발효 천마의 기능성 물질 함량 변화 및 항산화 활성

†김미현 · 김종규* · 최재홍*

경일대학교 식품과학부, *㈜내츨씨앤에프

Antioxidant Activity and Changes in Major Functional Components of Fermented *Gastrodia elata* Blume

†Mi Hyun Kim, Jong Gyu Kim* and Jae Hong Choi*

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

*Natural C&F, Andong 760-805, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the antioxidant activity and changes in major functional components of fermented *Gastrodia elata* Blume. Fermented *G. elata* Blume powder by *Phellinus linteus* repeated thrice (3rd FGP) showed more DPPH radical scavenging activity than a non-fermented *G. elata* Blume powder (NFGP), and once fermented *G. elata* Blume powder (1st FGP) at a concentration of 500 and 1,000 ppm. Free radical scavenging activity of 3rd FGP was similar to that of BHA at a dose of 1,000 ppm. Moreover, the ABTS radical scavenging activity of the 3rd FGP increased compared to NFGP and 1st FGP at a concentration of 31.25 ppm. Total polyphenols and flavonoid contents were increased as fermentation progressed. Ergothioneine content was increased more than 8 times in the 1st FGP, 3 times in the 3rd FGP, respectively than NFGP. In conclusion, this study indicated that the antioxidant activity and functional component contents of *G. elata* Blume were increased depending on the fermentation number.

Key words: antioxidant activity, ergothioneine, fermentation, *Gastrodia elata* Blume, *Phellinus linteus*

서 론

활성 산소종에 의한 산화적 스트레스는 인체 조직과 세포의 지질 과산화, 단백질 불활성화 및 DNA 변성 등을 초래하여 암, 심혈관계질환, 당뇨병 및 자가면역질환 등을 유발하는 것으로 알려져 있다(Ames BN 1983; Aruoma 등 1991; Rhim & Choi 2010). 이러한 산화적 스트레스로부터 생체를 보호할 수 있도록 항산화 물질을 섭취하는 것은 매우 중요하다. BHA(butylated hydroxyanisole)와 BHT(butylated hydroxytoluene) 등과 같은 합성 항산화제는 우수한 항산화 효과로 인해 식품 산업에서 널리 사용되고 있으나, 암을 비롯한 부작용으로 인하여 천연물 유래의 안전한 항산화 물질에 대한 관심이 증가하고 있다(Iqbal 등 2005; Kim & Kang 2010).

천마(*Gastrodia elata* Blume)는 다년생 난과 식물로 독자적인 생존이 불가능하여 뽕나무 버섯균(*Armillaria* sp.)과 공생하여 자라는 기생식물이다. 천마는 주로 한국, 일본, 중국 등에서 자생하고 있으며, 맛은 매우며 독성이 없는 것으로 알려져 있다. 여러 연구에서 천마는 항고혈압, 항당뇨, 항염증, 항산화 효능 및 세포의 DNA 손상에 대한 보호 효과가 있음이 보고되었다(Paik 등 1995; Kim 등 2011).

천마에 함유된 유효성분으로는 gastrodin, vanillyl alcohol, *p*-hydroxybenzyl alcohol, ergothioneine, phenolglycoside, benzaldehydes 및 페놀성 배당체 등이 있으며, 이러한 기능성 물질들의 생리활성 효과가 여러 연구에서 보고되고 있다(Taguchi 등 1996; Lee 등 2006; Lee 등 2012; Kim & Park 2013). 특히 ergothioneine은 천연의 수용성 아미노산으로 자유기(free radical)

† 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

를 제거하거나 항산화 효소의 활성을 증가시키는 다양한 기전을 조절하여 강력한 항산화 효과를 나타내며, 그 외에도 세포보호, 항염증 및 면역조절 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Franzoni 등 2006; Martin KR 2010; Ito 등 2011; Weigand-Heeler 등 2012). 천마에 함유된 ergothioneine은 공생하는 뽕나무 버섯에 의해 합성되어 천마에 축적되는 것으로, 귀리, 내장육, 팥, 버섯 등 ergothioneine 급원식품 중에서 천마에 가장 많은 양이 함유되어 있다(Ey 등 2007; Kim & Park 2013).

