홍국발효 생강 분획물의 *In Vitro* 항산화와 항당뇨 활성

윤수민 · 표영희

성신여자대학교 식품영양학과

The *In Vitro* Antioxidant and Antidiabetic Activity of Various Fractions from *Monascus*-Fermented Ginger Extract

Su-Min Yoon and Young-Hee Pyo

Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University

ABSTRACT This study investigated the potential antioxidant and antidiabetic activity of *Monascus*-fermented ginger extract (MGE). Gingers was fermented with *Monascus pilosus* KCCM 60084 for 2 weeks at 30°C and extracted with 95% ethanol. The antioxidant activity of the ethyl acetate fraction of the MGE was measured through DPPH, ABTS, and FRAP. The antioxidant activity of MGE increased 2.36 to 3.76-fold compared with those of raw ginger extracts (CGE) ($P<0.05$). The ethyl acetate fraction of MGE had a higher potential to inhibit the key digestive enzymes linked to type 2 diabetes (α -amylase, α -glucosidase) as compared to CGE ($P<0.05$). The IC_{50} for the α -amylase inhibitory activity (3.40 ± 0.88 mg/mL) of MGE showed a higher potency than acarbose (7.01 ± 0.23 mg/mL), which is currently used as a diabetes treatment. Moreover, the ethyl acetate fraction of MGE increased the expression of glucose transporter type 4 (GLUT4), glucokinase (GCK), and AMP-activated protein kinase (AMPK) in HepG2 cells. These findings demonstrate that the ethyl acetate fraction of MGE significantly improved glucose uptake in HepG2 cells by activating both PI3K/Akt and AMPK phosphorylation pathways. Our results suggest that MGE show the potential to be developed as a antidiabetic nutraceuticals.

Key words: *Monascus*-fermentation, ginger, antioxidants, antidiabetes, HepG2 cells

서 론

당뇨병은 비정상적으로 높은 혈당치가 주요 증상인 대사성 질환으로, 국제 당뇨병 연맹의 2019년 통계에 따르면 제2형의 성인 당뇨병 환자의 수는 전 세계적으로 4억 6천 300만 명으로 질환자의 수가 급증하고 있다(Rhee, 2020). 현재 제2형 당뇨병의 치료제로 α -amylase와 α -glucosidase의 저해물질인 acarbose와 miglitol 등이 이용되지만, 설사와 복부팽만 등의 위장 관련 부작용이 보고되어 약물의 사용이 제한된다(Dileep 등, 2018). 따라서 천연물 소재를 대상으로 당뇨병의 예방과 치료에 효과적인 활성 물질들을 탐색하는 연구가 그동안 활발하게 시도되어 왔다(Wang 등, 2010; Nickavar와 Yousefian, 2009).

항당뇨 기전의 대부분은 포도당 흡수 경로와 포도당 수송체인 GLUT4의 증가를 통한 인슐린 저항성 감소에 영향을

미치는 세포 내 신호전달 경로가 주로 보고되어 왔다. 즉, 인슐린 수용체 기질에 의해 PI3K와 Akt가 차례로 인산화되어 GLUT4의 세포막 이동 후 포도당의 흡수가 촉진되는 인슐린 의존성 경로(Mokashi 등, 2017)와, GLUT4의 증가에 직접 관여하는 AMPK의 인슐린 비의존성 경로가 알려졌다(Li 등, 2013).

생강(*Zingiber officinale* Roscoe)은 생강과에 속하는 다년생 식물로, 6-gingerol, 6-shogaol, zingiberene, zingerol 등의 다양한 생리활성 성분을 함유하여 고대부터 감기, 발열, 소화불량, 관절염, 고혈압, 경련 등의 다양한 질환을 완화하는 데 사용되어 왔다(Baliga 등, 2011). 생강의 주요 매운맛 성분인 6-gingerol은 고온처리나 건조에 의하여 6-shogaol로 변형되며, 페놀 화합물인 6-gingerol과 6-shogaol 성분은 구조 특성상 과산화물과 xanthine oxidase에 대해 우수한 저해 활성을 나타내어 대표적인 항산화 물질

Received 17 November 2021; Revised 17 December 2021; Accepted 20 December 2021

Corresponding author: Young-Hee Pyo, Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University, 76-Gagil, Dobong-ro, Kangbuk-Gu, Seoul 01133, Korea, E-mail: rosapyo@sungshin.ac.kr

Author information: Su-Min Yoon (Researcher), Young-Hee Pyo (Professor)

© 2022 The Korean Society of Food Science and Nutrition.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

로 보고되었다(Dugasani 등, 2010). 그 밖에도 항당뇨(Chakraborty 등, 2012), 항암 및 항균(Saha 등, 2013) 등에 대한 생강의 생리활성 연구는 광범위하게 이루어져 왔다.

