 µM(10.8~17.9배)의 농도-의존적으로 가장 우수한 생산능 증진 활성이 나타났고 500 µg/mL 고농도에서는 LPS 수준의 NO 생산활성을 나타내었다. 반면에 R-HW와 G-CW는 같은 농도 범위에서 NC 대조군 대비 6.2~44.8 µM(1.8~13.2배)과 25.1~30.1 µM(7.4~8.8배)의 생산을 나타내었다. 따라서 RAW 264.7 대식세포주로부터 활성화 인자인 TNF-α, IL-6 및 NO의 생산결과를 종합해보면, 골든

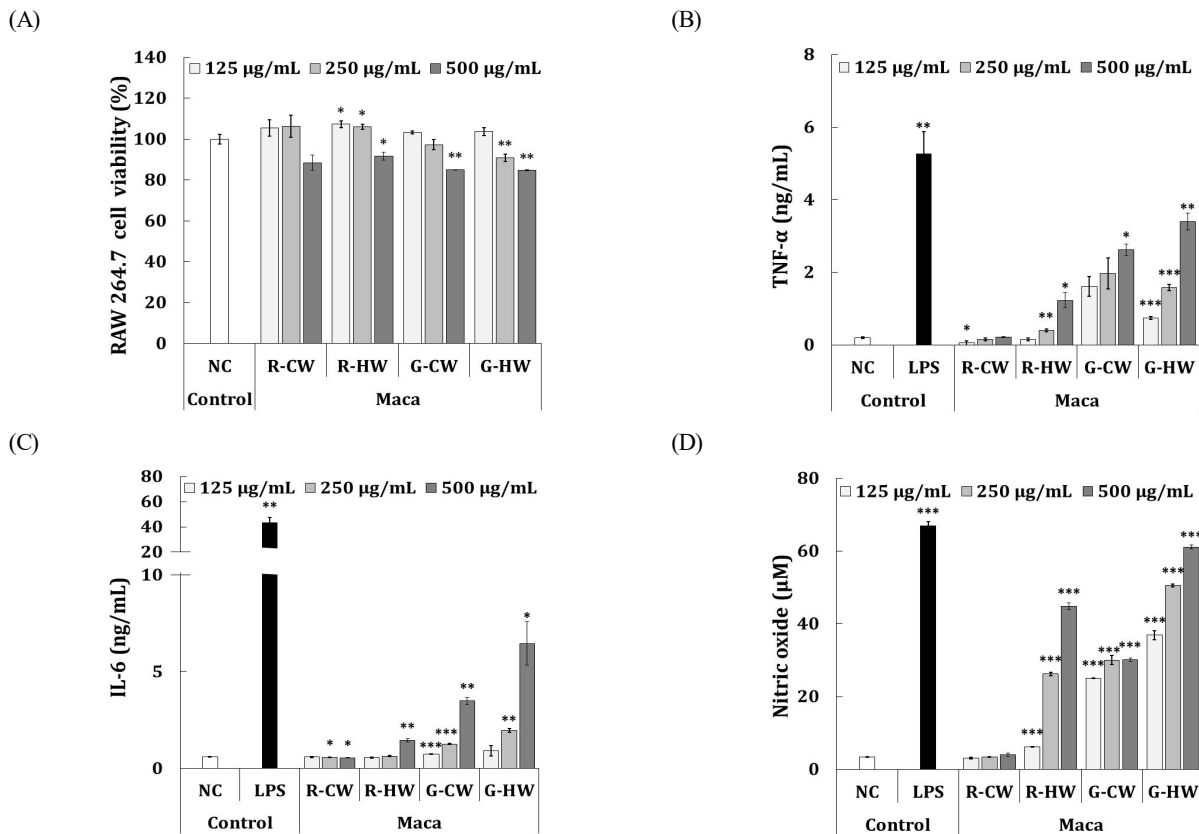


Fig. 1. Macrophage stimulating activity of water extract from red (R) or golden (G) maca. Macrophage stimulating activity evaluates RAW 264.7 cell line as macrophage stimulating related factors produced after cultivating 24 hr with each extract. (A): RAW 264.7 cell toxicity, (B)~(D): production of TNF- α , IL-6 and nitric oxide (NO). Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent test in triplicate. Different asterisks on the column indicate significant difference between negative control (NC) and each group by Student's *t*-test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. NC; only medium was used as negative control, LPS (lipopolysaccharide, 1 μ g/mL); positive control, CW or HW; cold-water extract or hot-water extract.