최근 인체에 유익한 미생물 발효에 의한 천연물의 기능성 성분 증가와 생리활성 효과에 대한 관심이 증가하고 있으나 (Sung 등 2013; Cho 등 2014), 천마 발효 추출물의 생리활성 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다. 또한 이전의 발효 천마에 대한 연구들은 천마를 1차 발효시켰을 때 항산화 및 항암 활성(Heo 등 2006; Park 등 2012)과 품질특성(Kim 등 2010)을 평가하였다. 따라서 본 연구에서는 식품 발효에 널리 사용되어온 상황버섯균사체(*Phellinus linteus*)를 이용하여 천마 분말을 1차 발효한 다음, 동일한 발효공정을 2회 반복 실시하여 3차 발효물을 생산하여 발효 횟수에 따른 기능성 물질 함량의 변화와 항산화 활성을 분석하여 기능성 식품 소재화 연구의 기초자료로 활용하고자 하였다. 또한 다중 발효 천마 분말의 생리활성을 살펴본 선행연구에서 1차 발효물과 2차 발효물의 유효물질 함량과 항산화 활성이 유의한 차이가 없어 본 연구에서는 1차 발효물과 3차 발효물의 생리활성을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 연구에 사용한 천마는 2012년 무주 안성 천마 영농조합법인에서 재배 수확한 건조 천마(*Gastrodia elata* Blume) 슬라이스를 구입하여 이용하였다. 천마 분말은 건조 천마 슬라이스를 증류수로 세척하여 이물질을 제거하고, 70℃ 열풍건조기로 수분율이 7%가 되도록 건조한 후, 분쇄기를 이용하여 80~100 mesh 정도의 입자 크기로 분쇄한 다음 실험재료로 사용하였다.

2. 균주 배양 및 발효 천마 제조

선행연구에서 균주별로 배지 종류, 천마 분말 함량, 배양 온도 및 시간에 따른 진균 생육 상태를 탐색한 결과, 상황버섯(*Phellinus linteus* KCTC 6190)을 15%의 천마 분말을 함유한 potato dextrose agar(PDA) 배지에서 25℃, 4~7일간 배양하였을 때 균사의 생장이 가장 활발한 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서는 발효균주인 *Phellinus linteus*를 PDA 배지에 접종하여 25℃의 배양기에서 7일 동안 배양한 후 cork borer

로 절취하여 증류수 1 L에 글루코오스 20 g, sugar 10 g을 포함하는 균사체 배양배지에 5~10%(v/w) 접종하여 25~30℃에서 4~7일간 배양하였다. 이 후 배양균주를 분쇄기로 균질화하여 배양배지 200 L가 들어있는 액체배양기에 1 L를 접종하여 25℃에서 4~7일간 배양하여 종균으로 사용하였다.

멸균 처리한 천마 분말을 배양액에 수분율이 15~30% 되도록 혼합한 후, 25℃, 습도 65~80%에서 7일간 발효하였다. 1차 발효 후 발효 분말의 수분율이 7% 이하가 되도록 70℃에서 8~12시간 열풍건조하여 121℃에서 15분 간 멸균하였다. 멸균 처리한 1차 발효 천마 분말은 동일한 발효조건으로 2회 반복 발효한 후 121℃에서 15분간 멸균하여 미생물과 효소를 불활성화하고 동결건조하였다.

3. 시료 추출

천마 분말과 1차 및 3차 발효 천마 분말의 에탄올 추출물은 시료 80 g에 70% 에탄올 800 mL를 가하여 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 이를 2,515×g에서 5분 동안 원심분리하여 상층액을 수집한 후 여과지(Whatman No. 4)로 여과하여 회전감압농축기(EYELA, Rikakikai, Co., Japan)로 농축하였다. 농축된 시료는 동결건조한 후 -20℃에서 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

4. DPPH 라디칼 소거능

천마 분말과 1차 및 3차 발효 천마 분말의 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 Blois MS(1958)의 방법에 의해 측정하였다. 우선 시료를 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)에 용해하여 2 mL의 7.5×10^{-5} M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)를 혼합하고, 37℃에서 30분간 반응시킨 다음 UV/Visible spectrophotometer(HS 3300, Humas Co., Korea)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 합성항산화제인 BHA를 사용하였으며, 시료의 전자공여능은 아래와 같은 식에 산출하였다. 또한 시료농도와 저해능(inhibition) 사이의 관계식을 구하여 자유라디칼의 활성을 50%로 저해하는데 필요한 농도인 IC₅₀ 값을 구하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = 1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구의 흡광도}} \times 100$$

