

초임계 유체 추출을 이용한
마카(*Lepidium meyenii* Walp.) 추출 공정
최적화 및 추출물의 지구력 증진 효과

연세대학교 대학원
생물소재공학협동과정
생명공학전공
강 정 일

초임계 유체 추출을 이용한
마카(*Lepidium meyenii* Walp.) 추출 공정
최적화 및 추출물의 지구력 증진 효과

지도 황 재 관 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2013년 2월 일

연세대학교 대학원
생물소재공학협동과정
생명공학전공
강 정 일

강정일의 박사 학위논문으로 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2013년 2월

차 례

LIST OF FIGURES	iii
LIST OF TABLES	v
국문 요약	vii
1. 서론	1
1.1. 마카	1
1.2. 초임계 유체 추출	10
1.3. 지구력 증진 효능 연구	15
1.4. 연구 배경 및 목적	19
2. 실험 재료 및 방법	22
2.1. 마카 및 초임계 추출 용매	22
2.2. 초임계 이산화탄소 추출	22
2.3. 마카 초임계 추출물의 마카마이드 분리 및 구조 분석	24
2.4. 초임계 추출 최적화 조건 실험	25
2.5. 초임계 추출물 분석	29
2.6. 마카 초임계 추출물의 지구력 증진 효능 연구	30
2.6.1. 수영운동 부하모델을 이용한 유효용량 탐색	30
2.6.2. 수영운동 부하모델에서 지구력 증진 효능 검증	33
2.6.3. 통계 분석	35
3. 결과	36
3.1. 초임계 이산화탄소 추출을 이용한 마카 지질 추출물 제조	36
3.2. 마카 초임계 추출물의 마카마이드 분리 및 구조 분석	39
3.3. 초임계 추출 최적화 조건	44

3.4. 마카 초임계 추출물 성분 분석	54
3.5. 수영운동 부하모델을 이용한 유효용량 탐색	59
3.6. 수영운동 부하모델에서 지구력 증진 효능 검증	68
4. 고찰	80
5. 결론	88
6. 참고문헌	90
영문 요약	103

LIST OF FIGURES

Fig. 1. The structure of macamides	5
Fig. 2. The state of supercritical fluids and critical points in T-P diagram	11
Fig. 3. Flow diagram of supercritical fluid extraction system	23
Fig. 4. Separation procedure of macamides from the scCO ₂ maca extract	26
Fig. 5. Design of 2 ³ full factorial	27
Fig. 6. Swimming pool for measurement of swimming endurance capacity	31
Fig. 7. GC/MS spectrum of compound 1	40
Fig. 8. ¹ H-NMR spectrum of compound 1	41
Fig. 9. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1	42
Fig. 10. Structure of <i>N</i> -benzylhexadecanamide	43
Fig. 11. GC/MS spectrum of compound 2	45
Fig. 12. ¹ H-NMR spectrum of compound 2	46
Fig. 13. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2	47
Fig. 14. Structure of <i>N</i> -benzyl-5-oxo-6 <i>E</i> ,8 <i>E</i> -octadecadienamide	48
Fig. 15. Main effect plots of yield (A), content of macamide (B), and recovery of macamide (C)	51
Fig. 16. Response surface plots of yield (A), recovery of macamide (B), and content of macamide (C)	52
Fig. 17. Contour plots of yield (A) and recovery of macamide (B)	55

Fig. 18. A contour plot of yield and recovery of macamide	56
Fig. 19. Swimming time to exhaustion on day 7 (A) and day 21 (B) in rats fed with scCO ₂ maca extract	63
Fig. 20. Swimming time to exhaustion on day 7 (A) and day 21 (B) in rats fed with scCO ₂ maca extract	69
Fig. 21. Changes of body weight during 21 days	71
Fig. 22. Effect of scCO ₂ maca extract supplementation on lipid peroxidation (A, B) and total GSH (C, D) in liver (left) and skeletal muscle (right) of exhaustive swimming rats	78

LIST OF TABLES

Table 1. Nutrition profile of maca	4
Table 2. Properties for maca after <i>in vivo</i> administration in experimental animals	9
Table 3. Selected examples of the commercial scale supercritical CO ₂ extraction plants	14
Table 4. Recovery efficiency of crude fat (mg/g extract) at different extract conditions from dried maca powder	37
Table 5. Composition of dried maca powder, scCO ₂ maca extract, and residue	38
Table 6. Yield, content of macamide, and recovery of macamide at 2 ³ full factorial design	49
Table 7. Design of RSM for yield and recovery of macamide	53
Table 8. Composition of scCO ₂ maca extract at optimized condition	57
Table 9. Amounts of macamides in scCO ₂ maca extract at optimized condition	58
Table 10. Fatty acids composition of scCO ₂ maca extract at optimized condition	60
Table 11. Composition of amino acids of scCO ₂ maca extract at optimized condition	61
Table 12. Phytosterol content of scCO ₂ maca extract at optimized condition	62
Table 13. Effect of scCO ₂ maca extract on body weight and organ weights	

in forced swimming rats	65
Table 14. Effect of scCO ₂ maca extract on serum biochemical parameters	
in forced swimming rats	66
Table 15. Effect of scCO ₂ maca extract on glycogen and enzyme activities	
in skeletal muscle of forced swimming rats	67
Table 16. Effect of scCO ₂ maca extract on body weight and organ weights	
in forced swimming rats	70
Table 17. Effect of scCO ₂ maca extract on serum biochemical parameters	
in forced swimming rats	72
Table 18. Effect of scCO ₂ maca extract on skeletal muscle and liver	
glycogen in forced swimming rats	74
Table 19. Effect of scCO ₂ maca extract on skeletal muscle enzyme	
activities in forced swimming rats	75
Table 20. Effect of scCO ₂ maca extract on liver antioxidant status in	
rats swum to exhaustion	76
Table 21. Effect of scCO ₂ maca extract on skeletal muscle antioxidant	
status in rats swum to exhaustion	77

초임계 유체 추출을 이용한 마카(*Lepidium meyenii* Walp.) 추출 공정 최적화 및 추출물의 지구력 증진 효과

마카(Maca, *Lepidium meyenii* Walp.)는 십자화과에 속하는 페루 고산지대의 특화작물로 영양식품 및 강장식물로 애용되어 왔으며, 2차 대사산물 성분에 대한 연구와 주로 불임 개선 및 성기능 강화와 관련된 생리 활성 연구가 이루어져 왔다. 여러 효능 연구들은 일반 건조 분말과 용매 추출물에 대한 것이 대부분으로 마카의 고유 성분으로 알려진 마카마이드(macamides) 성분을 포함한 추출물에 대한 연구는 거의 없었다. 본 연구에서는 마카마이드를 함유하도록 추출 공정의 최적화 조건을 도출하고, 그 추출물의 지구력 증진(endurance capacity) 효과에 대해 연구하였다.

