

발효 천마 추출물의 생리 활성

박안나* · 구태규* · 김경선* · 이동원** · 김상진***,†

*에코바이오휘학연구소, **전북대학교 고분자 나노공학과, ***대전보건대학교 화장품과학과, ***케모리랩
(2015년 11월 11일 접수; 2015년 12월 21일 수정; 2015년 12월 28일 채택)

Physiological Activities of Fermented *Gastrodia elata* Blume Extracts

An Na-Park* · Tae Kyu-Ku* · Kyung Sun-Kim* · Dong Won-Lee** · Sang Jin-Kim***,†

*EcoBio Medical Institute, 1646, Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon 34054, Korea

**Department of Polymer-Nano Science and Technology, Chonbuk National University
567, Baekje-daero, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, 54896, Korea

***Department of Cosmetic Science, Deajeon Health Sciences College,
21, Chungjeong-ro, Dong-gu, Daejeon, 34504, Korea

***Chemolee Lab Corporation, 3820 Conflans Rd, Irving, TX 75061, USA

(Received November 11, 2015; Revised December 21, 2015; Accepted December 28, 2015)

요약 : 천마를 다양한 용매(물, 에탄올 및 70%) 및 다양한 농도 (0.725, 1.25, 2.5 및 5 mg/mL)로 추출하고 추출된 물질을 젖산균과 유용미생물(Effective Microorganisms)로 발효시킨 다음, 이들 물질들이 화장품 소재로 활용 가능한가를 확인하였다. 물, 에탄올 및 70% 에탄올로 추출한 물질들을 각각 0.725, 1.25, 2.5 및 5 mg/mL 농도에서 실험한 결과, flavonoid, polyphenol 및 DPPH free radical scavenger 등과 같은 항산화물질은 에탄올 추출물에 가장 많이 함유되어 있었고, DPPH radical 소거능은 유용미생물로 발효시킨 천마를 에탄올로 추출한 경우 1.25 mg/mL에서 $27.08 \pm 0.5\%$ 이었으나 2.5 mg/mL에서는 $27.08 \pm 0.5\%$ 로 증가하였다. 미백 활성을 측정할 수 있는 tyrosinase 활성 저해 실험에서는 EtOH 추출물을 젖산균으로 발효시켰을 때 가장 저해 효과가 우수하였고(0.725 mg/mL에서 $39.1 \pm 0.4\%$, 2.5 mg/mL에서 $62.8 \pm 1.5\%$), RAW 264.7 Cells을 이용한 세포 생존율 실험 결과 물, EtOH, 70% EtOH 추출물과 이들의 발효 물질 모두 85%이상의 세포 생존율을 나타내 세포의 염증에 대한 안정성을 확인하였다. ROS 생성으로 인한 항산화 실험에서는 양성 대조군으로 RAW 264.7 cells을 lipopolysaccharide로 자극시켜 활성화된 세포에 비발효와 발효에 따른 추출물을 농도별로 처리하였을 때 유용미생물로 발효시켰을 경우가 가장 항산화성이 높은 것으로 확인하였다. 이상과 같은 연구결과 천마 추출 및 발효 물질은 화장품용 항산화제, tyrosinase 활성 저해제 및 항염증제로 사용될 수 있음을 알았다.

주제어 : 천마, 발효, 항산화, tyrosinase 활성저해, 플라보노이드 및 폴리페놀 함량

†Corresponding author
(E-mail: kimsj@hit.ac.kr)

Abstract : This study was conducted to determine the feasibility of using *Gastrodia elata* Blume as a cosmetic raw material by investigating the physiological activities of its extracts, varying the concentration, solvent, and fermentation method (non-fermentation and fermentation using lactic acid bacteria and effective microorganisms). Of the extracts in three different solvents—water, EtOH, and 70% EtOH—at four different concentrations (0.725, 1.25, 2.5, and 5 mg/mL), the EtOH extracts demonstrated the highest contents of antioxidants (flavonoids, polyphenols, and DPPH free radical scavengers). The DPPH free radical scavenging activity in the EtOH extracts of EM-fermented *Gastrodia elata* Blume increased from $27.08 \pm 0.5\%$ at 1.25 mg/mL to $35.89 \pm 0.8\%$ at 2.5 mg/mL. The tyrosinase inhibitory activity test was performed to measure skin-whitening capacity and revealed the LB-fermented EtOH extracts to be the most efficacious ($39.1 \pm 0.4\%$ at 0.725 mg/mL, $62.8 \pm 1.5\%$ at 2.5 mg/mL). Viability was found to exceed 85% in RAW 264.7 cells treated with all extracts (water, EtOH, 70% EtOH at 10, 25, 50 μ L, fermented and non-fermented), thus proving that *Gastrodia elata* Blume extracts do not cause inflammation. When RAW 264.7 cells were stimulated with lipopolysaccharide as positive controls under the same conditions to determine the antioxidant activity in the presence of reactive oxygen species (ROS), EM-fermentation was found to impart excellent antioxidant capacity. This study verified the physiological activities of fermented *Gastrodia elata* Blume extracts that are best suited for cosmetic ingredients, such as antioxidants, tyrosinase inhibitors and anti-inflammatory agents.