본 실험에 사용된 *Monascus*속의 식용 곰팡이, 홍국은 배양발효 중 mevinolin(천연 스타틴)을 생산하여 콜레스테롤 생합성을 저해하는 기능성 소재로 널리 연구되어 왔으나(Pyo와 Seong, 2009; Pyo와 Seong, 2013), 신경 말단과 체장 세포를 자극하여 인슐린 분비를 증가시키는 것으로도 알려져 왔다(Hu 등, 2020). 즉 Su 등(2007)은 streptozotocin 약물로 유도된 당뇨 쥐에게 홍국 쌀을 경구투여했을 때 인슐린 감수성이 개선되었다고 하였으며, 공복혈당 감소와 인슐린의 수치를 증가시켜 포도당과 지질 관련 장애의 완화 가능성을 보고하였다. 이 외에도 홍국균을 곡류나 두류(Pyo와 Seo, 2010) 및 채소(Park 등, 2012) 등에 접종하여 홍국 발효물의 품질 특성과 생리활성에 관한 다양한 연구가 이루어져 왔으나, 홍국 발효물의 최적 추출조건에 따른 분획별 생리활성의 평가는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 생강을 홍국균의 고상 기질로 사용하여 2주간 발효한 다음, 발효 전 시료와 함께 95% 에탄올로 추출하였다. 홍국 발효 전후의 추출물을 다시 극성에 따른 다양한 용매로 추출한 후에 각 분획물의 항산화와 항당뇨 활성을 발효 전과 후로 평가하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구의 주요 재료인 생강은 충남 서산에서 생산된 생강을 사용하였다. 홍국균(*Monascus pilosus* KCCM 60084)은 한국미생물보존센터(KCCM, Seoul, Korea)에서 분양받아 PDA(potato dextrose agar, Difco, Detroit, MI, USA) 배지에 접종하여 활성화 후 홍국균 종 배양액(ginger powder, rice powder, peptone, glycine, glucose, maltose, yeast extract) 제조에 사용하였다. 본 연구에 사용된 분석 및 표준시약은 모두 Sigma(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

홍국발효 생강 제조

생강은 불순물을 제거하기 위해 수세한 후 껍질을 제거하여 0.5 cm 편으로 썰어 사용하였다. 일정 두께의 생강을 식품건조기(LD-918B, L'EQUIP, Seoul, Korea)에서 건조한(60°C, 2시간) 후 121°C에서 15분 동안 고압 멸균하였다. 건조된 생강편에 홍국 종 배양액을 10%(v/w) 농도로 접종한 다음 30°C의 배양기에서 2주간 발효하여 *Monascus ginger*(MG)의 시료로 사용하였다. 이때 대조군의 시료인 control ginger(CG)는 멸균한 후 홍국균을 접종하지 않고 2주간 실험군과 동일한 조건에서 처리하였다. 모든 시료는 동결 건조한 후 분말화하여 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

생강 추출물 및 분획물 제조

발효된 생강 분말 10 g에 95% 에탄올 200 mL를 첨가하여 55°C에서 2시간씩 초음파추출기를 사용하여 3회 추출하고 감압 여과(Whatman No. 2, Cytiva, Maidstone, UK)하여 에탄올 추출물을 얻었다. 이 추출물을 회전식 감압농축기(CCA-1110, Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 추출용매를 제거한 다음 증류수를 1:10(w/v) 비율로 가하여 용해하고, 분획용매인 n-헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 증류수를 각각 순차적으로 1:1(v/v) 비율로 가하여 초음파추출기로 3회 반복하여 분획 추출하였다(Fig. 1). 용매별 분획물은 감압 농축하여 동결 건조한 후 실험에 따라 증류수, 메탄올, dimethyl sulfoxide(DMSO) 등에 녹여 사용하였다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Singleton과 Rossie(1965)의 방법을 변형하여 측정하였다. 메탄올로 희석한 시료를 50 µL 취하여 2% Na₂CO₃ 용액 1 mL에 반응시키고 50%의 Folin-Ciocalteu 시약 50 µL를 혼합하여 암소에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader(Spectra Max[®] M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 총 폴리페놀의 함량은 gallic acid의 당량값(g gallic acid equivalent/kg, g GAE/kg)으로 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(1999)의 방법에 따라 1 mL의 시료에 NaNO₂ 20 µL를 혼합하여 5분간 반응 후, 10% AlCl₃ 20 µL와 1 N NaOH 150 µL를 혼합하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 중 총 플라보노이드 함량은 quercetin의 당량값(g quercetin equivalent/kg, g QE/kg)으로 나타내었다.

항산화 활성

항산화 활성의 평가를 위하여 ABTS 라디칼과 DPPH 라디칼 소거 활성 실험을 진행하였다. ABTS 라디칼 용액의 제조는 7 mM의 ABTS와 2.45 mM의 과황산칼륨을 혼합한 후 24시간 동안 실온의 암소에서 반응시킨 다음, 734 nm에서 흡광도가 0.70±0.04가 되도록 희석하여 준비하였다. 각 시료의 추출물 100 µL에 ABTS 용액을 900 µL 혼합하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 각 시료 100 µL에 0.2 µM DPPH 용액 900 µL를 첨가하여 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(Brand-Williams 등, 1995). ABTS와 DPPH 라디칼 소거 활성은 다음의 식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{라디칼 소거 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구 흡광도}}{\text{시료 무첨가구 흡광도}}\right) \times 100$$

또한 Benzie와 Strain(1996)의 방법에 따라 각 시료 추출물의 ferric tripyridyltriazine(Fe^{III}-TPTZ) sodium acetate trihydrate를 환원시키는 능력을 평가하였다. FRAP 용액 950 µL와 시료 50 µL를 혼합하여 37°C 항온기에서 15분

Fig. 1. Procedure of extract and fraction layers of *Monascus*-fermented ginger.