5. ABTS 라디칼 소거능

시료의 ABTS 라디칼 소거능의 측정은 Re 등(1999)의 방법에 의해 측정하였다. 7 mM 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS, Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)와 2.45 mM K₂S₂O₈을 1:1로 혼합하여 암소에서 14시간 반응시켜

ABTS⁺를 형성시킨 후, 413 nm에서 흡광도를 측정하여 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 각 농도별로 희석한 시료 40 µL에 ABTS 용액 4 mL를 혼합하여 1분간 반응시킨 후 413 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 식에 의해 저해율을 산출하였으며, 자유라디칼의 활성을 50%로 저해하는데 필요한 농도인 IC₅₀ 값을 구하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능(\%)} = 1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구의 흡광도}} \times 100$$

6. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

시료의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 법에 의해 측정하였다(Pellegrini 등 1999). 시료 1 mL에 증류수 5 mL, Folin-Ciocalteu reagent(Sigma-Aldrich Co., LLC, USA) 0.5 mL를 혼합하여 8분간 반응시켰다. 반응물에 7% Na₂CO₃ 10 mL를 첨가하고, 증류수로 최종 부피를 25 mL로 맞추어 상온에서 2시간 방치한 후 UV/Visible spectrometer를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid(Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)를 사용하여 표준 검량선을 구하고, 시료추출물의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

플라보노이드 함량은 Moreno 등(2000)의 방법에 따라 측정하였다. 10% aluminum nitrite 100 µL와 1 M potassium acetate 100 µL, 80% 에탄올 4.3 mL를 혼합한 후 시료 0.5 mL를 첨가하여 실온에서 40분간 반응시켰다. 반응 후 반응액의 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였다. 표준물질로는 quercetin(Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)를 사용하였으며, 표준 검량선 구한 후 시료 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

7. Gastrodin, vanillyl alcohol 및 ergothioneine 함량 분석

천마에 함유된 유효성분인 gastrodin과 vanillyl alcohol 함량은 Ong 등(2007)의 방법에 의해 분석하였다. 즉, 시료 50 mg에 50% methanol 2.5 mL를 첨가하여 상온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 후 반응액을 2,038×g에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 0.22 µm filter로 여과한 다음 HPLC로 분석하였다. 표준용액은 gastrodin(Tauto Biotech, China)과 vanillyl alcohol(TCI laboratories, USA)을 증류수에 각각 30, 60, 125, 250 ng/µL의 농도로 희석하여 사용하였다. HPLC column은 Luna C₁₈ (250×21.2 mm, 5 M)을 사용하였고, 이동상은 0.5% formic acid water와 0.5% formic acid methanol을 이용하였다. 유속은 0.7 mL/min, 흡광도는 270 nm이었다.

시료에 함유된 ergothioneine 함량은 Lee 등(2009)의 방법에 따라 분석하였다. 시료 0.2 g에 10 mL cold ethanolic extraction buffer(10 mM DTT, 100 M betain, 100 M MMI in 70% ethanol)

를 첨가한 후 3분 동안 sonication하였다. 혼합액에 2 mL의 1% ethanolic solution을 첨가하고, 1분 동안 상온에서 반응시킨 후 2,038×g에서 20분 동안 원심분리하였다. 상등액 3 mL를 농축하여 50 mM sodium phosphate와 3% acetonitrile에 녹여서 HPLC로 분석하였다. 표준용액은 ergothioneine(Sigma-Aldrich Co., LLC, USA)를 증류수에 용해시켜 6, 12, 25, 50 ng/µL의 농도로 희석하여 사용하였다. HPLC column은 Ecomosphere C₁₈(4.6×250 mm, 5 µm)을 사용하였고, 이동상은 50 mM sodium phosphate와 3% acetonitrile(pH 7.3)을 이용하였다. 유속은 1 mL/min, 흡광도는 254 nm이었다.