Keywords : *Gastrodia elata* Blume, fermentation, antioxidant activity, tyrosinase inhibitory activity, flavonoid and polyphenol

1. 서론

현대 산업사회의 발달로 경제적인 여유와 문화적인 혜택을 누리는 현대인들은 질병과 고령화 사회로의 변화에 따라 삶의 질에 대한 인식이 변하고 있어 일상적으로 섭취하고 있는 식용 식물을 대상으로 항산화, 항균 및 항암작용 등을 탐색하고 이들로부터 분리된 효과가 우수한 생리 활성 물질을 식품 보존제, 건강 보조식품, 나아가 의약품 및 화장품등에 이용하고 있다. 특히 천연 식물에 들어있는 생리 활성 성분에 대한 관심이 높아 이들을 함유한 천연 식물 소재들을 천연 항산화제의 원료로 이용하려는 시도가 많이 이루어지고 있다[1]. 식물계에 널리 분포되어 있는 총 페놀성 화합물은 다양한 구조와 분자량을 가진 2 차대사 산물로서 항산화 활성과 항암 및 항균 작용을 하는 생리 활성 물질로 알려져 있으며[2], 최근 화장품 산업에서는 천연 원료를 이용한 제품은 물론이고 발효라는 새로운 생명 공학 기법을 적용하여 친환경이라는 컨셉에 맞는 제품을 연구, 개발하고 있다.

천마(*Gastrodia elata* Blume)는 난초과

(Orchidaceae)에 속하는 다년 초본 식물로 탄소 동화작용이 불가능하여 담자균류인 썩나무 버섯속(*Armillaria mellea*) 균사와 공생하여 생육하며, 한방에서는 고혈압, 두통, 마비, 신경성 질환, 당뇨병, 간질, 어지럼증 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다[3]. Gastrodin, vanillyl alcohol, vanillin, benzaldehyde, p-hydroxybenzyl alcohol 등의 약리 성분이 함유되어 있으며[4] 특히 vanillyl alcohol, β -sitosterol 과 stigmasterol 은 항염 작용이 있는 것으로[5,6], 메탄올 분획물은 항혈전 작용, 에탄올 분획물은 항경련 작용이 우수한 것으로 보고되었고[7], Liu 등은 멜라닌 생성 억제 작용이 있다고 보고하였다[8,9]. 최근에는 효모를 이용하여 발효시켰을 경우, 발효를 시키지 않았을 때보다 항산화 식품으로서의 활용 가치가 훨씬 더 우수하다고 발표되기도 하였다[10]. Kang 등은 꾸지뽕을 발효시키기 전보다 발효 시킨 후에 페놀 함량이 증가하였다고 하였으며[11], Jeon 등은 인삼열매를 유산균으로 발효시켰더니 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였다고 보고하였고[12], Park 등은 당을 첨가하여 발효시켰을 때가 발효 시키지 않았을 때 보다 총 페놀

의 함량이 증가하였고, 효모균으로 발효시켰을 때 HBA의 함량이 더 증가하였으며 이로 인해 DPPH 라디칼 소거능과 superoxide 소거능이 증가하였다고 보고하면서, 발효 중 protease, amylase, lipase 등의 효소가 페놀성 물질들을 증가하는데 기인한 것으로 판단된다고 하였다[10]. 하지만 이들은 화장품으로써의 적용 가능성을 검토하지 않았던바 본 연구에서는 발효시킨 천마 추출물의 생리 활성에 대한 연구를 보완하고 화장품 소재로서의 가능성을 검토하기 위하여 천마를 물과 에탄올 등으로 추출하고, 추출된 물질을 유산균과 EM으로 발효 시킨 후 추출 및 발효 물질에 대한 플라보노이드와 폴리페놀 함량, DPPH radical 소거능, tyrosinase 활성 저해력, 세포 생존율, ROS 생성 등을 확인하여 화장품 소재로서의 활용 가치를 규명하고자 한다.

2. 실험

2.1. 실험재료

2.1.1. 천마 추출물

천마는 전남 무주군 적상면 사천리 행복과수원에서 2014년 11월에 수확하여 자연 건조시킨 절편을 구입하여 사용하였다. 천마 절편은 각각 80°C의 물, 60°C의 70% EtOH 및 60°C의 EtOH로 6시간 동안 추출하였고, 추출액은 여과지(Advantec No.2)를 이용하여 불순물을 제거한 다음 회전 증발 농축기(Rotary evaporator N-1000SW, Eyela)를 이용하여 감압 농축(40°C, 80 rpm, -0.08 Mpa) 시키고 -70°C의 초저온 냉동고(Deep freezer DE8514, Ilshin Lab co, Ltd, Korea)에 24시간 보관 한 후 -60°C, 5 mTorr에서 동결 건조(Lyophilizer FD5508, Ilshin Lab co, Ltd, Korea) 시킨 다음 실험에 사용하였다.

2.1.2. EM 발효물

천마 추출물을 EM으로 발효시키기 위하여 사용된 EM 활성액은 에버미라클(www.evermiracle.com)에서 구입하여 사용하였다. 용매별로 추출한 추출물을 발효시키기 위해 EM 활성액은 6%, 설탕은 5%로 하였으며 37°C 인큐베이터에서 7일간 발효시켜 실험에 사용하였다.

2.1.3. 젖산균 발효물

천마 추출물을 젖산균으로 발효시키기 위하여 시험관에 증류수 10 mL과 천마 추출물 10 mg 및 젖산균 0.1 mL의 비율로 넣고 잘 섞은 다음 37°C 인큐베이터에서 2일간 발효시켜 실험에 사용하였다.