간 반응시킨 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각 시료의 환원력은 mM Trolox 당량값(mM TE/g)으로 나타내었다.

α -Amylase와 α -glucosidase 저해 활성

Hansawasdi 등(2000)의 방법을 적절하게 수정하여 α -amylase 저해 활성을 측정하였다. 시료 50 μ L에 α -amylase(1.0 U/mL) 효소 용액과 0.2 mM potassium phosphate 완충액(pH 6.8)을 각각 50 μ L씩 첨가하여 37°C에서 10분간 예비 반응시킨 후, 1% 전분 용액 250 μ L를 첨가하여 20분간 반응시켰다. 반응액에 DNS 시약을 0.25 mL 넣어 95°C에서 5분간 가열하고 냉각한 후 증류수 250 μ L에 희석하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, α -glucosidase 저해 활성은 Tibbot과 Skadsen(1996)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 시료 200 μ L에 0.5 U/mL α -glucosidase 효소액 100 μ L를 혼합하여 37°C에서 10분 동안 예비 반응시킨 후, 100 μ L의 5 mM *p*-NPG를 첨가하여 본 반응을 진행하였다. 반응액에 0.1 M Na_2CO_3 750 μ L를 첨가하여 반응을 중단시킨 후 405 nm에서 *p*-nitrophenol의 양을 흡광도로 측정하였으며, 대조구는 0.1 M potassium phosphate 완충액(pH 6.8)을 사용하였다. 모든 효소의 저해 활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내어 IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) 값으로 산출하였다.

$$\text{효소 저해 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구 흡광도}}{\text{시료 무첨가구 흡광도}}\right) \times 100$$

세포배양

인간의 간암 세포주인 HepG2는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 10% fetal bovine serum(Welgene, Daegu, Korea)과 1% penicillin-streptomycin(Welgene)이 첨가된 25 mM HEPES, 25 mM NaHCO_3 , 90% minimum essential medium(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 배지에서 37°C, 5% CO_2 조건으로 배양하였다.

MTT assay

HepG2 세포를 24 well plate에 5.0×10^4 cells/well 농도로 분주하여 24시간 배양시켰다. 배지로 희석한 생강 추출물(0.1, 1, 10, 100 μ g/mL)을 처리하여 배양한(24 h, 48 h) 후, 배지를 제거한 다음 0.5 mg/mL의 MTT 용액을 첨가하여 1시간 동안 37°C에서 재배양하였다. 배양이 완료된 각 well에 MTT 용액을 제거하고 포마잔 결정을 DMSO에 녹여 96-well plate에 옮긴 후 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot analysis

24시간 1.0×10^6 cells/well로 배양된 HepG2 세포에 시료를 처리하여 24시간 동안 더 배양하였다. Protease in-

hibitor cocktail(GenDEPOT, Barker, TX, USA)과 phosphatase inhibitor cocktail(GenDEPOT)이 첨가된 lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100)를 이용하여 단백질을 추출하였으며, Bradford assay를 사용하여 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질과 β -mercaptoethanol을 포함한 샘플 완충액을 혼합한 후 100°C에서 5분간 가열하였다. 단백질 샘플은 Bio-Rad mini-gel system을 이용하여 SDS-PAGE 후 polyvinylidene fluoride membrane(0.2 μ m, Immun-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 단백질을 전이하였다. 멤브레인은 tris-buffered saline(TBS)에 90분 동안 blocking 후 1차 항체가 첨가된 완충액에서 1일간 방치한 후(4°C) TBST(TBS containing 0.1% Tween 20)로 15분간 3회 세척하였다. 세척한 멤브레인에 horse radish peroxidase 결합 2차 항체(GeneTex, Irvine, CA, USA)를 희석한 완충액을 넣고 상온에서 1시간 동안 반응한 후 세척하였으며, 단백질 밴드는 Western PICO ECL kit을 사용하여 목적 단백질을 검출하였다. 그 밴드 강도는 image J(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다. 사용된 1차 항체 GSK, GLUT4는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, p-Akt와 Akt는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)의 제품을 사용하였다. p-AMPK와 AMPK는 Assay Biotechnology사(Fremont, CA, USA)로부터 구입하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 실시하였으며, 얻어진 결과는 평균값과 표준편차(mean $\pm$ SD)로 나타내었다. SPSS(ver. 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 각 군의 평균값의 유의성을 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