8. 통계처리

모든 결과는 Statistical Package for the Social Science Program (SPSS, version 21)을 사용하여 산출하였다. 모든 측정값은 3회 반복 측정하여 평균±표준편차로 나타내었다. 시료의 에르고티닌 함량과 ABTS 라디칼 소거능 사이의 상관성을 보고자 단일회귀분석을 수행하였다. 그룹간의 유의성을 분석하기 위해 일원분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 다음 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 사후검정하였다.

결과 및 고찰

1. 발효 횟수에 따른 DPPH 라디칼 소거능 변화

시료의 에탄올 추출물의 수율은 비발효 천마, 1차 및 3차 발효 천마 추출물이 각각 16.3, 13.6, 10.9%로 나타나, 발효 횟수에 따라 추출수율은 감소하였다.

발효 전과 발효 횟수에 따른 천마 에탄올 추출물의 농도별 DPPH 라디칼 소거능을 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. 비발효 천마와 발효 천마 모두 추출물의 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능 효과가 증가하였다. 비교적 저농도인 125 ppm과 250 ppm에서는 비발효 천마와 1차 및 3차 발효 천마의 라디칼 소거능에 유의한 차이가 없었다. 그러나 추출물의 농도 500 ppm, 1,000 ppm의 범위에서는 비발효 천마 추출물이 27.21%, 55.79%, 1차 발효 천마 추출물이 23.83%, 53.72%의 소거율을 나타내어 1차 발효에 의한 활성의 증가는 없었으나, 3차 발효 천마 추출물은 36.58%, 70.07%의 소거율을 나타내어 1차 발효에 비해 항산화 활성이 유의적으로 증가하였다. 또한 3차 발효 천마 추출물은 1,000 ppm의 농도에서 합성항산화제인 BHA와 유사하게 높은 항산화 활성을 나타내었다. 에탄올 추출물의 IC₅₀값은 비발효 천마가 101.3 ppm이었으며, 1차 발효 천마는 62.2 ppm, 3차 발효 천마는 61.3 ppm으로 발효가 진행됨에 따라 낮아져 항산화 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 1차 발효 및 3차 발효 천마 추출물의 경우, 합성항산화제인 BHA의 IC₅₀ 값(74.3 ppm) 보다 더

Fig. 1. The electron donating ability of ethanol extract from non-fermented and fermented *Gastrodia elata* Blume powder using the DPPH assay. NFGP: Non-fermented *Gastrodia elata* Blume powder, 1st FGP: Once fermented *Gastrodia elata* Blume powder, 3rd FGP: Fermented *Gastrodia elata* Blume powder repeated thrice. 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.

Fig. 2. The electron donating ability of ethanol extract from non-fermented and fermented *Gastrodia elata* Blume powder using the ABTS assay. NFGP: Non-fermented *Gastrodia elata* Blume powder, 1st FGP: Once fermented *Gastrodia elata* Blume powder, 3rd FGP: Fermented *Gastrodia elata* Blume powder repeated thrice. 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.

낮아 높은 항산화 활성을 나타내었다.

발효 천마의 총 폴리페놀 함량과 라디칼 소거능에 대한 Park 등(2012)의 연구에서는 에탄올 추출물의 농도 1, 2, 4, 8 mg/mL에서 비발효 천마에 비해 발효 천마의 DPPH 라디칼 억제 효과가 높다고 보고하여 1차 발효에서는 항산화 활성에 있어서 발효 전과 차이가 없었던 본 연구에서의 결과와는 다르게 나타났다. 그러나 Kim 등(2010)은 일반천마와 발효 천마의 전자공여능을 측정한 결과, 비타민 C는 90%, 일반천마는 91%, 발효 천마는 92%로 발효 후에도 항산화 활성이 유지된다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다. 이상과 같이 본 연구에서는 발효 횟수가 증가함에 따라 천마의 항산화 활성이 증대되는 것으로 나타나, 천마를 이용한 기능성 식품을 제조할 경우, 다중 발효에 의한 생리활성 증대 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 발효 횟수에 따른 ABTS 라디칼 소거능 변화