2.1.4. 세포주

실험에 사용된 세포주 RAW 264.7 (Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line, KCLB 40071, KOREA)은 Korean Cell Line Bank (KCLB, Seoul, Korea)로부터 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO)과 1% antibiotics (penicillin 100 units/mL 및 streptomycin 100 μ g/mL)가 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, low Gibco)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 실험에 사용하였다.

2.2. 생리 활성 측정

2.2.1. 플라보노이드 함량

천마 추출물 중의 g당 총 플라보노이드 함량을 측정하기 위하여 diethylene glycol 비색 방법[13]을 이용하였다. 추출시료 100 μ L와 1N NaOH 100 μ L, diethylene glycol 1 mL를 혼합한 후 30°C water bath에서 1시간 동안 반응 시켰다. 반응 후 UV/Vis spectrophotometer (Mecasys co. Korea)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.2. 폴리페놀 함량

천마 추출물 중의 g당 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위하여 Folin-Danis 방법[14]을 이용하였다. 추출시료 100 μ L와 2% Na₂CO₃ 1 mL를 혼합한 후 상온에서 2분 동안 반응 시키고 다시 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μ L를 첨가하여 30 분 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 후 UV/Vis Spectrophotometer (Mecasys co.,)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.3. DPPH radical assay

천마 추출물의 항산화력은 Choi 등의 실험 방법[15]을 변형시킨 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거 능력으로 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능 측정 방법은 항산화 물

질의 전자 공여능을 측정하는 방법으로 천연물에서 많이 사용되어지는 실험방법이다. DPPH 용액은 pH 7.4의 0.1 M Trizma base-HCl buffer (Tris-HCl buffer)와 methanol을 이용하여 500 mM로 하였으며, 추출시료 100 μ L, 0.1 M Tris-HCl buffer 400 μ L 그리고 500 mM DPPH 500 μ L를 혼합 후 차광 상태의 실온에서 30분간 반응을 유도한 다음 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료 무첨가군은 0.1 M Tris-HCl buffer 500 μ L를 사용하였으며 DPPH radical 소거 활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군 간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

DPPH radical 소거능 =

$$\left(100 - \frac{\text{시료 첨가군 흡광도}}{\text{시료 무첨가군 흡광도}}\right) \times 100$$

2.2.4. Tyrosinase inhibition activity

Tyrosinase 저해활성은 Choi와 Oh 등의 실험 방법[16]을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. *in vitro* 상에서 mushroom tyrosinase 활성 저해 능력을 측정하기 위하여 2.5 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) 0.3 mL, 추출시료 0.05 mL 및 pH 6.8의 0.1 M Phosphate buffer로 총량을 1.5 mL로 한 다음 25°C에서 preincubation시켰다. 여기에 1,380 unit/mg mushroom tyrosinase (3,610 unit, Sigma Chem. Co., USA) 0.05 mL을 넣고 25°C에서 2분간 반응 시킨 다음 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tyrosinase 활성 저해율(%) =

$$100 - \left[\frac{(A - B)}{A} \right] \times 100$$

A : 시료가 들어 있지 않은 반응액의 흡광도

B : 시료가 들어 있는 반응액의 흡광도

2.2.5. MTT assay

세포 생존을 측정은 Ko와 Kim의 방법[17]에 따라, RAW 264.7 cells를 96 well plate에

3×10^5 cells/well의 밀도로 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양시킨 후 각 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide] solution을 각 well에 100 μ L씩 넣고 4시간 배양한 다음 상층액을 제거하고, 형성된 formazan을 DMSO (Dimethyl sulfoxid) 용액 100 μ L로 녹여서 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 시료용액 첨가군과 무첨가군의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

A : Absorbance of untreated Raw 264.7 cell at 570 nm

B : Absorbance of extract sample at 570 nm

2.2.6. Reactive Oxygen Species

Reactive Oxygen Species (ROS)의 생성을 확인하기 위하여 형광물질인 Dichlorofluorescein (DCF)를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 (Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line) cells를 96 well plate에 3×10^5 cells/well의 농도로 파종하고 상기의 배양액으로 각 지지체당 3개씩 정적 배양하였다. 음성 대조군으로는 RAW 264.7 cells 세포만을 배양하였으며, 양성 대조군으로는 RAW 264.7 cells 세포와 염증 유발 물질인 Lipopolysaccharides (LPS)를 첨가하여 12시간 동안 배양하였다. 5 μ M DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein-diacetate)를 첨가한 후 37°C에서 20분 동안 incubation 시키고 trypsinization와 PBS를 통하여 세포를 얻어 FACS Calibur (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)를 이용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 플라보노이드 및 폴리페놀 함량 측정 결과

추출방법에 따른 천마 중의 플라보노이드 및 폴리페놀 함량은 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 플라보노이드는, 80°C 물 추출물에서는 6.83 ± 2.14 mg/g, EtOH 추출물에서는 23.33 ± 3.25

mg/g, 70% EtOH 추출물에서는 33.99 ± 2.45 mg/g이 얻어져 70% EtOH로 추출 하였을 때 가장 많은 플라보노이드가 얻어졌다. C6-C3-C6 구조를 갖고 있어 항산화 활성을 측정하는데 중요한 척도로 활용될 수 있는[18] flavonoid는 황색 색소 화합물의 총칭으로 flavone, flavanone, isoflavones, flavonol, flavanol, flavanonol, anthocyan, chalcone 등이 여기에 속하며 항알레르기, 항염, 항암, 항균, 항 혈전, 항 알레르기 및 항산화 효과가 있음이 알려져 있다[19].