폴리페놀 물질은 한 분자 내에 2개 이상의 하이드록시기(-OH)를 가진 방향족 화합물을 총칭한다. 이는 산화-환원 반응에 기질로 작용하며 플라보노이드는 식물계의 주된 폴리페놀 물질이며, 생강 중에는 gingerol과 shogaol을 비롯하여 pyrogallol, *p*-hydroxybenzoic acid, ferulic acid, vanillin 등의 페놀 화합물이 포함되어 있다(Tohma 등, 2017). 홍국발효 생강 추출물(MGE)과 대조군인 생강 추출물(CGE) 간의 극성도에 따른 용매별 분획물의 총 페놀 함량을 평가한 결과는 Fig. 2와 같다. 헥산 분획 MGE에서의 총 페놀 함량은 237.65 ± 12.46 g GAE/kg으로 가장 높았으며 CGE(206.38 ± 10.97 g GAE/kg)와 유의적인 차이를 보였다($P < 0.05$). 이 같은 결과는 Lee 등(2011a)이 보고한 생강 헥산 분획물의 총 폴리페놀 함량인 228.87 ± 34.19 g GAE/kg과 유사한 농도로 비교된다. 에틸아세테이트 분획물의 MGE(230.81 ± 6.25 g GAE/kg) 역시 헥산 분획물의 MGE에 함유된 총 페놀 함량과 비슷하게 나타났으며, CGE(82.53 ± 1.92 g GAE/g)에 비해 약 2.8배 높은 것으로 나타났다($P < 0.05$). 그러나 부탄올과 물 분획물에 함유된 총 폴리페놀 함량은 MGE와 CGE 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

MGE의 총 플라보노이드 함량은 헥산과 에틸아세테이트 분획물에서 각각 26.23 ± 0.88 과 20.42 ± 1.23 g QE/kg으로 나타나 CGE에 비해 모두 증가하였다. 즉 헥산 분획물의 플라보노이드의 함량은 홍국 발효에 의해 약 1.59배 증가하였으며, 에틸아세테이트층은 약 1.39배 증가하였다. 또한 물 분획물에서도 MGE의 플라보노이드 함량은 CGE보다 약간 높았으나, 부탄올 층과 함께 유의적인 차이가 존재하지 않았다(MGE 9.51, CGE 8.79 g QE/kg)(Fig. 2). 이 같은 결과는 Kayath 등(2020)이 보고한 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Bacillus* sp.로 발효한 생강즙의 폴리페놀과 플라보노이드

Fig. 2. The total polyphenol (A) and flavonoid (B) contents of various solvent fractions from 95% ethanol extract of *Monascus*-fermented gingers. A: expressed as mg gallic acid equivalents/g of fermented ginger extract, B: expressed as mg quercetin equivalents/g of fermented ginger extract. Means with the different letters (a-e) on the bars are significantly different at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

함량은 발효하지 않은 시료에 비해 유의적으로 증가하였다는 결과와 일치한다. 이는 미생물 발효 중에 분비된 효소에 의해 기질의 식물 세포벽이 파괴되어 세포 내부에 존재하는 활성물질이 방출하였기 때문으로 설명된다. 뿐만 아니라 Kuo 등(2009)도 생강을 함유하는 액체 배지에 *Monascus* sp.를 접종하면 발효 시간이 경과함에 따라 페놀 화합물의 농도가 증가하였으며, 이 같은 결과는 발효 중 효소의 작용과 *Monascus* sp.에 기인한 것으로 보고하였다. 생강 중에는 진저롤과 쇼가올 등의 다양한 페놀 화합물이 존재하며 이들 물질은 산화-환원 반응에 직접 개입하여 작용할 수 있다. 예를 들어, Kazeem 등(2013)은 STZ 유발 당뇨 쥐에게 생강의 폴리페놀 추출물을 경구투여했을 때, 항산화 효소 활성이 증가하며 식후혈당과 공복혈당을 농도 의존적으로 개선하였다고 보고하였다. 또한 건조된 생강 뿌리 추출물에서 분리된 페놀 화합물은 염증성 질환을 유발하는 sICAM-1/THP-1 세포와 sVCAM-1/THP-1 세포 간의 결합을 강력하게 억제하여 항염증제로의 사용 가능성도 보고되었다(Lee 등, 2011b).

항산화 활성

생강 발효물의 용매 분획별 항산화 활성의 결과는 Table 1과 같다. ABTS 라디칼 소거능의 결과는 MGE 에틸아세테이트 분획물의 라디칼 소거능이 88.48%로 가장 높게 나타났으며, 동일한 분획물의 CGE(78.89%)에 비해 Trolox 등량값이 2.5배 높은 것으로 비교되었다. 헥산 분획물 또한 비교적 높은 라디칼 소거능(MGE 88.04%, CGE 85.4%)이 나타났으나, 부탄올과 물 분획물의 항산화 활성은 Table 1에서와 같이 유기 용매층에 비해 낮은 활성으로 평가할 수 있다. 이 같은 결과는 DPPH 라디칼 소거능에서도 유사한 경향으로 나타나, MGE의 헥산과 에틸아세테이트 분획물이 각각 81.9%와 71.9%로 가장 높은 활성을 나타내었다. 특히 에틸아세테이트 분획물의 MGE는 CGE에 비해 라디칼 소거능이 약 2.36배 증가하였으며, 부탄올 분획물에서도 MGE(14.5%)와 CGE(12.7%) 간에 유의적인 차이가 나타났다($P < 0.05$). 따라서 생강에 대한 홍국균의 고상발효(solid substrate fermentation)는 기질의 유효 활성 성분의 농도를 강화하는 것으로 판단된다. 한편 Fe^{3+} 을 Fe^{2+} 로 환원시키는