마카가 레드 마카보다 우수하였으며 열수추출물이 냉수추출물보다 다소 높은 대식세포 자극활성을 나타내었다. Wang 등(2016)은 마카 물 추출물 유래 정제된 368 kDa 크기의 rhamnose, arabinose 및 glucose로 구성된 고분자 다당획분이 대식세포로부터 IL-1 β , TNF- α 및 NO 생산을 농도-의존적으로 증가시키는 것으로 보고하였으며, Li 등(2017)의 연구에서 58 kDa의 galactose로 주로 구성된 다당류가 동일 세포주에서 면역자극이 확인되어 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내는 것으로 확인되었다. 한편, 본 연구에서는 대식세포 자극활성을 높이기 위하여 활성이 우수하였던 골든 마카 열수추출물(G-HW)로부터 조다당 획득을 분획하여 고분자 다당류가 대식세포 활성화에 미치는 영향을 검토하였다.

3. 마카 품종별 추출물의 구성성분 및 구성당

2종의 마카로부터 제조된 4종의 물 추출물에 함유된 구성

성분인 중성당, 산성당, 단백질 및 폴리페놀 함량을 분석한 결과, 레드 마카 추출물의 경우에는 중성당(R-CW; 94.3% 및 R-HW; 93.4%)이 가장 높은 함량을 보였으며 산성당(R-CW; 2.4% 및 R-HW; 3.8%), 단백질(R-CW; 0.4% 및 R-HW; 0.5%) 및 폴리페놀(R-CW; 2.9% 및 R-HW; 2.3%)은 소량 함유되어 있는 것으로 나타났다(Table 2). 한편, 골든 마카 추출물도 레드 마카 추출물과 유사한 경향을 보였는데, 중성당(G-CW; 94.8% 및 G-HW; 92.6%)이 가장 높은 함량을 보였으며, 산성당(G-CW; 2.3% 및 G-HW; 5.0%), 단백질(G-CW; 0.4% 및 G-HW; 0.6%) 및 폴리페놀(G-CW; 2.5% 및 G-HW; 1.8%)은 소량 함유된 것으로 나타났다. 결국, 4종의 추출물 모두 중성당이 92.6~94.8%로 가장 높은 함량을 보였으며, 산성당 2.3~5.0%, 단백질 0.4~0.6% 및 폴리페놀 1.8~2.9%로 소량 함유된 것으로 나타났다. 구성성분 분석으로 주성분이 중성당인 다당 또는 단백다당의 고분자물질을 추정하였으므로

구성당 분석을 진행하였다. 냉수와 열수추출물의 구성당 분포는 산성당 함량에서 다소 차이를 보여, R-CW 및 G-CW는 glucose가 96.4~97.0%의 함량을 나타내면서 galacturonic acid가 확인되지 않은 반면, 열수추출물(R-HW 및 G-HW)은 glucose가 86.4~90.5%로 감소되면서 galacturonic acid가 5.0~9.4%로 함유된 구성당 분포를 확인할 수 있었다. Wang 등(2016) 및 Li 등(2017)의 연구에서 마카의 면역자극 활성 다당류는 rhamnose, arabinose, galactose 및 glucose 등 중성당을 주로 포함하는 것으로 보고되고 있으며, 본 연구에서 glucose를 85% 이상 함유하는 것을 나타나 유사한 경향임을 확인할 수 있었다. 반면, 대식세포 자극 활성의 활성 시료인 G-HW는 다른 추출물에 비해 산성당인 galacturonic acid가 높게 함유된 결과를 통해 galacturonic acid의 증가가 대식세포 자극활성에 영향을 미치는 것으로 추정되었다.