폴리페놀은, 물 추출물에서는 18.43 ± 4.67 mg/g, EtOH 추출물에서는 105.37 ± 15.93 mg/g, 70% EtOH 추출물에서는 100.91 ± 21.54 mg/g가 얻어져 EtOH 추출에서 가장 많은 폴리페놀을 얻을 수 있었으며 그 다음으로는 70% EtOH, 물의 순으로 얻어졌다. Park 등이 조릿대 잎에 대한 실험에서도 70% EtOH로 추출하였을 경우 물로 추출하였을 경우보다 많이 얻어져 본 실험과 유사한 결과임을 확인할 수 있었으며[20], 마늘을 이용한 Chang 등의 항산화 활성 실험에서 폴리페놀 함량은 70% EtOH 추출물이 물 추출물에 비하여 많은 양이 얻어져 [21] 이 또한 본 실험과 유사한 결과임을 확인할 수 있었다.

3.2. DPPH radical assay

천마를 용매로 추출하기 전과 후 및 추출된 물질을 발효시키기 전과 발효 시킨 후의 DPPH radical 소거능 차이를 비교 실험하였다. 이때 추출물의 농도는 농도별 경향을 파악하기 위해 0.725, 1.25, 2.5, 5 mg/mL의 농도로 고정해 놓고 실험하였다. 실험 결과 전자 공여능(EDA %: Electron Donating Ability)으로 표시된 DPPH radical 소거능은 농도가 증가할수록 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 추출용매별로 보면 EtOH > 70% EtOH > Water 순이었고, 발효여부에 따라서는 EM 발효 > 유산균 발효 > 비발효 순으로 나타났다. 이 실험 결과는 천마 추출물을 효모로

발효시킨 1, 2, 4, 8 mg/mL의 농도 범위에서 각각 17.89, 32.62, 57.53, 84.48%라고 보고한 Park 등의 실험 결과[9]와 유사한 경향을 나타내어, 천마 추출물을 발효시킬 경우 균주가 다르지만 DPPH 라디칼 소거작용은 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

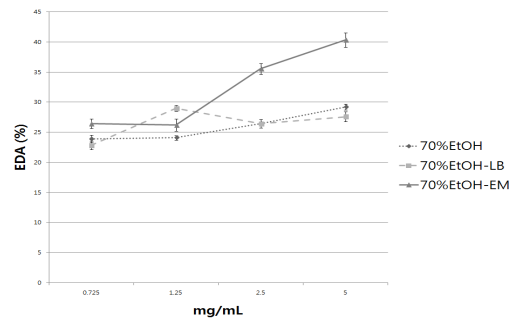


Fig. 1. DPPH radical scavenging ability of *Gastrodia elata* Blume with non-fermentation (70% EtOH), lactic acid fermentation (70% EtOH-LB) and EM fermentation (70% EtOH-EM) to 70% EtOH extracts. Note; EDA % = Electron Donating Ability.

70% EtOH 추출물의 경우 Fig. 1에서 보는 바와 같이 발효를 시키지 않았을 때는 0.725 mg/mL에서 $23.92 \pm 0.6\%$, 5 mg/mL에서는 $29.21 \pm 0.5\%$ 로, 젖산균으로 발효시켰을 때는 0.725 mg/mL에서 $22.83 \pm 0.7\%$, 5 mg/mL에서는 $27.59 \pm 0.8\%$ 로 약간씩 증가하였으나 EM으로 발효시켰을 때는 0.725 mg/mL에서 $26.44 \pm 0.8\%$, 5 mg/mL에서는 $40.37 \pm 1.2\%$ 로 크게 증가하여 70% EtOH 추출물을 EM으로 발효시킬 경우 DPPH radical scavenging 효과가 좋아짐을 알 수 있었다.

Table 1. Contents of Flavonoid and Polyphenol in *Gastrodia elata* Blume extract

Solvents	Flavonoid (mg/g)	Total Polyphenol (mg/g)
Water	6.83 ± 2.14	18.43 ± 4.67
EtOH	23.33 ± 3.25	105.37 ± 15.93
70% EtOH	33.94 ± 2.45	100.91 ± 21.54

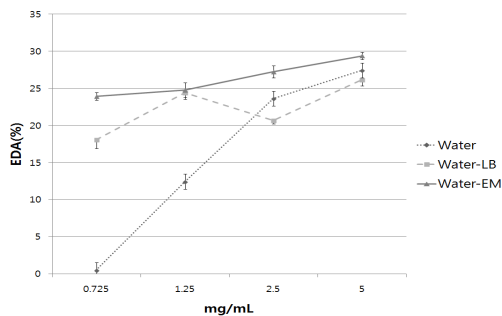


Fig. 2. DPPH radical scavenging ability of *Gastrodia elata* Blume with non-fermentation (water), lactic acid fermentation (water-LB) and EM fermentation (water-EM) to water extracts. Note; EDA % = Electron Donating Ability.