마카의 추출은 목표 물질로 선정한 마카마이드의 특성을 고려하여 식품 원료 제조에 사용 가능한 이산화탄소 초임계 유체 추출(supercritical fluid extraction) 공정을 적용하였고, 마카 초임계 추출물로부터 2종의 마카마이드를 분리 후 GC/MS와 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR 분석을 통해 *N*-benzylhexadecanamide ($\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{NO}$) *N*-benzyl-5-oxo-6*E*,8*E*-octadecadienamide ($\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{NO}_2$)를 확인하였다. 초임계 이산화탄소 유체 추출을 이용한 공정 조건 도출을 위해 추출 압력, 추출 온도, 그리고 용매량 3가지 요인으로 2^3 완전요인 실험 설계법을 진행하였고, 추출 압력과 추출 온도가 주효과 요인임을 확인하였다. 1차 실험 결과를 바탕으로 반응표면분석법(RSM, response surface methodology) 실험을

통해 생산 수율과 마카마이드 회수율에 대한 최적화 조건(38.6℃, 100 bar)을 도출하였다.

최적화 조건에서 제조한 마카 초임계 추출물의 마카마이드 함량과 일반성분, 지방산, 아미노산, 식물성스테롤(phytosterol) 함량을 분석하여 표준화하였고, 본 마카 초임계 추출물의 지구력 증진 효과에 대한 기능성 평가 검증을 위해 체중부하 강제수영(weight-loaded forced swimming test) 모델을 이용하여 실험 진행하였다. 마카 초임계 추출물 0-1,000 mg/kg 범위로 3주간 투여한 1차 유효 용량 평가에서 30, 100 mg/kg 투여군에서 용량 의존적인 수영시간 증가를 확인하였고, 이때 100 mg/kg 투여군은 약 40% 수영시간의 증가를 나타내었다. 선정된 용량에서의 본 실험에서도 100 mg/kg 투여군에서 3주 후 수영시간이 유의적으로 증가하였으며, 이에 혈액 및 간과 근육 조직에서의 에너지대사, 피로물질, 그리고 항산화 관련 지표들을 분석하였다. 마카 초임계 추출물을 투여시 수영시간이 유의적으로 증가하였음에도 에너지 급원과 혈청 젖산의 농도는 변화 없이 유지되었으며, 혈액의 lactate dehydrogenase (LDH)와 근육의 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)는 감소하였고, 근육의 citrate syntase (CS)와 간과 근육의 글루타치온(glutathione, GSH)은 증가하였다.

본 연구 결과로 볼 때 마카마이드를 함유한 마카 초임계 추출물의 지구력 증진 효과는 근육 조직에서의 항산화 기작을 통한 세포 손상 억제 효과와 근육 세포의 산화능력 증진과 관련이 있는 것을 알 수 있었다. 마카 초임계 추출물은 기존의 건조 분말이나 용매 추출물의 유효 섭취량과 대비하여 현저히 낮은 농도에서도 효과가 나타났기에 건강식품에의 활용도 측면에서 가치가 있으며, 추후 지구력 증진 기능성 소재로의 적용이 확대될 것으로 생각된다.

핵심 되는 말: 마카(maca), 마카마이드(macamides), 초임계 유체 추출

(supercritical fluid extraction), 반응표면설계법(RSM), 지구력 증진
(endurance capacity), 체중부하 강제수영(weight-loaded forced swimming
test), 항산화(antioxidant)

1. 서론

1.1. 마카

마카(Maca)는 학명이 *Lepidium meyenii* Walp로서 십자화과(Brassicaceae) 다닥냉이속(*Lepidium* genus)에 속하는 일년 또는 이년생 초본식물이다⁽¹⁾. 십자화과에는 매우 중요한 식물들이 포함되어 있으며 전분식물류(starch plant), 지방종자류, 채소류, 향신료 등으로 크게 구분할 수 있는데 그 중 마카는 전분식물류에 해당된다⁽²⁾. 마카는 순무 또는 감자의 형태와 유사한 둥그런 모양을 하고 있는데 이것을 ‘배축(지하부, hypocotyl)’이라 부르며 재배되는 동안 계속 발육한다. 마카는 이 배축이 식용 부위가 되며 특유의 짭짤한 버터 캔디 맛이 나는데⁽³⁾, 총 175여종의 다닥냉이속 식물 중에서 마카만이 배축을 형성하는 특징이 있다⁽⁴⁾. 이 배축은 성장하는데 약 7개월이 걸리며 배축 크기가 직경 약 3-5 cm, 길이 약 10-14 cm 정도로 최대가 되는 시기인 5월이나 6월경 수확을 하게 된다^(2,5).

잉카제국 시대 이전부터 재배되기 시작되었다는 마카는 안데스 고원지대에서만 주로 재배되어 왔는데, 오늘날에는 해발 약 4,000 m에 위치하는 페루의 후닌(Junin)주와 세로데파스코(Cerro de Pasco)주의 suni와 puna라 불리는 환경보호 지역 및 4,450 m에 근접하는 안데스 고원 중심부에서만 재배된다. 마카가 재배되는 페루의 고원지대는 연평균 기온이 최저 -1.5℃, 최고 12℃이며 서리가 자주 내려 상대습도가 70% 정도로 높은 편이며 -10℃ 이하로도 기온이 급감하기도 한다⁽¹⁾. 마카 재배 지역의 토양은 pH 5이내의 산성인 토질을 나타내며 평균적으로 1 ha(헥타르)당 400,000-700,000 뿌리가 수확된다⁽²⁾.

마카는 수천년간 페루 원주민들에게 중요한 영양식품 및 강장식물로 애용되어 왔으며 안데스 고원지대의 토착민에게는 중요한 기본 식품 역할을 하였다

⁽⁶⁾. 또한 오늘날에도 마카는 뿌리 부분은 생(生)으로 또는 고기와 기타 야채와 함께 볶음 요리로 만들어 먹기도 하고 말려서 먹기도 하는 페루인들에게는 대중적인 식품이다⁽¹⁾. 마카를 수확 후 자연건조 하게 되면 마카의 배축은 약 2-8 cm 크기로 감소하게 되는데 그 중량은 편차가 심한 편으로 7.64-23.88 g의 범위로 보고되어 있다⁽⁵⁾. 말린 마카는 물이나 우유에 타서 스프처럼 끓여 먹기도 하고 주스나 칵테일, 차, 잼, 푸딩으로 만들어 먹기도 하고, 또한 이를 발효시켜 ‘maca chichi’ 라는 술로 담궈 먹기도 한다^(2,7).

마카는 단백질, 불포화 지방산과 무기질이 풍부하게 함유되어 있어 비교적 높은 영양학적인 가치를 지니고 있는데, 배축의 색상 종류에 따라 차이는 있으나 생마카 뿌리에는 80% 내외의 수분이 함유되어 있고, 건조된 마카 분말에는 단백질 8.87-11.6%, 지방 1.09-2.2%, 탄수화물 54.6-60.0% (설탕 23.4%, 포도당 1.55%, 올리고당류 4.56%, 다당류 30.4%), 식이섬유질 8.23-9.08%와 회분 4.9-5.0%가 함유되어 있다^(8,9). 그리고 마카에는 약 20여종의 아미노산이 함유되어 있는데 이 중 필수 아미노산도 함유되어 있으며, 특히 중추 신경 피로 방지 및 운동 후 피로 회복 능력에 효과가 있는 것으로 알려진 발린(valine), 류신(leucine), 이소류신(isoleucine) 같은 분지쇄아미노산(branched chain amino acid, BCAA)이 전체 아미노산의 약 20%로 풍부한 것으로 확인되었으며, 리놀레산(linoleic acid)과 올레산(oleic acid) 같은 불포화 지방산이 총 지방산 함량 중 약 50-60%를 차지하고 있어 불포화 화합물의 비율이 높은 편이며, 철(Fe), 망간(Mn), 구리(Cu), 아연(Zn), 나트륨(Na), 칼륨(K), 그리고 칼슘(Ca) 등 무기질도 풍부한 것으로 알려져 있다^(3,8).