4. 골든 마카 조다당 획분의 면역증진 활성

2종 마카 물 추출물 중 대식세포 자극활성이 가장 우수하였던 골든 마카의 열수추출물을 주정침전하여 조다당(G-CP)으로 분획하고 열수추출물(G-HW)과의 대식세포 활성을 비교하였다. 시료 농도는 산업적 활용성과 조다당 획분으로의 추가분획을 고려하여 열수추출물 활성평가보다는 저농도 범위인 1~100 µg/mL의 농도에서 세포독성 평가(Fig. 2A)를 진행하여 세포 생존율이 80% 이상인 것을 확인한 후 대식세포 자극활성을 RAW 264.7 대식세포주로부터 TNF-α, IL-6 및 NO의 생산능으로 평가하였다. 먼저, TNF-α의 생산능은 Fig. 2B에 나타내었는데, LPS 대조군이 1 µg/mL 농도에서 NC 대조군 대비 77.4배(19.7 ng/mL)의 생산을 나타낸 반면 G-CP는 1~100 µg/mL의 농도 범위에서 0.8~13.4 ng/mL(3.0~52.8배)의 농도-의존적으로 유의한 TNF-α의 생산 효과를 나타내어 G-HW의 0.3~2.7 ng/mL(1.2~10.7배)보다 TNF-α의 생산이 증

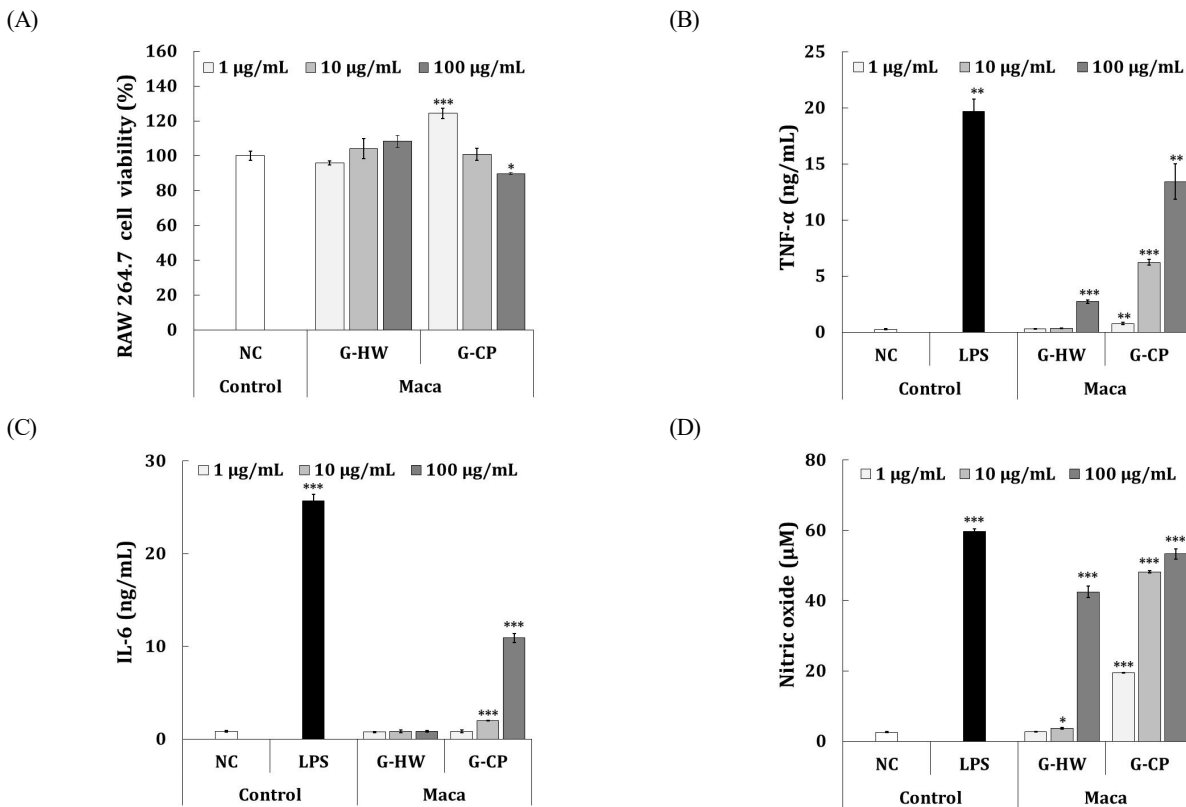


Fig. 2. Macrophage stimulating activity of crude polysaccharide from hot-water extract of golden (G) maca. Macrophage stimulating activity evaluates RAW 264.7 cell line as macrophage stimulating related factors produced after cultivating 24 hr with crude polysaccharide (G-CP). (A): RAW 264.7 cell-toxicity, (B)~(D): production of TNF-α, IL-6 and nitric oxide (NO). Results are expressed as mean±S.D. of three independent test in triplicate. Different asterisks on the column indicate significant difference between negative control (NC) and each group by Student's *t*-test. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001. NC; only medium was used as negative control, LPS (lipopolysaccharide, 1 µg/mL); positive control, HW; hot-water extract, G-CP; crude polysaccharide from HW.