능력으로 시료의 항산화 활성을 평가하는 FRAP 시험의 결과 역시, 헥산과 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 환원력을 나타내었다. 즉 헥산 분획물의 MGE의 환원력은 1.61 ± 0.03 mM TE/g으로 가장 높았으며, 에틸아세테이트 분획물은 1.58 ± 0.04 mM TE/g으로 나타나 CGE(0.42 ± 0.01 mM TE/g)에 비해 약 3.76배 높은 환원력으로 비교되었다($P < 0.05$). 이 같은 결과는 선행 연구(Kuo 등, 2009)와 유사한 결과로, 생강즙에 홍국균을 접종하여 발효시키면 시간 경과에 따라 라디칼 소거능과 환원력이 증가하였다. 이는 생강에 함유된 다양한 폴리페놀 성분들이 홍국 발효에 의해 6-gingerol, 6-gingerdiol, 8-gingerol, 10-gingerol 등의 대사체뿐만 아니라 홍국균의 생리활성 물질인 monacolin K, 유비퀴논 등이 증가하였기 때문이다(Dugasani 등, 2010; Pyo와 Seong, 2013). 특히 6-gingerdiol과 6-gingerol 등의 대사산물은 생강의 주요 성분인 8-gingerol과 10-gingerol 등에 비해 높은 항산화 활성을 갖는 것으로 보고되었다(Masuda 등, 2004). 따라서 홍국균에 의한 생강의 고상발효는 발효 중에 생성된 다양한 대사체 물질의 상대적 증가로 인해 기질의 항산화 활성이 뚜렷하게 증가한 것으로 나타났다.

소화효소 저해 활성

탄수화물 대사의 필수 효소인 α -amylase와 α -glucosidase는 다당류나 이당류를 단당류로 가수분해하여 소화 흡수시킨다. 따라서 천연물의 α -amylase와 α -glucosidase에 대한 저해 활성은 탄수화물 섭취 후 혈당 상승을 억제하므로 *in vitro* 항당뇨 활성 측정에 이용되어 왔다(Gua 등, 2006). Table 2에서와 같이 MGE 헥산 추출물의 α -amylase에 대한 IC_{50} 은 3.40 ± 0.88 mg/mL로, 동일한 용매의 CGE 추출물(54.50 ± 2.34 mg/mL)보다 월등히 높은 것으로 확인되었다($P < 0.05$). 이는 흥미롭게도 현재 당뇨 치료제로 사용되는 acarbose(7.01 ± 0.23 mg/mL)보다 우세한 저해 활성으로 평가된다. 에틸아세테이트와 부탄올 분획물의 경우에도 MGE(25.90 ± 0.84 mg/mL, 78.88 ± 1.60 mg/mL)가 CGE(113.50 ± 9.99 mg/mL, 164.40 ± 11.27 mg/mL)에 비해 2.1~4.4배 높은 저해 활성을 나타내었으나, 증류수 분획물은 모두 높은 농도에서도 저해 효과가 미미하였다. 또한 α -glucosidase

Table 1. ABTS and DPPH radical scavenging activity, and FRAP values of various solvent fractions from 95% ethanol extract of *Monascus*-fermented gingers

Fraction	ABTS radical scavenging activity (%)		DPPH radical scavenging activity (%)		FRAP (mM TE ² /g)	
	MGE ¹⁾	CGE	MGE	CGE	MGE	CGE
n-Hexane	$88.04 \pm 0.69^{3)a4)}$	85.40 ± 1.26^a	81.89 ± 0.28^a	81.13 ± 0.23^a	1.61 ± 0.03^a	1.59 ± 0.02^a
Ethyl acetate	88.48 ± 0.33^a	78.89 ± 0.57^b	71.98 ± 0.43^b	30.56 ± 0.43^c	1.58 ± 0.04^a	0.42 ± 0.01^b
Butanol	37.38 ± 0.66^c	29.90 ± 0.69^d	14.46 ± 0.84^d	12.72 ± 0.94^e	0.15 ± 0.00^c	0.14 ± 0.00^c
Water	16.45 ± 1.19^e	11.52 ± 4.98^f	3.15 ± 1.21^f	1.75 ± 1.36^f	0.02 ± 0.00^d	0.02 ± 0.00^d

¹⁾MGE: *Monascus* ginger extract, CGE: control ginger extract.

²⁾TE: Trolox equivalents.

³⁾Values are mean $\pm$ SD (n=3).

⁴⁾Different letters in the same experiment indicate significant differences by Duncan's range test ($P < 0.05$).

Table 2. α -Amylase and α -glucosidase inhibitory activities of various solvent fractions from 95% ethanol extract of *Monascus*-fermented gingers

Fraction	IC ₅₀ ¹⁾ (mg/mL)			
	α -Amylase		α -Glucosidase	
	MGE ²⁾	CGE	MGE	CGE
n-Hexane	3.40±0.88 ^{a3)4)}	54.50±2.34 ^b	0.11±0.03 ^a	2.21±0.04 ^a
Ethyl acetate	25.90±0.84 ^c	113.50±9.99 ^d	11.77±1.01 ^b	16.01±0.42 ^c
Butanol	78.88±1.60 ^e	164.40±11.27 ^f	34.06±0.61 ^d	39.88±0.94 ^e
Water	—	—	132.42±2.27 ^f	236.93±3.55 ^g
Acarbose	7.01±0.23		0.30±0.01	

¹⁾IC₅₀: half maximal inhibitory concentration.