물 추출물의 경우 Fig. 2에서 보는 바와 같이, 발효를 시키지 않았을 때는 0.725 mg/mL에서 $0.49 \pm 0.08\%$, 5 mg/mL에서는 $27.41 \pm 0.4\%$ 로 증가하였으며, 유산균으로 발효시켰을 때는 0.725 mg/mL에서 $18.08 \pm 1.2\%$, 5 mg/mL에서는 $26.14 \pm 0.8\%$ 로 증가하였고, EM으로 발효시켰을 때는 0.725 mg/mL에서 $23.91 \pm 0.5\%$, 5 mg/mL에서는 $29.38 \pm 0.5\%$ 로 증가하여 전반적으로 실험범위 내에서 농도 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다.

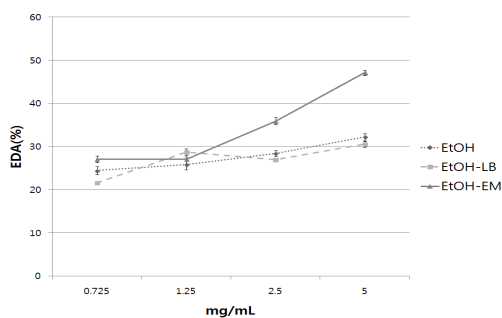


Fig. 3. DPPH radical scavenging ability of *Gastrodia elata* Blume with non-fermentation (EtOH), lactic acid fermentation (EtOH-LB) and EM fermentation (EtOH-EM) to EtOH extracts. (EDA %: Electron Donating Ability).

EtOH 추출물의 경우 Fig. 3에서 보는 바와 같이, 발효를 시키지 않았을 때는 0.725 mg/mL에서 $24.42 \pm 0.9\%$, 5 mg/mL에서는 $32.20 \pm 0.8\%$ 로 증가하였으며, 유산균으로 발효시켰을 때는 0.725 mg/mL에서 $21.60 \pm 0.3\%$, 5 mg/mL에서는 $30.53 \pm 0.7\%$ 로 증가하였고, EM으로 발효시켰을 때는 0.725 mg/mL에서 $27.06 \pm 0.8\%$, 5 mg/mL에서는 $47.09 \pm 0.6\%$ 로 크게 증가하여 EtOH 추출물을 EM으로 발효시킬 경우 DPPH radical 소거에 매우 효과적임을 알 수 있었다.

이 연구 결과는 감태와 조릿대 잎차의 항산화 활성 측정에서 EtOH 추출물이 물 추출물 보다 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량이 높고 그에 따라 DPPH 라디칼 소거능 활성 측정에서 항산화 효능이 높은 것으로 보고한 Heo의 연구결과와 유사하였다[22].

3.3. Tyrosinase inhibitory activity

천마를 용매로 추출하기 전과 후 및 추출된 물질을 발효시키기 전과 발효 시킨 후의 tyrosinase 저해 활성을 비교 실험하였다. 이때 추출물의 농도는 농도별 경향을 파악하기 위해 0.725, 1.25, 2.5, 5 mg/mL의 농도로 고정해 놓고 실험하였다. 실험 결과 tyrosinase 저해 활성은 농도가 증가할수록 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 추출용매별로는 EtOH > Water > 70% EtOH, 발효 방법에 따라서는 젖산균 발효 > 비발효 > EM 발효 순으로 나타났다. 이 결과는 천마를 butanol로 추출한 분획물이 tyrosinase 저해 활성이 우수하다고 보고한 Kim의 연구 결과[6]와 유사하여 추출방법에 따라 미백효과가 높은 물질을 획득할 수 있다는 점을 시사한다하겠다.

70% EtOH 추출물의 tyrosinase 저해 활성은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 발효를 시키지 않았을 때는 0.725 mg/mL에서 $25.7 \pm 1.5\%$, 5 mg/mL에서는 $30 \pm 1.3\%$ 로 약간 증가하였으나, 젖산균으로 발효시켰을 때는 0.725 mg/mL에서 $27.8 \pm 0.8\%$, 5 mg/mL에서는 $47.8 \pm 1.5\%$ 로 크게 증가하였다. EM으로 발효 시켰을 때에는 0.725 mg/mL에서 $22.1 \pm 1.1\%$, 5 mg/mL에서는 $31.4 \pm 1.2\%$ 로 증가하여 70% EtOH 추출물을 젖산으로 발효시킬 경우 tyrosinase 저해 활성에 매우 효과적임을 알 수 있었다.

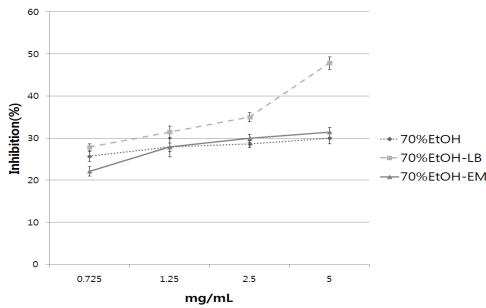


Fig. 4. Tyrosinase inhibitory activity of *Gastrodia elata* Blume with non-fermentation (70% EtOH), lactic acid fermentation (70% EtOH-LB) and EM fermentation (70% EtOH-EM) to 70% EtOH extracts.