마카에는 여러 가지 생태형(ecotype)종이 존재하는데, 배축의 색상으로 황색, 붉은색, 흰색, 회색, 검은색, 황색/보라색, 흰색/보라색 등 8종 이상의 종류로 구분할 수 있으며 그 중 황색종이 일반적으로 가장 많이 재배되고 있다^(9,10). 색상에 따른 마카의 영양성분 및 약리효능에 대해서는 2005년부터 연

구가 시작되어 이어지고 있으며, 색상에 따라 마카 원료의 성분과 효능에 차이가 있는 것으로 보고되고 있다⁽¹¹⁾. 붉은색의 마카는 단백질과 칼륨의 함량이 다른 색상의 마카보다 높고 효능적 측면에서는 태아의 상태를 좋게 증진하는데 보다 좋은 효과를 보인 반면, 검은색 마카의 경우 붉은색 마카에 비해 평균적으로 수용성 당과 리보플라빈(vitamin B₂) 그리고 철의 함량이 많고 효능적 측면에서는 동물실험 등을 통해 성기능 향상 및 학습과 기억력에 보다 더 효과적인 것으로 보고되고 있다⁽¹²⁾. 이에 반해 황색의 마카는 Table 1에서 보는 바와 같이 붉은색과 검은색의 중간 정도의 영양 성분 함량을 유지한다⁽¹⁾. 붉은색, 황색 그리고 검은색 마카의 수용성 추출물의 동결건조물에 대한 적외선 스펙트럼 분석에서 각기 다른 흡광도에서 7가지 피크가 나타났는데 그 중에서 붉은색 마카가 가장 높은 피크를 보여주었고 그 다음으로 황색, 검정색 순으로 나타났다는 보고도 있다⁽¹³⁾.

마카에는 여러 종류의 2차 대사산물이 함유되어 있음이 보고되어 있는데⁽¹⁴⁾ 그 중 불포화 지방산과 그들의 아미드 결합 구조로 구성된 마카마이드(macamide) 및 마카엔(macaene) 성분은 다른 식물에서는 발견되지 않은, 마카의 배축에 주로 함유되어 있는 특유의 성분으로 알려져 있으며⁽⁹⁾, 2002년에 그 구조가 처음으로 규명되었다^(15,16). 현재까지 발견된 성분은 16종의 마카마이드(Fig. 1)와 1종의 마카엔이 있으며, 마카마이드의 함량은 재배되는 고도에 따라 차이가 있어 낮은 고도의 지역에서는 그 함량이 낮은 것으로 알려져 있다. 또한 배축의 색상에 따라서도 차이가 있어 마카마이드류는 보라색과 검은색 마카에, 마카엔은 황색종에 더 많았다는 보고⁽¹¹⁾가 있으며, 가장 최근의 한 연구에서는 색상에 따른 영향은 크지 않고 재배 지역이 마카마이드 함량에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로 분석되었다⁽¹⁷⁾. 이런 여러 영향으로 건조 마카에 *N*-benzylhexadecanamide 0.0005-0.007%를 포함한 마카마이드 총합이 0.0016-0.0123%로 낮은 수준의 함량 보고⁽¹⁸⁾도 있고, 0.09-0.45%의 마카엔과

Table 1. Nutrition profile of maca^a

Analysis ^b	Red maca	Yellow maca	Black maca
Fibre (g%)	5.45	5.30	4.95
Carbohydrates (g%)	62.60	62.69	63.82
Pure protein (g%) ^c	9.97	8.25	7.70
Starch (g%)	37.52	37.86	38.18
Soluble sugars (g%) ^d	6.03	6.17	7.02
Riboflavin (mg%)	0.50	0.61	0.76
Potassium (mg%)	1160	1130	1000
Iron (ppm) ^e	62	80	86

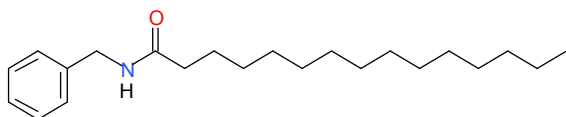
^a Adopted from Valerio et al.⁽¹⁾

^b The unit data are related to g/100g maca and mg/100g maca.

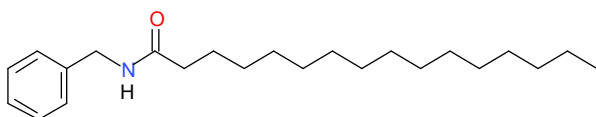
^c Calculated from protein nitrogen by 6.25.

^d Indirect reducing ppm.

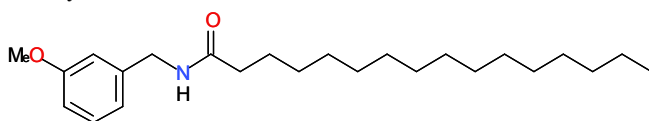
^e ppm = parts per million.



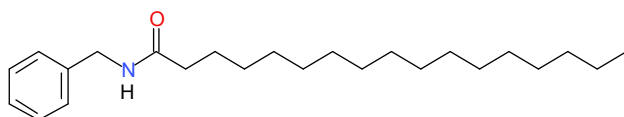
N-benzylpentadecanamide



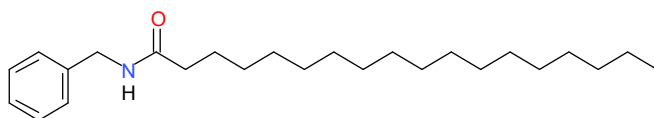
N-benzylhexadecanamide



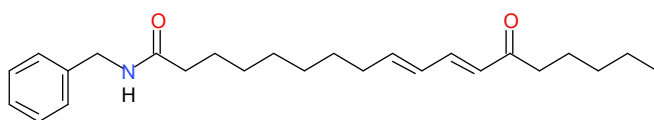
N-(3-methoxybenzyl)-hexadecanamide



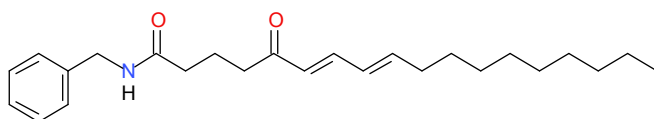
N-benzylseptadecanamide



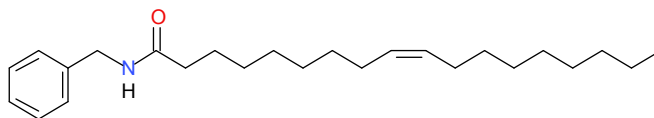
N-benzyl-octadecanamide



N-benzyl-13-oxo-9*E*,11*E*-octadecadienamide

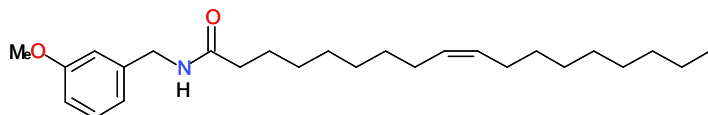


N-benzyl-5-oxo-6*E*,8*E*-octadecadienamide

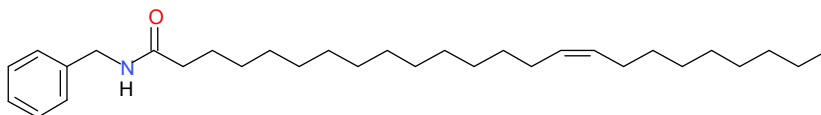


N-benzyl-9*Z*-octadecenamide

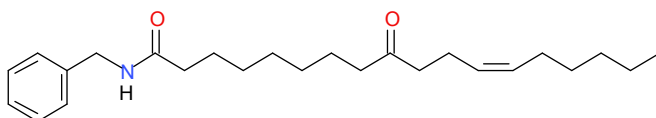
Fig. 1. The structure of macamides. Adopted from Wang et al.⁽⁹⁾