천마 에탄올 추출물의 발효에 따른 ABTS 라디칼 소거능을 비교한 결과는 Fig. 2에 제시하였다. 추출물의 농도에 따라 발효 전과 1차 및 3차 발효 후의 활성을 비교한 결과, 대조군으로 사용된 합성항산화제 BHA에 의해 전반적으로 낮게 나타났으나, 31.25 ppm의 농도에서는 비발효 천마(68.6%)와 1차 발효 천마 추출물(66.06%)에 비해 3차 발효 추출물(71.58%)에서 활성이 증가하였다. 시료 에탄올 추출물의 IC₅₀ 값은 비발효 천마가 14.8 ppm이었으며, 1차 발효 천마는 18.6 ppm, 3차 발효 천마는 16.8 ppm으로 비발효 천마에 비해 1차 발효

시에는 오히려 증가하였으나, 3차 발효 시 감소하는 것으로 나타났다.

본 연구의 1차 발효 천마 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 효모균을 이용하여 천마를 발효시킨 Park 등(2012)의 연구에서 보고된 발효 천마 추출물에 비해 높은 활성을 나타내었다. 이전의 연구들(Jeng 등 1994; Park 등 2012)에서는 DPPH와 ABTS가 소거하는 라디칼의 종류가 다르고, 기질과 반응물의 결합 정도에 차이가 있어 라디칼 제거능력에도 차이가 있다고 보고하였으나, 본 연구의 발효 천마 추출물은 DPPH 라디칼 소거 활성과 ABTS 라디칼 제거 능력이 유사한 것으로 나타났다.

3. 발효 횟수에 따른 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 변화

비발효 및 발효 천마 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 1에 나타내었다. 비발효 천마 추출물의 총 폴리페놀 함량은 95.8 mg GAE/g이었으며, 1차 발효 추출물은 143.5 mg GAE/g, 3차 발효 추출물은 338.4 mg GAE/g으로 나타나, 발효 후에 천마의 총 폴리페놀 함량이 증가하였다. 또한 발효 횟수가 증가할수록 총 폴리페놀 함량이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 본 연구의 발효 천마 추출물의 폴리페놀 함량은 가시오가피 상황버섯 발효 에탄올 추출물(29.46 mg GAE/g)에 비해 높은 것으로 나타났다 (Kim 등 2014). 또한 천마 및 발효 천마 에탄올 추출물은 인진쑥 에탄올 추출물(68.43 mg GAE/g), 토사자 에탄올 추출물

Table 1. Contents of total polyphenols and flavonoids of ethanol extracts from non-fermented and fermented *Gastrodia elata* Blume powder

Sample ¹⁾	Total polyphenols ²⁾ (mg GAE/g)	Flavonoids ³⁾ (mg QCE/g)
NFGP	95.8±0.1 ^{4)a5)}	147.7±0.1 ^a
1 st FGP	143.5±0.1 ^b	925.0±0.1 ^b
3 rd FGP	338.4±0.1 ^c	1,993.0±0.1 ^c

¹⁾ NFGP: Non-fermented *Gastrodia elata* Blume powder, 1st FGP: Once fermented *Gastrodia elata* Blume powder, 3rd FGP: Fermented *Gastrodia elata* Blume powder repeated thrice.

²⁾ mg of total polyphenol content/g of non-fermented and fermented *Gastrodia elata* Blume powder based on hesperitin as standard.

³⁾ mg/of flavonoids content/g of non-fermented and fermented *Gastrodia elata* Blume powder based on quercetin as standard.

⁴⁾ Date are expressed as Mean±S.D. (n=3).

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

(20.1 mg GAE/g) 및 흰삼덩굴 메탄올 추출물(30.13 mg GAE/g)에 비해 높았다(Jeon 등 2008; Kim 등 2012; Lee 등 2012).

플라보노이드 함량은 비발효, 1차 및 3차 발효 천마 에탄올 추출물이 각각 147.7, 925.0, 1,993.0 mg QCE/g으로 발효 횟수 증가에 따라 유의적으로 높게 나타났다. 천마와 발효 천마 추출물은 인진쑥 에탄올 추출물, 토사자 에탄올 추출물, 둥글레 및 하수오 열수 추출물 등 다른 약용식물에 비해 더 많은 플라보노이드를 함유하는 것으로 나타났다(Jeon 등 2008; Kim 등 2012).