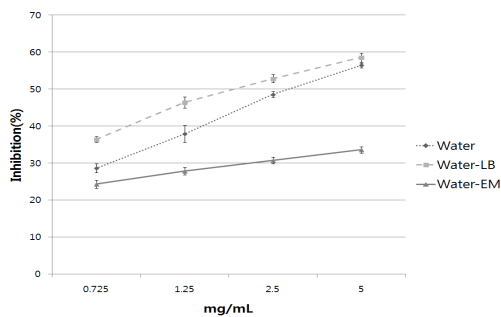


Fig. 5. Tyrosinase inhibitory activity of *Gastrodia elata* Blume with non-fermentation (water), lactic acid fermentation (water-LB) and EM fermentation (water-EM) to water extracts.

물 추출물의 tyrosinase 저해 활성은 Fig. 5에서 보는 바와 같이 발효를 시키지 않았을 때는 0.725 mg/mL에서 27.6 ± 1.2%, 5mg/mL에서는 56.4 ± 0.7%로, 젖산균으로 발효하였을 때는 0.725 mg/mL에서 36.4 ± 0.8%, 5 mg/mL에서는 58.6 ± 1.2%로 크게 증가하였다. EM으로 발효시켰을 때는 0.725 mg/mL에서 24.3 ± 1.1%, 5 mg/mL에서는 33.6 ± 0.8%로 증가하여 물 추출물을 젖산균으로 발효 시킬 경우 tyrosinase 저해 활성이 매우 우수함을 알 수 있었다.

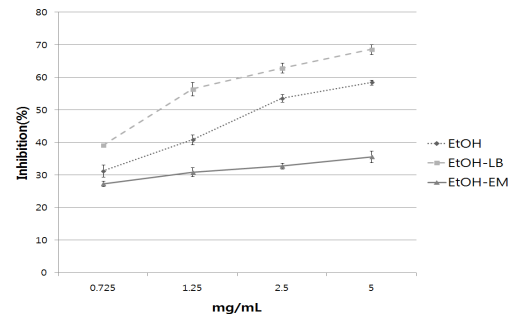


Fig. 6. Tyrosinase inhibitory activity of *Gastrodia elata* Blume with non-fermentation (EtOH), lactic acid fermentation (EtOH-LB) and EM fermentation (EtOH-EM) to EtOH extracts.

EtOH 추출물의 tyrosinase 저해 활성은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 발효를 시키지 않았을 때는 0.725 mg/mL에서 31.2 ± 1.8%, 5 mg/mL에서는 58.4 ± 0.8%로 크게 증가하였고, 젖산균으로 발효하였을 때는 0.725 mg/mL에서 39.1 ± 0.4%, 5 mg/mL에서는 68.6 ± 1.5%로 매우 크게 증가하였다. EM으로 발효 시켰을 때에는 0.725 mg/mL 27.3 ± 0.8%, 5 mg/mL에서는 35.6 ± 1.8%로 증가하여 전반적으로 실험 농도 범위 내에서 농도 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다.

3.4. MTT assay

RAW 264.7 Cells에서의 세포 생존율은 물 추출물, EtOH 추출물 및 70% EtOH 추출물과 이들을 발효 시킨 물질을 정상세포와 비교하여 보았을 때 Fig 7에서 볼 수 있는 바와 같이 모두 85%이상의 세포 생존율이 보였다. 이로써 추출물을 발효시킨 물질이 화장품 및 기능성 식품 소재로서 활용이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

3.5. Reactive Oxygen Species

ROS 생성 및 소거능을 확인하기 위하여 RAW 264.7 Cells에서 세포 생존율에 따른 물 추출물과 70% EtOH 추출물에서 배양된 대식세포에서 ROS 생성 정도를 측정하였다. ROS 소거능으로 천마의 추출물을 확인하기 위하여 음성 대조군으로는 RAW 264.7 Cells 배양하였으며,