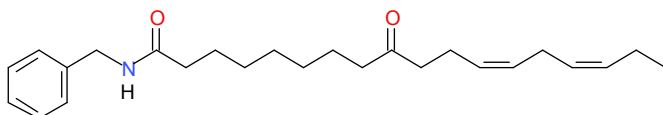
N-(3-methoxybenzyl)-9*Z*-octadecadecanamide



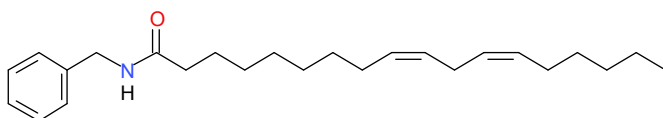
N-benzyl-15*Z*-tetracosenamide



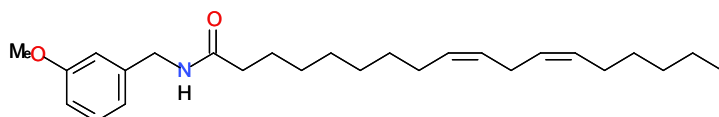
N-benzyl-9-oxo-12*Z*-octadecenamide



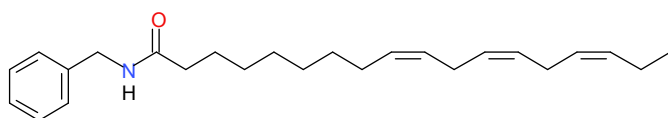
N-benzyl-9-oxo-12*Z*,15*Z*-octadecadienamide



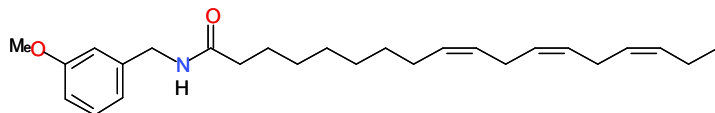
N-benzyl-(9*Z*,12*Z*)-octadecadienamide



N-(3-methoxybenzyl)-(9*Z*,12*Z*)-octadecadienamide



N-benzyl-(9*Z*,12*Z*,15*Z*)-octadecatrienamide



N-(3-methoxybenzyl)-(9*Z*,12*Z*,15*Z*)-octadecatrienamide

Fig. 1. The structure of macamides (continued). Adopted from Wang et al.⁽⁹⁾

0.06-0.52%의 마카마이드 함량으로 꽤 높게 보고된 바도 있다⁽⁹⁾.

글루코시놀레이트(Glucosinolate)는 통상적으로 십자화과 식물에는 널리 분포되어 있으며 myrosinase와 같은 효소에 의해 isothiocyanate 및 다른 작은 대사체로의 가수분해가 일어나는데, 생마카에서는 효소 성분과 분리되어 있어 글루코시놀레이트의 함량이 많으나 건조 및 가공 공정을 거치면서 세포가 손상되어 효소와의 반응이 일어나 쉽게 분해되어 건조 분말에서의 함량은 낮은 것으로 알려져 있다⁽⁹⁾. 마카에 대한 연구 초기에는 benzyl glucosinolate가 여러 생리적 효과를 나타내는 기능성분으로 제안되기도 하였으나 실제 benzyl glucosinolate와 benzyl isothiocyanate가 함유되어 있는 다른 페루산 식물인 mashua (*tropaeolum tuberosum*)를 투여한 실험에서는 상반된 연구결과가 나오기도 하였고, 건조 이후에는 그 함량이 많이 낮아져 최근에는 이런 주장이 힘을 잃어가고 있다⁽⁵⁾.

알칼로이드(Alkaloids)의 경우 다수의 식물체에서 주로 발견되는 성분으로 약 60여종이 있으며, 대다수의 알칼로이드는 생물학적 활성을 보여주고 있다. 마카에서는 3가지 종류의 알칼로이드가 분리되었는데 2개의 imidazole alkaloids (lepidiline A와 lepidiline B)와 1개의 macaridine (1,2-dihydro-*N*-hydroxypyridine)의 benzylated 유도체가 그것이다⁽¹⁹⁾. 또한 거의 모든 식물에서 발견되는 기능 성분인 약 200여종의 식물스테롤(phytosterol)류도 마카에서 분리된 바 있는데, 가장 주된 형태인 β -sitosterol, campesterol, 그리고 stigmasterol과 함께 brassicasterol, avenasterol, 그리고 ergosteryl류들도 분석된 바 있다^(9,20).

마카는 전통적으로 성기능 강화 및 불임개선에 대한 효능이 많이 알려져 왔는데⁽²¹⁾, 마카의 불임개선에의 효능은 쥐를 이용한 과학적인 실험을 통해 입증된 바 있고, 마카 식이를 통해 고지대에서 유발되는 쥐의 체중감소 및 부고환의 정자수 감소도 방지할 수 있다는 것도 확인되었다⁽²²⁾. 또한 유독한 말라

티온(malathion, 살충제)과 아세트산염에 의해 야기되는 쥐의 정자수 감소에도 효과가 있는 것으로 확인하였다⁽²³⁾. 건강한 성인 남성을 대상으로 한 인체 시험에서도 마카 호화 분말 1,500-3,000 mg 섭취시 성욕 증가가 나타났고, 그림에도 불구하고 체내 성호르몬에는 영향이 없었던 것으로 확인된 바 있다⁽²⁴⁾.

최근에는 면역 강화작용⁽²⁵⁾, 신경 보호작용⁽²⁶⁾, 골다공증⁽²⁷⁾, 기억력 개선⁽²⁸⁾, 항우울증⁽²⁹⁾, 대사증후군⁽⁵⁾, 혈압⁽³⁰⁾, 항스트레스⁽³¹⁾, 그리고 UV로부터의 피부 보호효과⁽³²⁾에 대한 연구결과가 계속적으로 발표되고 있다. 즉, 마카의 기능성에 대한 연구는 향후 점차 확대 되어질 것으로 예상되는데, 2000년 이후 전세계적으로 보고된 동물실험을 실험 동물의 종류에 따라 대표적 효능 결과들을 정리해 보면 Table 2와 같다.