식물에 존재하는 폴리페놀 화합물이나 플라보노이드는 천연 항산화제로 작용하며, 폴리페놀 화합물은 hydroxy radical 및 superoxide radical 소거능과, 플라보노이드는 alkylperoxyl 라디칼 소거능과 연관이 있다(Jeon 등 2008). 식물 중에 함유된 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 항산화 활성과 유의적인 상관관계가 있어 항산화 활성을 측정하는데 중요한 척도로 사용되며, 당뇨병, 고혈압, 심장질환 및 암에 효과가 있는 것으로 보고되었다(Kim 등 2004). 본 연구에서도 발효가 진행됨에 따라 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 증가하였고, 이에 비례해서 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성이 높아지는 것을 볼 때 다중 발효에 의해 증대된 플라보노이드와 여러 페놀성 화합물들이 발효 천마의 항산화 활성 증가에 기여하는 것으로 보인다. 발효에 의해 항산화 활성이 증가하는 기전으로 Park 등(2012)은 발효 중에 분비된 protease, amylase, lipase 등의 효소가 페놀성 물질들을 증가시킨 것으로 설명하고 있다. 향후 연구에서는 발효에 의해 천마의 기능성 성분 및 생리활성이 증가하는 가능한 기전에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

4. 발효 횟수에 따른 천마의 기능성 물질 함량 변화

천마의 발효 횟수에 따른 gastrodin, vanillyl alcohol 및 ergothioneine 함량을 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. 천마의 페놀성 물질로 gastrodin, *p*-hydroxybenzyl alcohol, vanillyl alcohol, vanillin와 비페놀성 화합물로 circiumaldehyde 등이 있으며, 이 중에서 gastrodin이 가장 많이 함유되어 있다고 알려져 있다(Liu 등 2002). Gastrodin은 항산화 작용, 항경련 작용, 항비만 및 항염증 작용에 효과가 있으며, 쥐의 혈관뇌관문을 통과하여 *p*-hydroxybenzyl alcohol로 분해된다(Kim & Park 2013). Vanillyl alcohol의 경우에는 항염증 및 혈관 생성 억제 기능이 있으며, 간질과 폐암 등에 효과가 큰 것으로 보고되고 있다(Liu 등 2002). 본 연구에서 발효가 진행됨에 따라 gastrodin과 vanillyl alcohol의 함량은 유의하게 감소하는 것으로 나타났다.

Ergothioneine은 상황버섯 균사체에는 139.4 µg/g DW, 비발효 천마, 1차 및 3차 발효 천마 에탄올 추출물은 각각 201.2, 1,625.4, 1,097.3 µg/g DW가 함유되어 있었다. 발효 전에 비해 발효 후에 ergothioneine 함량이 증가하였으나, 다중 발효 시 1차 발효에 비해 수치가 감소하는 것으로 나타났다. 또한 IC₅₀ 수치로 나타낸 ABTS 라디칼 소거능과 ergothioneine 함량과의 상관관계를 살펴보았을 때 유의적인 상관관계를 보이지 않았다(Fig. 4). 이는 버섯의 기능성 물질과 항산화 활성을 살펴본 이전의 연구들(Dubost 등 2006; Lee 등 2009)에서 버섯의 항산화 활성이 ergothioneine이 아니라, 페놀성 화합물과 상관관계가 있다고 보고한 것과 유사한 결과이다. 따라서 본 연구에서 천마 발효 횟수의 증가에 따른 라디칼 소거능의 증가는 gastrodin, vanillyl alcohol 및 ergothioneine의 영향보다는 정량되지 않은 다른 물질들을 포함한 페놀성 물질들의 총체적인

Fig. 3. Contents of three major functional components in *Gastrodia elata* Blume powder depending on the fermentation. NFGP: Non-fermented *Gastrodia elata* Blume powder. 1st FGP: Once fermented *Gastrodia elata* Blume powder, 3rd FGP: Fermented *Gastrodia elata* Blume powder repeated thrice. 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.

Fig. 4. Correlation between ergothioneine and the scavenging effect on ABTS radicals (mg/g DW) in non-fermented and fermented *Gastrodia elata* Blume powder.