진되었음을 확인하였다. IL-6의 생산활성 결과는 Fig. 2C에 나타난 것처럼 G-CP는 10과 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 NC 대조군 대비 2.0 ng/mL(2.4배) 및 10.9 ng/mL(13.1배)의 통계적으로 유의한 생산 증진 효과를 나타내었으나 G-HW는 통계적으로 유의한 생산을 나타내지 않았고, LPS 대조군은 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 NC 대조군 대비 30.9배(25.7 ng/mL)의 생산을 보였다. 마지막으로 NO의 생산결과는 Fig. 2D에 나타냈었는데, LPS 대조군이 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 시료 무처리군 대비 23.1배(59.8 μM)의 유의한 생산을 보였고 G-CP는 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위에서 19.6~53.3 μM (7.5~20.6배)의 농도-의존적인 유의한 생산 증진 효과를 나타내었고, 특히 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 LPS 처리군과 유사한 생산 증진 효과가 확인되었다. G-HW 또한 10~100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위에서 3.7~42.5 μM (1.4~16.4배)의 통계적으로 유의한 생산 효과가 나타났으나 G-CP보다는 낮은 생산 효과를 보였다. 결론적으로, 추출물 중 대식세포 자극활성이 우수했던 골든 마카의 열수추출물(G-HW)로부터 분획된 조다당 획득(G-CP)은 대식세포 자극활성이 우수한 것으로 나타나 면역활성 건강기능식품 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료되었다. Zha 등(2018)은 마카로부터 분리한 정제 획득에 대한 대식세포 활성을 toll-like receptors (TLRs) 및 mRNA 수준에서 분석하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6가 대식세포 자극 관련 인자임을 보고하였으므로 본 연구에서도 향후 시료에 대한 대식세포 내 mRNA 및 단백질 분석을 통한 평가를 진행하고자 한다.

5. 조다당 획득의 구성성분 및 구성당

대식세포 자극활성이 우수하였던 골든 마카 조다당 획득의 구성성분을 분석한 결과, 중성당이 69.9%로 가장 높은 함량을 나타내었으며 산성당(22.9%), 단백질(6.0%) 및 폴리페놀(1.2%)로 확인되어 열수추출물보다 상대적으로 조다당 획득의 중성당의 함량은 감소(92.6→69.9%)되었고, 산성당(5.0→22.9%)과 단백질(0.6→6.0%) 함량은 증가된 것을 확인하였다 (Table 3). 또한, 구성당 분석에서도 G-CP는 주요 구성당으로 glucose(51.0%)와 galacturonic acid(34.9%)를 확인하였으며, arabinose(8.8%), galactose(3.2%) 및 rhamnose(1.1%)가 소량 함유되어 있는 반면 glucuronic acid 및 fucose는 검출되지 않는 것으로 나타났다. 따라서 열수추출물에 다량 존재하였던 유리당이 주정침전 및 투석으로 제거된 것에 기인하는 glucose(86.4%→51.0%)의 현저한 감소와 이에 따른 galacturonic acid(9.4%→34.9%)의 상대적인 증가에 따른 활성다당류가 대식세포 자극활성에 유의하게 관련되어 있는 것으로 추정하였다. Li 등(2018)은 Sephacryl S-100 HR으로 분리한 마카 다당류의 구성당이 galacturonic acid(35.1%), glucose(30.0%), arabinose(17.0%)와 mannose(13.0%) 및 galactose와 rhamnose가

미량 함유되어진 것으로 보고하였으며 본 연구의 조다당 획득(G-CP)과 유사한 구성당 분포를 나타내었다. 결론적으로 대식세포 활성 골든 마카의 열수추출물로부터 분획한 활성 G-CP는 주로 glucose 및 galacturonic acid로 구성되어진 다당 획득분을 확인할 수 있었다. 따라서 향후 조다당 획득으로부터 활성 다당획분을 분리정제하고 그들의 결합양식 분석을 통해 구조적인 특성을 구체적으로 규명하여 면역활성 기능성 소재로서의 산업적인 활용가능성을 제고하고자 한다.