이런 다양한 효능을 나타내는데 있어 공통적으로 접근 가능한 해석으로는 마카가 산화적 스트레스(oxidative stress) 상태에서 자유기(free radical)를 제거하여 세포보호(cytoprotection) 효과가 있다는 것이다. 반응성 산소와 질소종(ROS/RNS)들이 과도하게 생성되어 체내 항산화 능력을 넘게 되면 산화적 스트레스 상태가 되어 세포에 피해를 주고 결국 여러 질병과 연관성이 있음을 많은 연구자들이 보여주었는데⁽³³⁾, 마카는 이러한 ROS/RNS를 제거하여 질병적 변화로부터 세포를 보호하는데 도움을 준다는 것이다. 기억력 개선 및 학습 능력 증진 연구에서도 산화 스트레스의 지표로 알려진 malondialdehyde (MDA) 수준이 뇌 조직에서 감소함을 보여주어 항산화 작용에 의한 효과로 해석해 볼 수 있었다⁽⁵⁾.

이러한 생리적 효능 때문에 마카는 ‘peruvian ginseng’ 으로 불리면서 최근 몇 년 사이 미국, 남미, 유럽 및 일본의 건강식품 시장에서 자양강장 및 스테미나 식품으로 상품화되어 인기를 끌면서 기능성 신소재로써 주목받고 있다⁽³⁴⁾. 미국의 경우 식이보충음식(DSHEA, 1994)으로 등록되어 있어 여러 형태

Table 2. Properties for maca after *in vivo* administration in experimental animals^a

Species	Property
Rats	Increase sperm count and sperm motility Increase male sexual behavior Small effect on rat male sexual behavior Nutritional Antistress Prevent testosterone-induced prostatic hyperplasia Reversed osteoporosis Neuroprotective effects Protects against UV radiation Antioxidant status, lipid, and glucose metabolism
Mice	Increase male sexual behavior Increase embryo survival Prevent testosterone-induced prostatic hyperplasia Increase number of offsprings Improve memory and learning
Guinea pigs	Increase number of offsprings
Fish	Nutritional Increase embryo survival
Bulls	Improve sperm quantity and quality Unaffected mating behavior

^a Adopted from Gonzales.⁽⁵⁾

로 섭취하고 있으며, 일본에서도 2007년 기준으로 약 70억엔 정도의 시장을 형성하고 있다⁽³⁵⁾. 국내에서는 2005년도 4월 식품의약품안전청에서 식품 부원료로 정식 허가하여 현재 단순 분말이나 물 또는 주정추출물을 원료로 사용한 제품이 다수 생산, 판매되고 있으며, 2011년 1월에는 *N*-benzylhexadecanamide를 지표성분으로 한 마카 젤라틴화 분말을 1일 1.5-3 g 섭취시 운동수행능력 향상에 도움을 줄 수 있다는 기능성으로 생리활성 3등급의 개별인정 원료로 등록된 바 있다. 이런 전 세계적인 관심과 제품 개발 및 생산으로 인해 페루에서의 마카 수출은 2001년 1,415,000 USD에서 2010년 6,179,011.8 USD로 약 4.4배 급증하였다⁽⁵⁾.

1.2. 초임계 유체 추출

초임계 유체(Supercritical fluid)는 그 물질의 임계 온도(critical temperature, T_c)와 임계 압력(critical pressure, P_c)보다 각각 높은 온도와 압력에서 유체로서 존재하는 물질로, Fig. 2와 같이 기체처럼 밀폐된 공간을 가득 채우는 유체라고 할 수 있다. 초임계 유체의 장점은 임계점(critical point, C_p) 부근에서 압력을 변화시키면 밀도, 점도, 확산계수와 극성 등 많은 물성이 기체에 가까운 상태에서부터 액체에 가까운 상태까지 연속적으로 큰 변화를 가져온다는 것이다⁽³⁶⁾. 초임계 유체를 이용한 추출법은 물질의 기체 상태와 액체 상태의 상경계지점 이상의 압력과 온도를 설정해 줌으로써 액체 상태에서의 용해력과 기체 상태에서의 확산계수 및 점도의 특성을 지니게 하여 신속하면서도 선택적인 추출을 가능하게 하는 방법으로 추출 용매로서 임계 온도와 임계 압력 이상의 상태인 초임계 유체를 사용한다⁽³⁷⁾.

주로 사용되는 초임계 용매로는 이산화탄소, 초임계수, 초임계 메탄올이 있으며, 초임계 이산화탄소(임계 온도 31.1℃, 임계 압력 7.38 MPa)는 실온부근

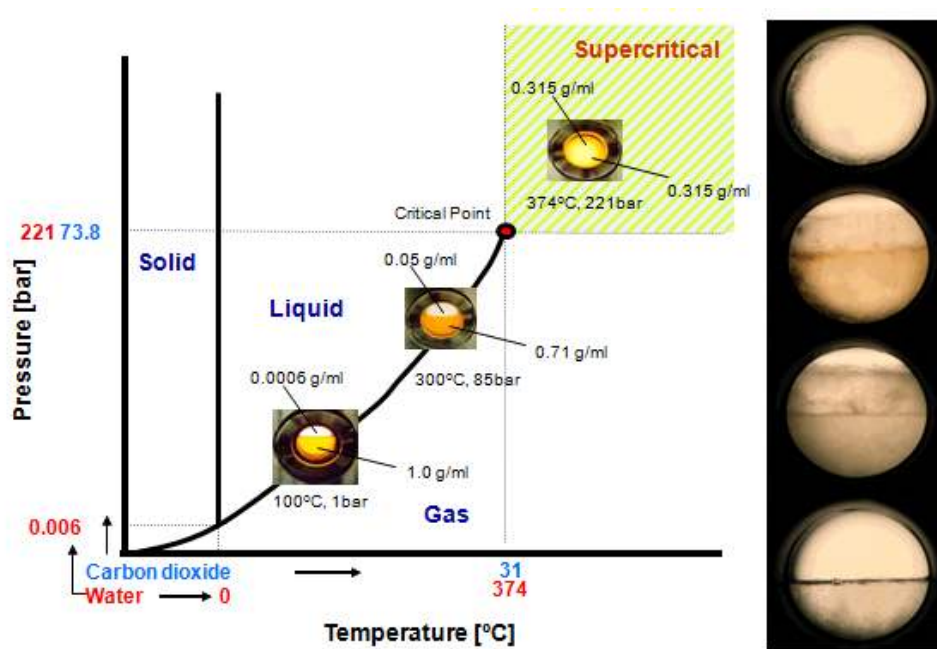


Fig. 2. The state of supercritical fluids and critical points in T-P diagram. Adopted from Lee.⁽³⁶⁾

의 조건에서 주로 사용되어 열변성을 일으킬 염려가 적기 때문에 추출, 합침, 건조, 세정, 코팅 공정 등에 적용되고 있다⁽³⁸⁾. 특히 추출 용매로서 가장 널리 이용되고 있는데, 이는 다른 기체에 비해 쉽게 초임계 유체를 만들 수 있고, 무색, 무취, 무독성, 비폭발성, 그리고 용질과의 비반응성 등 고유한 특성 때문이다⁽³⁹⁾.

그 외 초임계수(임계 온도 374℃, 임계 압력 22.1 MPa)는 380-650℃, 25-30 MPa 조건에서 주로 사용되며 온도와 압력 조건이 높기 때문에 분해력이 커서 모든 유기물을 분해하는 특성을 가지고 있다. 이에 다이옥신 같은 유해물질의 분해, 폐수처리 등에 사용될 수 있다. 초임계 메탄올(임계 온도 239℃, 임계 압력 8.1 MPa)은 초임계수에 비해 분해력은 떨어지지만 액체 메탄올에 비해 고속으로 유기물의 메틸화나 선택적인 분해가 가능하다. 이들 초임계 유체는 각각의 특성에 따라 다양한 분야에서의 적용이 급속히 확산되고 있다⁽³⁸⁾.