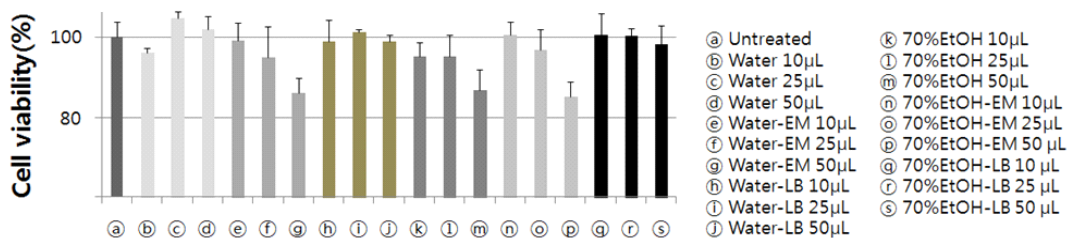


Fig. 7. Cell viability of *Gastrodia elata* Blume extract on RAW 264.7 Cell

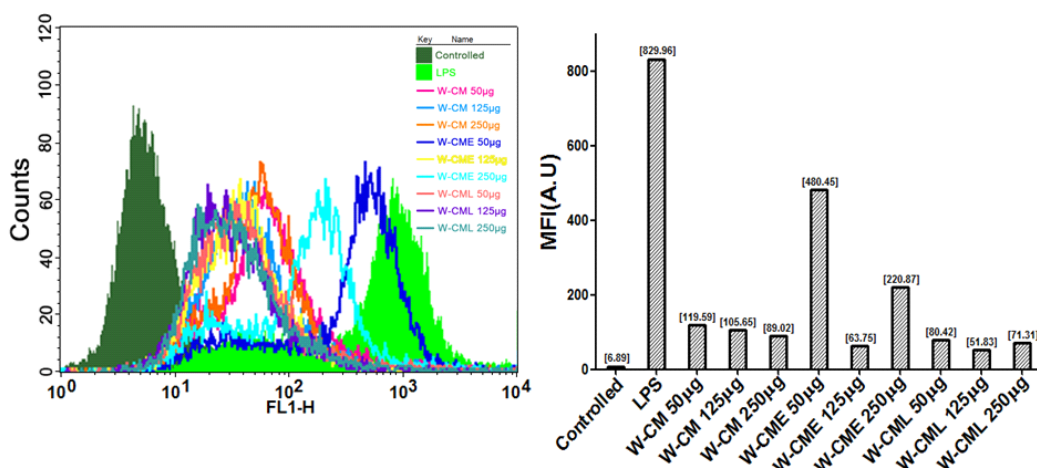


Fig. 8. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Gastrodia elata* Blume water-extract and water-extract showing reduced ROS generation in LPS-stimulated macrophages after treatment with *Gastrodia elata* Blume extract.

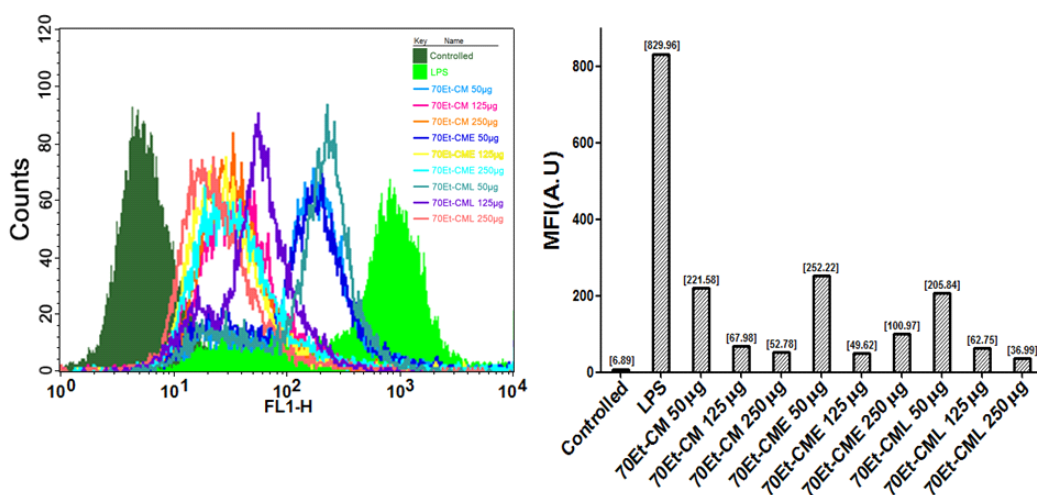


Fig 9. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Gastrodia elata* Blume 70% EtOH-extract showing reduced ROS generation in LPS-stimulated macrophages after treatment with *Gastrodia elata* Blume extract.

양성 대조군으로는 RAW 264.7 Cells 세포와 염증 유발 물질인 Lipopolysaccharide (LPS)를 사용하였을 때 음성 대조군으로 대식세포만 배양한 군에서는 가장 약한 DCH 형광세기로 최대한의 ROS 생성을 보여주었다. 양성 대조군으로 대식세포가 LPS로 자극되어 활성화된 세포에 비발효와 발효에 따른 추출물을 농도별 50 μ L, 125 μ L, 250 μ L로 처리하였을 때 형광의 세기가 양성 대조군과 비교하였을 때 EM 발효 > 비발효 > 젖산균발효 순으로 효과가 있는 것으로 나타났다. 특히 EM 발효물에서 ROS 소거 효과가 가장 높은 것으로 알 수 있었다. 이는 망고를 EM으로 발효시킨 물질에 대한 연구 결과와 유사하였다 [23].

4. 결론

천마를 물, EtOH (Ethanol) 및 70% EtOH로 추출하고, 추출된 물질을 젖산균과 EM (Effective Microorganisms)으로 발효 시킨 후 발효 방법에 따른 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다. 항산화 효과가 우수한 물질로 알려진 플라보노이드와 폴리페놀의 함량은 EtOH 추출물 > 70% EtOH 추출물 > Water 추출물 순으로 함량이 높게 나타났다. DPPH radical 소거능은 EtOH 추출물을 EM으로 발효시켰을 때 활성이 가장 높게 나타났으며, 이어서 젖산을 발효시킨 후 얻어진 물질로 나타나 천마를 발효를 시킬 경우 더욱 효과적으로 DPPH radical을 소거할 수 있음을 확인하였다. 미백 효과를 측정하기 위한 tyrosinase 활성 저해 실험에서는 EtOH 추출물을 젖산균으로 발효시켰을 때 가장 저해 효과가 우수하였고, RAW 264.7 cells을 이용한 세포 생존율 실험 결과 물, EtOH, 70% EtOH 추출물과 이들의 발효 물질 모두 85%이상의 세포 생존율을 나타내 천마 추출물을 발효 시킬 경우 세포의 염증에 대한 안정성이 더욱 증가함을 확인하였다. ROS 생성으로 인한 항산화 실험에서는 양성 대조군으로 RAW 264.7 cells을 LPS로 자극시켜 활성화된 세포에 비발효와 발효에 따른 추출물을 농도별로 처리하였을 때, EM으로 발효시켰을 경우가 항산화성이 가장 높게 나타났다. 이상과 같이 천마 추출 및 발효 물질에 대한 플라보노이드와 폴리페놀 함량, DPPH radical 소거능, tyrosinase 활성 저해력, 세포 생존율, ROS 생성