기여효과로 보인다.

또한 ergothioneine은 담자균류 등의 균류에서만 생합성되는 아미노산으로 강력한 항산화 효과 외에도 항혈전, *r*-aminobutyric acid성 신경전달 조절 작용, 세포 보호, 항염증 및 면역 조절 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Franzoni 등 2006; Martin KR 2010). 천마에 함유된 ergothioneine은 공생하는 뽕나무 버섯이 나무로부터 분해한 영양분을 천마로 전달할 때 함께 전달되어 천마에 축적된다(Kim & Park 2013). 본 연구결과, 1차 발효 시에는 ergothioneine의 함량이 발효 전에 비해 증가하였으나, 3차 발효의 경우 1차 발효에 비해 함량이 감소된 이유로 다음과 같이 추정해 볼 수 있겠다. 발효 단계에서 ergothioneine의 생합성은 배지에 포함되어 있는 천마 성분에 의해 활성화 되는 것으로 보인다. 본 연구에서는 3차 발효 시에 1차 발효 천마 분말에 균사체를 접종하여 동일한 과정을 반복하였으므로, 각 발효 단계마다 천마 분말을 포함시키고, 기능성 물질 함량 증진에 대한 천마 분말의 적정 농도를 결정하는 연구가 필요할 것으로 보인다. 또한 천마의 ergothioneine은 버섯의 스트레스 반응 기작과 관련된 물질로 알려져 있어(Kim & Park 2013) 상황버섯 균주의 성장량과 상관이 있을 것으로 유추되므로, 추후 상황버섯균주의 성장량에 따른 기능성 물질 함량 분석에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

요약 및 결론

본 연구는 *Phellinus linteus*를 이용하여 천마를 발효시켜 발효 횟수에 따른 기능성 물질 함량의 변화와 항산화 활성을 분석하였다. 비발효 천마 추출물과 발효 천마 추출물의 항산화 활성을 평가하기 위해 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능을 비교하였다. 모든 추출물에서 농도 의존적으로

라디칼 소거능이 증가하였으나, 500 ppm과 1,000 ppm의 농도 범위에서 비발효와 1차 발효 천마 추출물에 비해 3차 발효 천마 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가하였다. 또한 3차 발효 천마 추출물의 ABTS 라디칼 제거 능력도 발효 전과 1차 발효 추출물에 비해 높은 것으로 나타났다. 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 발효 횟수에 따라 증가하여 이들 항산화 물질이 3차 발효 천마 추출물의 항산화 효과에 영향을 미치는 것으로 보인다. 천마에 함유된 대표적인 기능성 성분인 ergothioneine 함량이 발효 전에 비해 1차 발효 후에 약 8배, 3차 발효 시 5배 증가하였다. 따라서, 천마를 발효함에 따라 기능성 물질의 함량이 증가하고, 우수한 항산화 활성을 가지는 것으로 나타나, 천연항산화제 및 기능성 식품 신소재로서의 발효 천마의 이용 가능성을 확인하였다. 또한, 본 연구 결과를 기초로 하여 3차 다중 발효공정에서 천마 분말의 적정 첨가농도 및 발효균주의 성장량과 기능성 물질 함량과의 관계에 대한 연구가 이루어져 다중 발효에 대한 효과가 확인이 된다면 기능성 식품으로서 천마의 부가가치를 증대시킬 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 중소기업청에서 지원하는 2013년도 산학연협력 기술개발사업(No. C0114426)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Ames BN. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative disease. *Science* 221:1256-1264
- Aruoma OI, Karu H, Halliwell B. 1991. Oxygen free radicals and human disease. *J R Soc Health* 111:172-177
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Cho JH, Choi GH, Park IJ, Baik SO, Kim HH, Kim CS. 2014. Development of functional food materials from *Acanthopanax senticosus*-fermented mushroom mycelia. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43:411-418
- Dubost NJ, Beelman RB, Peterson D, Royse DJ. 2006. Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy. *Int J Med Mushrooms* 8:215-222
- Ey J, Schoming E, Tauber D. 2007. Dietary sources and antioxidant effect of ergothioneine. *J Am Chem Soc* 55:6466-6474