초임계 이산화탄소를 적용한 식품 추출 연구로는 크게 지방류의 추출, 콜레스테롤의 추출, 지방류의 분획, 지방류의 정제, 그리고 향성분의 추출 등으로 나뉘볼 수 있다. 유지류의 경우는 식용식물유의 추출, 지방산 에스터의 분리 및 농축, 동물성 지방의 추출 및 분획 등 다양한 실험이 이루어지고 있다^(39,40). 초임계 유체 추출에 관여하는 주요 요인은 추출 온도와 추출 압력으로 이 두 요인에 의해 초임계 유체의 밀도가 가장 많은 영향을 받게 되며, 그 외 추출 시간, 원료의 입도, 이산화탄소의 유속, 추출기의 L/D 비율, 그리고 보조 용매의 종류 및 농도 등에 영향을 받는다⁽⁴¹⁾. 일반적으로 초임계 이산화탄소에 대한 용해도는 극성이 낮을수록, 분자량이 작을수록, 불포화 결합일수록, 비방향족일수록 증가한다⁽³⁸⁾. Essential oil 및 지방산과 그의 에스터류에 대한 연구들의 경우 대부분 이산화탄소의 임계점 온도인 37.2℃보다 약간 높은 40-50℃ 온도 조건에서, 압력의 경우도 그리 높지 않은 조건에서 주로

진행되고 있다⁽⁴²⁾.

초임계 유체 추출은 초임계 유체 기술 중에서 가장 일찍부터 상용화가 진행된 분야로 초임계 유체 기술로 실용화된 공정의 대부분이 추출 분리에 관한 것이다. 초임계 추출에 대한 산업적 응용 사례는 유용한 물질 혹은 제거해야 할 물질을 추출하는 것으로, 처음으로 공업화된 것은 1978년 독일의 HAG AG사의 카페인 제거 커피 제조 공정이다. 과거에는 카페인을 제거하기 위해 dichloromethane 등의 유기용매를 이용하였으나, 초임계 이산화탄소로 추출하게 되면 커피의 향기 성분이나 맛은 그대로 유지하면서 카페인만 추출할 수 있기 때문에 기존 제품보다 관능이 우수한 디카페인 커피의 생산이 가능하다. 현재 대규모 생산 공장이 독일, 이탈리아, 미국 등지에서 가동 중인데, 이 공정에 의해 커피 원두에 포함되어 있던 0.7-3%의 카페인 함량을 0.02% 이하로 감소시킬 수 있으며 현재 전 세계적으로 연간 100,000톤 이상이 생산되고 있다. 그 후 SKW-trostberg사에서 호프(hop)로부터의 쓴맛 성분인 humulone 제거를 위한 추출과 녹차로부터의 카페인 제거 추출 생산도 상용화 된 바 있다⁽⁴³⁾.

그 외 일본, 프랑스, 이탈리아 등지에서는 스파이스, 향료, 색소 등의 다품종 소량 생산에 적합한 규모의 공장들이 건설되었고, 최근 들어서는 아시아 지역에도 공장 건설이 가속화되고 있는데 특히 중국에서는 연간 5개 이상의 생산 공장이 건설되고 있다⁽³⁸⁾. 국내에서는 (주)유맥스가 세계 최초로 참기름을 생산하는 공정의 상업화에 성공하여 충청북도 음성군 감곡에 추출 공장을 건설하여 현재 제품을 생산, 판매하고 있다. Table 3은 이산화탄소 초임계 유체를 이용해 상업적으로 생산되고 있는 사례이다⁽⁴³⁾.

높은 극성을 가지는 생리활성 성분들에 대해서는 비극성 초임계 이산화탄소의 극히 적은 용해성으로 추출에 한계가 있다. 이를 극복하기 위해 알코올류, 물, 그리고 다양한 기체들과 같은 극성의 보조 용매(co-solvent or modifier)

Table 3. Selected examples of the commercial scale supercritical CO₂ extraction plants^a

Process	Manufacturer
Coffee decaffeination	Kaffee HAG AG, Bremen, Germany General Foods, Houston, Texas, USA Hermsen, Bremen, Germany SKW-Trostberg, Poszzillo, Italy
Tea decaffeination	SKW-Trostberg, Munchmuenster, Germany
Fatty acid from spent barley	Marbert GmbH, Dusseldorf, Germany
Nicotine extraction	Philip Morris, Hopewell, Virginia, USA
Rose-residual oil SCE	Kerr-McGee, Oklahoma city, Oklahoma, USA
Pyrethrum extraction	Agrofarm, United kingdom
Hops extraction	Pfizer Hops Extraction, Sydney, Nebraska, USA Hopfenextraktion, HVG, Barth, Raiser & Co., Wolnzach, Germany Hops Extraction Corp. of America, Yakima, Washington, USA J.I. Haas, Inc., Yakima, Washington, USA Carlton, United Breweries, United kingdom
Hops extraction and spices	SKW-Trostberg, Munchmuenster, Germany Pauls & White, Reigat, United kingdom
Flavors extraction	Camilli Albert & Louie, Grasse, France
Flavors/Aromas	Flavex GmbH, Rehlingen, Germany
Corn oil	Mohri Oil Mills, Japan
Color extraction - red pepper	Mohri Oil Mills, Japan Fugi Flavor, Japan Sumitomo Seiko (Uhde facility), Japan Yasuma (Mitsubishi Kokoki facility), Japan Hasegawa Koryo (Uhde facility), Japan Takasago Foods (Mitsubishi Kokoki facility), Japan
Sesame oil extraction	U-max Co., Ltd, Korea

^a Adopted from Ju et al.⁽⁴³⁾

를 초임계 이산화탄소와 함께 사용하여 이산화탄소의 극성과 용해성을 증가시킴으로서 추출 효율을 향상시킬 수 있다. 건조된 상태의 원료를 그대로 추출하는 것에 비해 보조 용매를 이용할 경우 세포를 팽윤시킨다거나 세포벽이나 세포막의 미세공을 열어줌으로써 추출 속도가 빨라진다. 특히 알코올류는 목적 성분과 시료 매트릭스간의 상호작용을 감소시켜 목적 성분의 용출을 용이하게 하는 것으로 알려져 있는데, 원료 및 목적 성분의 특성에 따라 보조 용매의 효과가 다르게 나타날 수 있으며, 또한 전체 추출 수율 증가에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 보고된 바도 있다⁽⁴⁰⁾.

최근에는 추출 효율 증대를 위해 기존의 유기용매 추출 공정에 마이크로웨이브나 초음파를 접목한 하이브리드화 공정에 대한 추출 연구가 활발하게 진행되고 있다. 초임계 유체 추출 연구 분야에서도 추출기 내부의 교반이 어려운 단점을 보완하고 물질 전달 속도를 증가시키기 위한 방법으로 초음파를 적용한 초임계 유체 추출에 관한 연구들이 최근 발표되다. 초음파가 적용될 경우 원료의 종류와 상태, 추출 조건에 따라 다소 차이는 있으나 추출 효율이 향상됨이 확인되었다⁽⁴⁴⁾.