6. 조다당 획득의 분자량 추정

Kim 등(2009)의 연구에 따르면, 주정침전으로 분획된 조다당 획득은 일반적으로 고분자 물질로 구성된 단백다당이나 다당류로 알려져 있으며, 시료의 구성물질의 분자량을 확인하기 위해 gel permeation chromatography(GPC)를 이용하여 분석을 진행하였다. 표준물질로 dextran을 이용하여 standard curve를 작성하였을 때 correlation coefficient는 $R^2=0.9938$ 로 나타났으며, 시료의 retention time을 이용하여 분자량을 확인하였다. G-HW의 분자량 분포는 Fig. 3A에 나타내었는데, 8.61분과 18.38분의 retention time으로부터 4 kDa 이하 및 102 kDa의 주요 분자량을 확인하였고, 대식세포 활성 조다당 획득

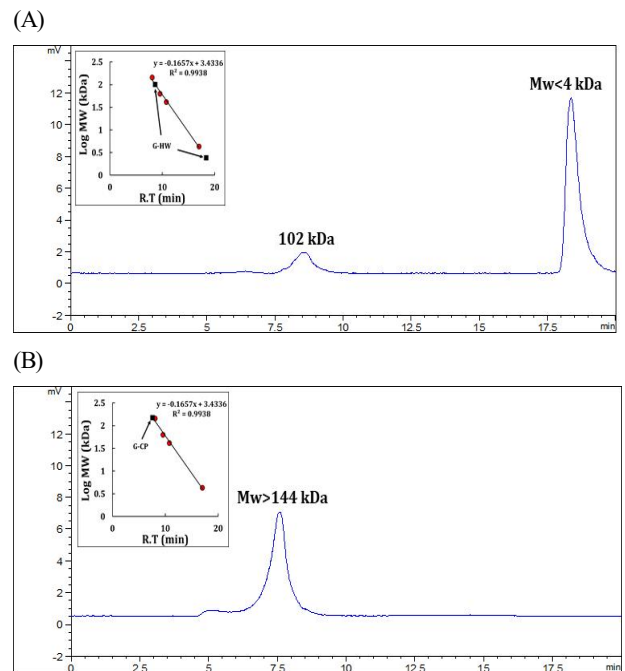


Fig. 3. HPLC chromatogram of molecular weight distribution of (A) G-HW, and (B) G-CP fractionated from golden (G) maca. Hot-water extract (HW) and crude polysaccharide (CP) were applied to the HPLC-ELSD system at dose of 10 mg/mL.

분인 G-CP는 7.58분의 단일 retention time으로 144 kDa 이상의 분자량 분포를 보였다. 한편, 분자량 분석결과에서 열수추출물(G-HW)은 4 kDa 미만의 저분자 물질 peak가 검출되었으나 활성 조다당 획분에서는 검출되지 않은 결과로부터, 열수추출물에서 유리당 또는 올리고당 수준으로 존재한 저분자 물질이 주정침전 및 투석을 통해 조다당 획분에서는 제거됨으로써 144 kDa 이상의 고분자 다당류 또는 단백다당류가 검출된 것으로 추정할 수 있었다. Jang 등(2016)은 마카 물추출물의 분획물에 대한 대식세포 활성 연구에서 여과로 분리된 30 kDa 이상의 고분자 분획물이 저분자 분획물보다 대식세포 자극활성이 우수한 것으로 보고하여, 고분자 획분인 G-CP가 우수한 대식세포 자극활성을 나타낸 본 연구결과와 유사한 경향을 보여주었다. 결론적으로 골든 마카 열수추출물로부터 분획된 조다당 획분(G-CP)은 144 kDa 이상의 glucose 및 galacturonic acid를 주요 구성당으로 함유한 고분자 다당류로 대식세포 활성에 관여하는 것으로 확인되어, 향후 G-CP의 대식세포 활성기전을 밝혀 면역증진 기능성 소재로서의 활용가능성을 높이고자 한다.