²⁾MGE: *Monascus* ginger extract, CGE: control ginger extract.

³⁾Values are mean±SD (n=3).

⁴⁾Different letters in the same experiment indicate significant differences by Duncan's range test ($P<0.05$).

에 대한 저해 활성 역시 α -amylase와 동일한 경향으로 나타나 헥산 분획물에서 MGE(0.11±0.03 mg/mL)의 저해 활성이 acarbose(0.30±0.01 mg/mL)보다 우세하였으며, 에틸아세테이트 분획물 역시 MGE와 CGE가 각각 11.77±1.01 mg/mL와 16.01±0.42 mg/mL로 나타나 MGE가 CGE에 비해 유의적으로 높은 활성을 보여 주었다($P<0.05$). 이 같은 결과는 생강첨가 액체배지에 홍국균을 접종하였을 때 6-gingerol의 함량이 증가하였다(Kuo 등, 2009)는 결과에 기인되며, 또한 6-gingerol은 아밀라아제의 활성 부위에 결합되어 효소와 기질 간의 결합을 효과적으로 방해한다고 보고한 선행 연구(Tintu 등, 2012)에 따른 결과로도 설명할 수 있다. 뿐만 아니라 생강의 페놀 화합물은 여러 성분 간의 복합적인 작용에 기인하여 α -glucosidase의 저해 활성을 증가시키는 것으로 보고되었다(Peng 등, 2012). 따라서 MGE의 높은 α -amylase와 α -glucosidase 저해 활성은 홍국발효 중에 생성된 2차 대사산물과 생강 페놀 화합물 간의 복합적인 작용으로 탄수화물 소화효소의 작용을 저해하여 식후 급격한 혈당 상승을 억제할 것으로 기대할 수 있다.

세포 생존율

생강 추출물의 항당뇨 작용의 기전을 탐색하기 위해 MTT assay를 통하여 생강 추출물의 농도별 세포독성을 관찰하였다. 생강 추출물의 헥산과 에틸아세테이트 분획물이 항산화 활성과 탄수화물 소화효소에 대한 저해 활성이 가장 우월하게 나타났으나, 생강의 진저롤과 쇼가올의 폴리페놀 화합물은 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높았다는 선행 연구의 보고(Rani 등, 2012)에 따라 이후의 실험에는 에틸아세테이트 분획물을 사용하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 각 시료를 0.1, 1, 10, 100 μ g/mL 농도에서 MTT assay를 실시한 결과, 24시간과 48시간 동안 MGE와 CGE의 에틸아세테이트 분획물을 각각 처리한 HepG2에서 10 μ g/mL까지 독성이 확인되지 않았다. 따라서 MGE와 CGE의 에틸아세테이트 분획물의 농도를 각각 10 μ g/mL로 설정하여 이후의 세포 실험에 적용하였다.

HepG2 세포에서 당 대사 관련 단백질 발현

홍국발효 생강 추출물의 당노 예방 및 개선 효과를 검증하기 위해 웨스턴 블롯을 진행한 결과는 다음과 같다(Fig. 4). MGE의 에틸아세테이트 분획물의 total GLUT4 발현 정도

Fig. 3. Effects of ethyl acetate fraction of *Monascus*-fermented ginger extract on cell viability of HepG2. Each value represents the mean±SD (n=3). A: expressed as cell viability of CGE, B: expressed as cell viability of MGE. CGE: control ginger extract, MGE: *Monascus* ginger extract. Significantly different from control according to Duncan's multiple range test ($*P<0.05$).

는 무처리군에 비해 293.85% 증가하였으며, CGE의 에틸아세테이트 분획물과 비교했을 때도 49.38% 증가하였다. 이 같은 결과는 Noipha와 Ninla-Aesong(2018)의 발효 생강의 에틸아세테이트 추출물을 L6 근육세포에 처리하였을 때 GLUT4의 발현이 증가하였다는 결과와 일치하며, 이는 진저롤이 포도당 수송에 중요한 영향을 주었다고 보고하였다. 또한 GCK의 발현에 대한 영향에서 MGE의 분획물은 무처리군에 비해 217.94% 증가하였고, CGE의 에틸아세테이트 분획물에 비해서도 41.43%의 발현량이 증가하였다($P<0.05$). 당 대사의 항상성을 유지하는 GCK의 활성화는 혈중의 포도당을 에너지 생산에 사용하거나 간의 글리코젠으로 합성하여

저장하는 기전에 관여하므로 혈당을 감소시킨다. 한편 Akt는 포도당 흡수의 PI3K/Akt 경로에서 최종적으로 GLUT4의 저장 소포체를 자극하여 GLUT4 발현에 영향을 미치는 단백질의 인자이다(Kang 등, 2014). Fig. 4에서 보는 바와 같이 MGE의 에틸아세테이트 분획물의 p-Akt/Akt 단백질 발현에 대한 영향은 무처리군과 CGE의 분획물에 비해 각각 44.93%와 25.16%의 유의적인 증가를 나타내었다. 이 같은 결과는 MGE의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 가장 높았다는 앞에서의 실험 결과에 따른 결과로 이해할 수 있다. Mokashi 등(2017)에 따르면 플라보노이드 화합물은 IRS-1/PI3K/Akt 경로를 통해 HepG2의 당 흡수율을 증가

Fig. 4. Effect of ethyl acetate fraction of *Monascus*-fermented ginger extract on protein expression of HepG2 cells. MGE: *Monascus* ginger extract, CGE: control ginger extract. Representative Western blot images and relative densitometric bar graphs of total GLUT4 (A), GCK (B), p-Akt (C) and p-AMPK (D). β -Actin was used as protein loading control. Data represent mean and standard deviation obtained from three independent experiments. Means with the different letter (a-c) on the bars are significantly different at $P<0.05$ according to Duncan's multiple range test.