우리나라에서는 국민에게 안전한 식품을 제공하고, 신기술의 도입을 통한 식품산업 발전을 위하여, 식용유지 등의 추출 공정의 하나로 초임계 유체 추출법 사용이 2004년 5월 식품의약품안전청 개정 고시 제 2004-41호에 의하여 인정되었다⁽⁴³⁾. 이로서 국내에서 식품 가공에 활용 가능한 법적 근거가 마련되게 되었으며, 최근에는 친환경인 특성으로 인해 녹색기술로 평가되고 있다.

1.3. 지구력 증진 효능 연구

현대 사회는 서구화된 식습관과 여러 스트레스 인자의 증가로 많은 질환의 유병율이 증가하고 있으며 지속적인 피로를 느끼고 호소하는 만성 피로 증후

군 또한 늘어나고 있다. 국내 대학병원 내원 환자 1,000명을 대상으로 한 연구에서는 만성 피로 유병율은 11.4%, 만성 피로 증후군 환자는 1.22%였다는 보고가 있다⁽⁴⁵⁾. 하지만 특별한 질환을 동반하지 않을 경우 내원을 자체가 높지 않을 것이라는 점을 감안하면 쉽게 피로를 느끼는 사람들은 훨씬 더 많을 것으로 추정할 수 있겠고 이를 해소하기 위해 피로회복제 및 자양강장 건강식품에 대한 소구가 늘어가고 있다. 예전에는 특정 사람들에게만 소비되던 지구력 증진 제품들이 에너지 보충, 근육량 증가, 운동 능력 향상, 피로 회복 등의 목적으로 일반인들에게도 점차 확대 소비되고 있다⁽⁴⁶⁾.

일반적으로 심신의 기능이 원활히 이루어지지 않을 경우 ‘스트레스(stress)’ 혹은 ‘피로(fatigue)’가 쌓였다고 하는데, 문헌에 나타난 피로 및 스트레스의 정의를 요약하면 다음과 같다. 피로의 경우 과로 또는 에너지 고갈로 인해 휴식에 의해 회복되지 않을 만큼 신체적 또는 정신적 능력이 감소한 상태 또는 근 수축 활동에 요구되는 힘을 충분히 발휘 또는 유지하지 못하는 상태, 즉 운동수행 능력의 감소상태로 정의할 수 있다. 스트레스는 육체적인 피로와는 대조적으로 정신적인 과부하로 신체 리듬의 불균형이 일어나는 신체적 비특이 반응으로 동물의 항상성(homeostasis)이 침해 받는 경우로 정의하고 있다. 이와 같은 정의들을 정리해 보면 넓은 의미의 ‘피로’는 스트레스를 포함하는 개념으로 육체적 또는 정신적 활동을 하기 위한 능력의 감소로 요약 가능하나 협의의 ‘피로’는 주로 육체적 피로로 작업 능률이 저하되는 상태라 할 수 있다⁽⁴⁷⁾.

지구력 증진 여부에 대한 평가 방법으로 피로 도달 운동시간 측정, 주관적 운동 강도(주관적 피로도) 측정, 그리고 젖산 역치 측정법 등이 제시되어 있는데, 이는 지구력 증진과 운동수행 능력 향상이 피로 지연 및 회복과 관련되어 있기 때문이다⁽⁴⁸⁾. 즉, 운동 등으로 피로가 유발된 후 적절한 회복이 되지 않으면 만성 피로 상태가 되며, 이 상태에서는 일반적 건강 상태와 운동 능력

에 영향을 받게 된다⁽⁴⁹⁾.

항피로 능력을 나타내는 것으로는 운동에의 저항성 향상 지표가 있는데, 피로의 민감성을 감소시키는 것은 수영시간이 늘어나는 것으로 해석 가능하다⁽⁴⁹⁾. 강제수영 모델 실험의 경우 몇몇 연구자들을 통해 좀 더 신뢰성 있는 결과를 얻기 위한 실험법 변형이 있어 왔는데, 동물 체중에 일정량의 하중을 주어 수영시간을 측정하는 방법들이 개발되었다⁽⁵⁰⁾. 이런 체중부하 강제수영 모델 실험(weight-loaded forced swimming test)은 지구력 증진, 운동수행 능력 향상, 그리고 피로 강도를 측정할 때 사용된다.

운동과 에너지 대사, 피로와의 기작에 대한 연구는 많이 있는데, 그 중 운동으로 인한 피로는 ATP 부족, 대사 산물에 의한 영향 등에 대한 내용이 있다⁽⁵¹⁾. 운동을 시작하면 포도당(glucose)과 글리코겐(glycogen)과 같은 에너지 급원이 처음 사용되어지고 점차 지치게 되면서 젖산(lactate)이나 혈액요소질소(blood urea nitrogen, BUN)과 같은 대사물질이 축적이 되어 대사 조절 장애를 유발하게 된다. 특히 젖산의 경우 그 물질 자체에 의한 영향이라기보다는 젖산으로 인해 혈액의 pH가 감소되고 이로 인해 근육 단백질과 칼슘과의 결합 및 근육 수축 감소 등 체내 기관에 악영향을 미쳐 피로를 유발하게 된다⁽⁴⁹⁾. 포도당은 글리코겐 형태로 간과 근육에 저장되며, 일차적 에너지원으로 사용되는 것으로 알려져 왔다. 따라서 체내 글리코겐 저장량의 증가는 운동시 야기될 수 있는 체단백 분해 등의 부정적인 요인을 지연시킬 수 있으며, 경기력 향상 및 회복 측면에서 매우 중요하다⁽⁴⁶⁾. 당질을 주로 이용한 운동 초반기와 달리 운동 후반기에 글리코겐이 부족하게 되면 유리지방산 등의 지방의 이동이 증가하게 되는데 이때 중성지방(triglyceride)으로부터 유리지방산(free fatty acid)으로의 전환을 촉진시켜 주거나, 근육의 지방 분해 반응에 긍정적인 영향을 줄 수 있는 기능성 소재의 경우 원활한 에너지 보충을 통해 운동수행 능력에 도움을 줄 수 있다^(46,52).

근육이 운동을 하게 되면 ATP의 인산기가 탈인산화되며 에너지가 생성되는 과정으로 인해 혈중 무기인산(inorganic phosphate, Pi)의 농도가 증가하게 되어 근육의 액틴과 마이오신의 연결부위의 결합(cross-linkage) 약화를 야기하여 힘 생성능이 저하된다고 한다⁽⁵¹⁾. 빠른 ATP의 감소를 일으키는 단기간의 무산소성 근수축시 ATP의 적정치를 유지하기 위한 에너지 완충역할을 하는 생리적 물질은 크레아틴(creatine)이며, 크레아틴키나아제(creatine kinase, CK)는 ADP에서 ATP로의 전환에 영향을 미친다⁽⁵³⁾. Lactate dehydrogenase (LDH)는 무산소 상태에서 pyruvate로부터 젖산의 형성을 촉매하는 효소로서 과격한 운동을 수행할 경우 과량의 pyruvate가 형성됨에 따라 젖산의 형성이 촉진되고 pyruvate를 젖산으로 전환시키는 과정에서 LDH의 활성도가 증가한다. Citrate syntase (CS)는 tricarboxylic acid (TCA) cycle의 첫번째 단계에서 citrate를 합성하는 과정을 촉매하는 효소로 일반적으로 유산소성 운동에 의해 증가한다고 알려져 있다.