등을 측정한 결과 천마 추출물을 발효시켰을 경우 화장품용 소재로 활용할 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 중소기업청에서 지원하는 2014년도 산학연협력 기술개발사업(No. C0191859)의 연구 수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

1. E. J. Seo, E. S. Hong, M. H. Choi, K. S. Kim, and S. J. Lee, The antioxidant and skin whitening effect of *artemisia iwayomogi* extracts, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**(1), 89-93(2012).
2. M. S. Hasnah, F. R. Mohd, and U. Zanariah, Isolation and identification of radical scavenging and tyrosinase inhibition of polyphenols from *Tibouchina semidecandra L.*, *J. Agric. Food. Chem.*, **58**(19), 10404-10409(2010).
3. E. J. Park and H. T. Kim, Change of major functional components of *Gastrodia elata* Blume with cultivation conditions and harvest times, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **21**(4), 282-288(2013).
4. M. H. Kim, Screening of biological activities of ethanol extracts from fermented *gastrodia elata* blume, *Korean J. Food & Nutr.*, **27**(5), 837-844(2014).
5. X. H. Duan, Z. L. Li, D. S. Yang, F. L. Zhang, Q. Lin, and R. Dai, Study on the chemical constituents of *Gastrodia elata*, *Zhong Yao Cai.*, **36**(10), 1608-11(2013).
6. K. T. Kim, J. G. Kim, S. H. Park, J. H. Lee, S. H. Lee, K. H. Kim, and S. N. Park, Anti-melanogenesis effect of phenolic compounds isolated from *Gastrodia elata*, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **30**(1), 33-88(2004).
7. Pharmacology of traditional oriental medicine, Textbook compilation

- committee, Shinil books, 2010.
8. M. J. Kim, J. Y. Kim, S. W. Choi, J. T. Hong, and K. S. Yoon, Anti-wrinkle effect of safflower (*Cathamus tinctorius*) seed extract, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **30**(1), 15-22(2004).
 9. J. Liu and A. Mori, Antioxidant and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata* Blume, *Neuropharmacol*, **31**(12), 1287-1298(1992).
 10. M. R. Park, C. Yoo, Y. N. Chang, and B. Y. Ahn, Change of total polyphenol content of fermented *Gastrodia elata* Blume and radical scavenging, *Korean J. Plant Res.*, **25**(4), 379-386(2012).
 11. D. H. Kang, J. W. Kim, and K. S. Youn, Antioxidant activities of extracts from fermented mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit, and inhibitory actions on elastase and tyrosinase, *Korean J. Food Preserv.*, **18**(2), 236-243(2011).
 12. J. M. Jeon, S. K. Choi, Y. J. Kim, S. J. Jang, J. W. Cheon, and H. S. Lee, Antioxidant and antiaging effect of ginseng berry extract fermented by lactic acid bacteria, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **37**(1), 75-81(2011)
 13. J. Zhishen, T. Mengcheng, and W. Jianming, The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry*, **64**(4), 555-559(1999).
 14. O. Folin and W. Denis, A colorimetric method for determination of phenols (phenol derivatives) in urine, *J. Biol. Chem.*, **22**, 305-308(1915).
 15. S. Y. Choi, H. S. Cho, and N. J. Sung, The antioxidative and nitrite scavenging ability of solvent extracts from wild grape (*Vitis coignetia*) skin, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **35**(8), 961-966(2006).
 16. J. H. Choi and S. K. Oh, Studies on the anti-aging action of korean ginseng, *J. Food Sci. Technol.*, **17**, 506-515(1985).
 17. J. Y. Ko and Y. C. Kim, Effectiveness of *scirpi rhizoma* ethanol extract on skin whitening using in vitro test, *J. Environ. Toxicol.*, **25**(1), 69-77(2010).
 18. R. Tsao, Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols, *Nutrients*, **2**(12), 1231-1246(2010).
 19. P. G. Pietta, Flavonoids as antioxidants, *J. Nat. Prod.*, **63**(7), 1035-1042(2000).
 20. Y. O. Park and H. S. Lim, Antioxidant activities of bamboo (*Sasa Borealis*) leaf extract according to extraction solvent, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **38**(12), 1640-1648(2009).
 21. J. P. Chang, E. S. Doh, K. J. Kil, J. K. Yang, C. W. Yun, G. H. Lee, Y. H. Jung, Y. S. Ji, B. R. Kim, and M. S. Choi, Antioxidative activity of *A. victoralis* var. *platyphyllum* Extracts, *Jour. Korean For. Soc.*, **100**(3), 408-416(2011).
 22. S. J. Heo, E. J. Park, K. W. Lee, and Y. J. Jeon, Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds, *Bioresour Technol.*, **96**(14), 1613-1623(2005).
 23. A. N. Park, Ph. D. Dissertation, Anti-oxidative activities of unfermented and microbial fermented mango leaf extracts, Chonbuk National Univ., Chonbuk, Korea (2014).