요약 및 결론

마카 추출물의 면역관련 기능성 식품의 산업적 적용 가능성을 평가하고자, 2종의 레드(R) 및 골든(G) 마카를 각각 냉수추출(cold water extract; CW) 및 열수추출(hot water extract; HW)을 진행하고 이에 따라 조다당 획분(crude polysaccharide; CP)을 조제하여 대식세포 자극 활성을 평가하였다. 대식세포 자극활성 평가는 RAW 264.7 세포에서 독성이 없는 125~500 µg/mL의 농도 범위에서 평가되었으며, 냉수추출물에 비해 열수추출물이 통계적으로 높은 TNF-α, IL-6 및 산화질소 생산 증진을 보였고 G-HW가 4종의 추출물중 가장 우수한 효과를 나타내었다. 구성성분 분석결과, 90% 이상의 중성당을 포함하고 있었으며, 소량의 산성당, 단백질 및 폴리페놀을 함유하고 있었다. 반면, 냉수추출물과 열수추출물은 산성당의 함량에 따른 다른 구성당 분포를 나타냈으며, 활성이 우수하였던 G-HW의 조다당 분획을 통해 대식세포 자극활성을 평가한 결과, 조다당 분획(G-CP)은 대조군으로 이용된 G-HW보다 활성이 크게 강화된 것으로 보였다. 또한, G-CP는 glucose, galacturonic acid가 각각 51.0%, 34.9%로 높은 비율을 나타냈으며, 144 kDa 이상의 고분자 물질을 포함하는 것으로 확인되었다. 결론적으로, 골든 마카가 레드마카보다 우수한 대식세포 자극 활성이 나타내는 것으로 확인되었으며, 골든 마카 유래 조다당은 산업적으로 면역자극 물질로서 적용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2021년 한국교통대학교 지원을 받아 수행하였음.

References

- Balick MJ, Lee R. 2002. Maca: From traditional food crop to energy and libido stimulant. *Altern Ther Health Med* 8:96-98
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54:484-489
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Choi HR, Lee MJ, Lee SJ, Park HJ, Song JY, Kim IS, Shin D. 2018. Effect of *Lepidium* spp. (Maca) extract on the improvement of sexual function in rats induced erectile dysfunction with ethanol. *Korean J Food Nutr* 31:328-334
- Choi S. 2017. Quality characteristics of yanggaeng added with maca (*Lepidium meyenii*) powder. *Culin Sci Hosp Res* 23:121-128
- Clement C, Diaz Grados DA, Avula B, Khan IA, Mayer AC, Ponce Aguirre DD, Manrique I, Kreuzer M. 2010. Influence of colour type and previous cultivation on secondary metabolites in hypocotyls and leaves of maca (*Lepidium meyenii* Walpers). *J Sci Food Agric* 90:861-869
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Gonzales GF, Gonzales C, Gonzales-Castañeda C. 2009. *Lepidium meyenii* (Maca): A plant from the highlands of Peru - from tradition to science. *Forsch Komplementmed* 16:373-380
- Honda S, Akao E, Suzuki S, Okuda M, Kakehi K, Nakamura J. 1989. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal Biochem* 180:351-357
- Hsieh YH, Ofori JA. 2007. Innovations in food technology for health. *Asia Pac J Clin Nutr* 16:65-73
- Jang M, Lim TG, Hong HD, Rhee YK, Kim KT, Lee E, Lee JH, Lee YJ, Kim YB, Cho CW. 2016. Immuno-stimulatory activities of a high molecular weight fraction from