시키며 농도 의존적으로 p-Akt 발현을 증가시킨다고 보고하였다. 본 연구에서 독립적으로 GLUT4의 저장 소포체 자극에 관여하는 p-AMPK/AMPK 단백질의 발현 역시 MGE의 에틸아세테이트 분획물은 CGE의 분획물에 비해 45.20%로 유의하게 증가한 것으로 나타났다($P<0.05$). 이는 6-gingerol이 L6 근육세포에서 세포질의 Ca^{2+} 농도를 상승시키고 인산화된 AMPK의 수준을 향상시켜 포도당 흡수를 촉진한다고 보고(Li 등, 2013)한 선행 연구의 결과를 통해 이해할 수 있다. 따라서 본 실험에 사용된 MGE의 에틸아세테이트 분획물은 HepG2에서 PI3K/Akt 경로와 AMPK의 활성화를 통해 세포막으로 GLUT4의 이동을 촉진시킨 결과, 세포막의 인슐린 비의존성 경로와 의존성 경로의 활성화를 통해 세포 내 포도당 유입을 증가시켜 혈당을 강하시키는 것으로 나타났다.

요 약

홍국균(*Monascus pilosus* KCCM 60084)으로 발효한 생강 추출물(MGE)의 분획별 *in vitro* 항산화 활성과 소화효소 저해 활성 및 포도당 흡수 관련 단백질 발현을 통한 항당뇨 활성과 관련 기전을 평가한 결과는 다음과 같다. 생강 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량은 홍국 발효에 의해 에틸아세테이트와 헥산 분획물에서 각각 1.2~2.8배와 1.49~1.6배 증가하였다($P<0.05$). 또한 에틸아세테이트의 분획물에서 MGE는 발효하지 않은 생강 추출물인 대조군(CG)에 비해 ABTS에서 약 2.6배, DPPH에서 약 2.4배 높은 라디칼 소거 활성을 보였으며, 약 3.8배 높은 환원력을 나타내어 MGE의 항산화 활성이 CGE의 에틸아세테이트 분획물에 비해 월등하게 높은 것으로 나타났다($P<0.05$). 탄수화물 소화효소인 α -amylase와 α -glucosidase에 대한 저해 활성은, MGE의 헥산 분획물에서 IC_{50} 값이 각각 3.40 ± 0.88 mg/mL와 0.11 ± 0.03 mg/mL로 나타나, 현재 당뇨 치료제로 사용 중인 acarbose(7.01 ± 0.23 mg/mL, 0.30 ± 0.01 mg/mL)보다 높은 저해 활성으로 비교되었다. HepG2 세포를 이용한 세포 내 포도당 흡수 관련 기전의 평가에서, 홍국발효 생강 추출물의 에틸아세테이트 분획물은 PI3K/Akt 경로와 AMPK의 활성화를 통해 GLUT4의 이동에 따른 혈당 강하의 효과를 나타낸 것으로 평가되었다.

감사의 글

본 논문은 한국연구재단(NRF)의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것(2020-0066)으로 감사드립니다.

REFERENCES

Baliga MS, Haniadka R, Pereira MM, D'Souza JJ, Pallaty PL, Bhat HP, et al. Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011.