- Franzoni F, Colognato R, Galeeta F. 2006. An *in vitro* study on free radical scavenging capacity of ergothioneine, comparison with reduced glutathione, ruic acid and trolox. *Biomed Pharmacother* 60:453-457
- Heo JC, Park JY, An SM, Le JM, Yun C'Y, 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
- Iqbal S, Bhanger MI, Anwar F. 2005. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chem* 93:265-272
- Ito T, Kto M, Tsuchida H, Harada E, Niwa T, Osawa T. 2011. Ergothioneine as an anti-oxidative and anti-inflammatory component in several edible mushrooms. *Food Sci Technol Res* 17:103-110
- Jeng JW, Lee YC, Jung SW, Lee KM. 1994. Flavor components of citron juice as affected by the extraction method. *Korean J Food Sci Technol* 26:709-712
- Jeon YH, Kim MH, Kim MR. 2008. Antioxidative and anti-mutagenic activity of ethanol extracts from *Cuscutae semen*. *Korean J Food Cookery Sci* 24:46-51
- Kim DB, Shin GH, Lee JS, Lee OH, Park IJ, Cho 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, Hong HD, Lee BY, Lee OH. 2011. Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from *Cheonmyuncho* (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Preserv* 18:366-373
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36:333-338
- Kim HS, Kang YH. 2010. Antioxidant activity of ethanol extracts of non-edible parts (stalk, stem leaf, seed) from oriental melon. *Korean J Plant Res* 23:451-457
- 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 IS, Choi DK, Jung HJ. 2011. Neuroprotective effects of vanillyl alcohol in *Gastrodia elata* Blume through suppression of oxidative stress and anti-apoptotic activity in toxin-induced dopaminergic MN9D cells. *Molecules* 16:5349-5361
- Kim JM, Moon YS, Yoon KY, Suh SG. 2010. Quality properties and preference of fermented *Gastrodia elata* Blume. *Korean J Hort Sci Technol* 28:507-514
- Kim RJ, Kang MJ, Hwang CR, Jung WJ, Shin JH. 2012. Anti-oxidant and cancer cell growth inhibition activity of five different varieties of *Artemisia* cultivars in Korea. *J Life Sci* 22:844-851
- 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 WY, Park EJ, Ahn JK. 2009. Supplementation of methionine enhanced the ergothioneine accumulation in the *Ganoderma neojaponicum* mycelia. *App Biochem Biotech* 158:213-221
- 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 gastrodin, *p*-hydroxybenzyl alcohol, vanillyl alcohol, *p*-hydroxybenzaldehyde and vanillin in tall *Gastrodia* tuber by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 55:317-320
- 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
- Moreno MI, Isia MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71:109-114
- Ong ES, Heng MY, Tan SN, Yong JWH, Koh H, Teo CC, Hew CS. 2007. Determination of gastrodin and vanillyl alcohol in *Gastrodia elata* Blume by pressurized liquid extraction at room temperature. *J Separ Sci* 30:2130-2137
- Paik US, Song JK, Yoon CH, Chung KS, Yun-Choi HS. 1995. Anti-platelet and anti-thrombotic effects of *Gastrodia elata*. *Koeanr J Pharmacogn* 26:385-389
- 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 anti-oxidant 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

- Rhim TJ, Choi MY. 2010. The antioxidative effects of *Ampelopsis brevipedunculata* extracts. *Korean J Plant Res* 23:445-450
- Sung SK, Rhee YK, Cho CW, Kim YC. 2013. Physicochemical properties and antioxidative activity of fermented *Rhodiola sachalinensis* and Korean red ginseng mixture by *Lactobacillus acidophilus*. *Korean J Food & Nutr* 26:358-365
- Taguchi H, Yosioka I, Yamasaki K, Kim IL. 1996. Studies on

- the constituents of *Gastrodia elata*. *Phytochemistry* 42:549-551
- Weigand-Heller AJ, Kris-Etherton PM, Beelman RB. 2012. The bioavailability of ergothioneine from mushrooms (*Agaricus bisporus*) and the acute effects on antioxidant capacity and biomarkers of inflammation. *Preventive Med* 54:S75-S78

접 수 : 2014년 7월 4일
최종수정 : 2014년 8월 7일
채 택 : 2014년 8월 15일