- Cynanchum wilfordii* radix obtained by ultrafiltration. *Korean J Food Sci Technol* 48:268-274
- Jeon IS, Kang YS, Chung HJ. 2011. Quality characteristics of drink with maca (*Lepidium meyenii*) extract and evaluation of its antioxidant activity during storage. *Korean J Food Preserv* 18:669-677
- Kim H, Park CK, Jeong JH, Jeong HS, Lee HY, Yu KW. 2009. Immune stimulation and anti-metastasis of crude polysaccharide from submerged culture of *Hericium erinaceum* in the medium supplemented with Korean ginseng extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:1535-1542
- Kim H, Song KY, Jeong JH, Jeong HS, Lee HY, Yu KW. 2011. Immune enhancement of polysaccharide from submerged culture with *Phellinus linteus* in the medium supplemented with ginseng extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:20-28
- Kim H, Kim YK, Choi JH, Lee MK. 2017. Anti-nociceptive effects of maca (*Lepidium meyenii*) extract on temporomandibular joint pain in rats. *J Korean Soc Oral Health Sci* 5:16-21
- Kwon YS, Jeon IS, Hwang JH, Lim DM, Kang YS, Chung HJ. 2009. Biological activities of maca (*Lepidium meyenii*) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:817-823
- Lee HM, Park EJ, Jeon IS, Kang YS, Jin DI, Chung HJ. 2010. Effect of maca supplementation on scopolamine-induced memory impairment of mice. *Korean J Food Nutr* 23:485-491
- Lee YK, Chang YH. 2018. Process optimization of methanol extract from maca leaves and its physicochemical properties. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 47:543-549
- Li S, Hao L, Kang Q, Cui Y, Jiang H, Liu X, Lu J. 2017. Purification, characterization and biological activities of a polysaccharide from *Lepidium meyenii* leaves. *Int J Biol Macromol* 103:1302-1310
- Li Y, Xu F, Zheng M, Xi X, Cui X, Han C. 2018. Maca polysaccharide: A review of compositions, isolation, therapeutics and prospects. *Int J Biol Macromol* 111:894-902
- López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sába P. 2014. HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: Extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. *J Funct Biomater* 5:43-57
- Lopez-Fando A, Gómez-Serranillos MP, Iglesias I, Lock O, Upamayta UP, Carretero ME. 2004. *Lepidium peruvianum* chacon restores homeostasis impaired by restraint stress. *Phytother Res* 18:471-474
- Ochoa C. 2001. Maca (*Lepidium meyenii* Walp.; Brassicaceae): A nutritious root crop of the central andes. *Econ Bot* 55:344-345
- Park SJ, Kim OL, Rha YA. 2017. Component analysis and antioxidant activity of maca. *Culin Sci Hosp Res* 23:137-144
- Rubio J, Dang H, Gong M, Liu X, Chen SL, Gonzales GF. 2007. Aqueous and hydroalcoholic extracts of black maca (*Lepidium meyenii*) improve scopolamine-induced memory impairment in mice. *Food Chem Toxicol* 45:1882-1890
- Shin HY, Kim H, Jeong EJ, Kim HG, Lee KH, Bae YJ, Kim WJ, Lee S, Yu KW. 2021. Evaluation of the physiological activity and identification of the active ingredients of crab apple (*Malus prunifolia* Borkh.) extracts. *Korean J Food Nutr* 34:477-486
- Shin HY, Kim H, Shin JY, Lee SJ, Yu KW. 2021. The physiological activity of crude polysaccharide solvent extracted from herbal medicine mixture. *Korean J Food Nutr* 2021:36-46
- Tursun X, Zhao Y, Talat Z, Xin X, Tursun A, Abdulla R, AkberAsia H. 2016. Anti-inflammatory effect of *Rosa rugosa* flower extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biomol Ther* 24:184-190
- Wang W, Zou Y, Li Q, Mao R, Shao X, Jin D, Zheng D, Zhao T, Zhu H, Zhang L, Yang L, Wu X. 2016. Immunomodulatory effects of a polysaccharide purified from *Lepidium meyenii* Walp. on macrophages. *Process Biochem* 51:542-553
- Zha Z, Wang SY, Chu W, Lv Y, Kan H, Chen Q, Zhong L, Yue L, Xiao J, Wang Y, Yin H. 2018. Isolation, purification, structural characterization and immunostimulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Lepidium meyenii*. *Phytochemistry* 147:184-193
- Zheng W, Du S, Tian M, Xu W, Tian Y, Li T, Fu Y, Wu S, Li C, Jin N. 2018. *Lepidium meyenii* Walp exhibits anti-inflammatory activity against ConA-induced acute hepatitis. *Mediators Inflamm* 2018:8982756

Received 30 November, 2021

Revised 05 January, 2022

Accepted 13 January, 2022