- 51:499-523.
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996. 239:70-76.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol*. 1995. 28:25-30.
- Chakraborty D, Mukherjee A, Sikdar S, Paul A, Ghosh S, Khuda-Bukhsa AR. [6]-Gingerol isolated from ginger attenuates sodium arsenite induced oxidative stress and plays a corrective role in improving insulin signaling in mice. *Toxicol Lett*. 2012. 210:34-43.
- Dileep KV, Nithyanandan K, Remya C. Binding of acarbose, an anti-diabetic drug to lysozyme: a combined structural and thermodynamic study. *J Biomol Struct Dyn*. 2018. 36:3354-3361.
- Dugasani S, Pichika MR, Nadarajah VD, Balijepalli MK, Tandra S, Korlakunta JN. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J Ethnopharmacol*. 2010. 127:515-520.
- Gua J, Jin YS, Han W, Shim TH, Sa JH, Wang MH. Studies for component analysis, antioxidative activity and α -glucosidase inhibitory activity from *Equisetum arvense*. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2006. 49:77-81.
- Hansawasdi C, Kawabata J, Kasai T. α -Amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000. 64:1041-1043.
- Hu J, Wang J, Gan QX, Ran Q, Lou GH, Xiong HJ, et al. Impact of red yeast rice on metabolic diseases: a review of possible mechanisms of action. *J Agric Food Chem*. 2020. 68:10441-10455.
- Kang YH, Kim DJ, Kim KK, Lee SM, Choe M. Study of the mechanisms underlying increased glucose absorption in *Smilax china* L. leaf extract-treated HepG2 cells. *J Nutr Health*. 2014. 47:167-175.
- Kayath CA, Zamba IA, Mokémiabeka SN, Opa-Iloy M, Elenga Wilson PS, Kaya-Ongoto MD, et al. Synergic involvements of microorganisms in the biomedical increase of polyphenols and flavonoids during the fermentation of ginger juice. *Int J Microbiol*. 2020. Article ID 8417693. <https://doi.org/10.1155/2020/8417693>
- Kazeem MI, Akanji MA, Yakubu MT, Ashafa AOT. Protective effect of free and bound polyphenol extracts from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on the hepatic antioxidant and some carbohydrate metabolizing enzymes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013. Article ID 935486. <https://dx.doi.org/10.1155/2013/935486>
- Kuo CF, Hou MH, Wang TS, Chyau CC, Chen YT. Enhanced antioxidant activity of *Monascus pilosus* fermented products by addition of ginger to the medium. *Food Chem*. 2009. 116: 915-922.
- Lee EJ, Yang SA, Choi HD, Im HG, Whang K, Lee IS. Comparison of gingerols in various fractions and the antioxidant effects of supercritical fluid extracts from ginger. *Korean J Food Sci Technol*. 2011a. 43:469-474.
- Lee SW, Lim JH, Kim MS, Jeong JH, Song GY, Lee WS, et al. Phenolic compounds isolated from *Zingiber officinale* roots inhibit cell adhesion. *Food Chem*. 2011b. 128:778-782.
- Li Y, Tran VH, Koolaji N, Duke C, Roufogalis BD. (S)-[6]-Gingerol enhances glucose uptake in L6 myotubes by activation of AMPK in response to $[Ca^{2+}]_i$. *J Pharm Pharm Sci*. 2013. 16:304-312.
- Masuda Y, Kikuzaki H, Hisamoto M, Nakatani N. Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. *Bio-*

- factors. 2004. 21:293-296.
- Mokashi P, Khanna A, Pandita N. Flavonoids from *Enicostema littorale* blume enhances glucose uptake of cells in insulin resistant human liver cancer (HepG2) cell line via IRS-1/PI3K/Akt pathway. Biomed Pharmacother. 2017. 90:268-277.
- Nickavar B, Yousefian N. Inhibitory effects of six *Allium* species on α -amylase enzyme activity. Iran J Pharm Res. 2009. 8:53-57.
- Noipha K, Ninla-Aesong P. Antidiabetic activity of *Zingiber officinale* roscoe rhizome extract: an in vitro study. HAYATI J Biosci. 2018. 25:160-168.
- Park JH, Choi SY, Lee KW, Kim SS, Cho KD, Han CK. Effect of diets with red yeast sweet potato powder supplement on fecal amount and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2012. 41:487-493.
- Peng F, Tao Q, Wu X, Dou H, Spencer S, Mang C, et al. Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant effects of isolated phenolic compounds from fresh ginger. Fitoterapia. 2012. 83:568-585.
- Pyo YH, Seo SY. Simultaneous production of natural statins and coenzyme Q_{10} by *Monascus pilosus* fermentation using different solid substrates. Food Sci Biotechnol. 2010. 19:1635-1641.
- Pyo YH, Seong KS. Effects of *Monascus*-fermented grain extracts on plasma antioxidant status and tissue levels of ubiquinones and α -tocopherol in hyperlipidemic rats. Food Chem. 2013. 141:428-435.
- Pyo YH, Seong KS. Hypolipidemic effects of *Monascus*-fermented soybean extracts in rats fed a high-fat and -cholesterol diet. J Agric Food Chem. 2009. 57:8617-8622.
- Rani MP, Krishna MS, Padmakumari KP, Raghu KG, Sundaresan A. *Zingiber officinale* extract exhibits antidiabetic potential via modulating glucose uptake, protein glycation and inhibiting adipocyte differentiation: an *in vitro* study. J Sci Food Agric. 2012. 92:1948-1955.
- Rhee EJ. Prevalence and current management of cardiovascular risk factors in Korean adults based on fact sheets. Endocrinol Metab. 2020. 35:85-94.
- Saha P, Das B, Chaudhuri K. Role of 6-gingerol in reduction of cholera toxin activity *in vitro* and *in vivo*. Antimicrob Agents Chemother. 2013. 57:4373-4380.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 1965. 16:144-158.
- Su CF, Liu IM, Cheng JT. Improvement of insulin resistance by Hon-Chi in fructose-rich chow-fed rats. Food Chem. 2007. 104:45-52.
- Tibbot BK, Skadsen RW. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. Plant Mol Biol. 1996. 30:229-241.
- Tintu I, Dileep V, Remya C, Augustine A, Sadasivan C. 6-Gingerol inhibits fungal α amylase: Enzyme kinetic and molecular modeling studies. Starch-Starke. 2012. 64:607-612.
- Tohma H, Gülçin İ, Bursal E, Gören AC, Alwasel SH, Köksal E. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. J Food Meas Charact. 2017. 11:556-566.
- Wang, H, Du YJ, Song HC. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves. Food Chem. 2010. 123:6-13.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 1999. 64:555-559.