유산소 운동 중 대부분의 산소는 미토콘드리아에서 사용되지만 소량의 산소로부터는 과도한 활성산소종(superoxide radical $O_2^{\cdot-}$, hydrogen peroxide H_2O_2 , hydroxy radical $OH^{\cdot}$ 등)이 생성될 수 있는데 이 활성산소종들이 산화적 손상을 야기하게 된다⁽⁵⁴⁾. 과도한 운동을 시킨 후 electron paramagnetic resonance (EPR)를 이용하여 자유기를 측정한 실험에서, 비타민E 등 항산화제 결핍 식이를 투여했을 때와 유사한 수준으로 근육과 간에서 정상 상태에 비해 약 2-3배 증가됨이 확인된 바 있다⁽⁵⁵⁾. 이렇게 운동 중 발생한 자유기들은 체내 지질과산화 반응을 일으켜 지질과산화 산물의 생성을 증가시키고 일련의 반응을 통해 항산화 물질 및 관련 효소 활성의 감소를 초래하게 된다⁽⁵⁶⁾. 일반적으로 지구력을 향상시키는 작용 기전으로는 혈액 헤모글로빈 농도와 근육 미토콘드리아의 대사 활성, 혈관 확장 및 심근 대사의 활성화 등이 거론되어지고 있으며, 대부분 장기 운동시에 발생하는 근육내 무기인산, 크레아틴키나

아제, 젖산 등의 피로물질의 축적 억제와 에너지 대사 물질의 빠른 재생을 통해 근수축력을 회복시키는 효과를 나타낸다⁽⁵⁷⁾.

지구력 증진 효과를 포함한 항피로 소재 및 제품들의 효능 연구의 경우 우리 나라 홍삼을 대표적으로 다양한 천연물 및 생약류를 중심으로 진행되고 있다^(53,58,59,60,61,62). 또한 운동 후 적절한 영양섭취 또는 항산화제 보충은 운동으로 인해 유발되는 피로로부터 회복할 수 있는 좋은 방법이 될 수 있다^(56,63). 장기적인 운동 중의 지구력 증진 효과는 녹차추출물⁽⁵²⁾과 페룰릭산(ferulic acid)⁽⁶⁴⁾과 같은 여러 천연물의 추출물 또는 그 추출물내 함유된 항산화능을 가진 성분들의 섭취 후 관찰되기도 하였다.

1.4. 연구 배경 및 목적

안데스 고산지대 특화 작물인 마카는 페루에서 중요한 영양 공급원으로서 식품으로 사용되고 있으며 동시에 성기능 측면에서 약용식물로 전해져 내려오고 있다. 이런 마카를 주제로 한 연구는 최근 10년간 페루를 중심으로 상당히 많이 이루어지고 있는데 주로 마카 분말, 그리고 수용성 추출물 또는 용매 추출물의 다양한 임상적 효능에 대한 *in vitro*와 *in vivo* 실험들이다. 그럼에도 불구하고 현재까지 마카의 이러한 생리활성을 나타내는 기능성 물질에 대한 연구는 부족한 수준이며, 그 메커니즘 역시 밝혀져 있지 않은 상태이다. 단지 여러 효능 연구에서 일반 마카 분말이나 호화 분말보다 추출물이 더욱 효과적이었던 경우가 많았는데 이는 2차 대사산물들이 농축되어 나타난 결과로 해석해 볼 수 있었다⁽⁵⁾.

마카의 지질 추출물 및 알코올이나 헥산 추출물에서도 주목할 만한 생리활성에 대한 연구가 보고되고 있는데^(65,66,67), 특히 마카 지질 추출물의 경우 지방산과 함께 다른 식물에는 존재하지 않는 마카의 특징적인 물질인 마카마이

드가 2차 대사산물로서 함유되어 있음이 분리 동정되었다. 그러나 마카마이드 성분이 정성, 정량 분석된 마카 추출물에 대해서는 관련 기능성 연구가 거의 전무한 상태라 마카마이드가 표준화된 추출물로의 효능을 검증하기 위해 본 연구를 진행하였다.

마카에 함유된 마카마이드는 지방산과 그들의 아미드 결합 구조로 지용성 특성을 지니고 있기에 지용성 성분에 대한 선택적 추출이 가능한 초임계 유체 추출을 이용해 본 실험을 진행하였다. 초임계 추출은 일반 용매 추출과 달리 해당 용매의 C_p 이상의 조건에서 액상 상태와 유사한 밀도에 기체 상태와 유사한 침투력을 지니고 있어 추출 효율이 높은 특징이 있다. 특히 초임계 추출 용매로 가장 널리 사용되고 있는 이산화탄소의 경우 C_p 조건이 가장 낮고, 가격도 저렴하고 추출 후 회수율도 우수하여 가장 경제적인 용매로서 본 실험에서도 이산화탄소를 이용하였다.

국내에서도 식품공전과 건강기능식품공전에 원료로 사용할 수 있는 제조공정으로서 이산화탄소를 이용한 초임계 추출은 그 안전성이 이미 인정되어 사용되고 있으며 산업적 이용에의 필요성이 점차 증대되고 있는 실정이다. 그러나 마카의 경우 초임계 추출에 대한 연구 및 보고는 전무한 상태로 본 연구에서는 기존의 유기용매를 통한 복잡한 분획 및 정제가 필요하지 않은 초임계 이산화탄소 추출 방법으로 제조한 마카의 지질 추출물에서 마카마이드의 함유 여부 확인 및 정량 분석을 하고자 하였다. 본 실험에서의 목표 추출 물질인 마카마이드는 일반적 중성지질인 트리글리세라이드와 비교하였을 경우, 상대적으로 분자량이 작아 추출 효율은 높을 것으로 예상되나 현재 초임계 이산화탄소에 대한 마카마이드의 용해도(solubility)가 보고된 바가 없기 때문에 추출 온도 및 추출 압력을 조정한 실험을 진행하였다. 마카마이드 회수율이 높고 추출 수율이 높은 고품질의 마카 지용성 추출물의 생산 및 응용을 위해 실험설계법을 통한 초임계 추출의 최적 생산 조건을 도출하였다.

마카 초임계 추출물을 제조한 후에는 피로 회복, 스트레스 감소 및 활력 증진을 주요 효능으로 하는 건강식품 등에 적용하고자 지구력 증진 및 항피로 생리 활성에 대한 검증을 실시하였다. 기존에는 마카의 지구력 증진 및 항피로 효과에 대한 연구로 마카 건조 분말 또는 추출물을 투여 후 혈액내 피로 지표 물질과 지질과산화 지표를 측정한 전임상 실험^(3,68)과, 인체 임상시험에서의 운동 능력 및 체력 향상에 효과적이었다는 보고⁽⁶⁹⁾등이 있었다. 또한 마카의 항산화와 관련해서는 *in vitro* 연구로 여러 용매별 추출물에 대한 항산화 관련 효소의 활성화와 자유기 소거능 비교^(35,70), 그리고 *in vivo* 전임상 동물실험으로는 혈액이나 간에서의 지질과산화 지표와 항산화 관련 성분 및 효소 활성도 연구가 있었다⁽⁷¹⁾. 그러나 운동시 대부분의 산화 스트레스는 골격근내 미토콘드리아에서 주로 일어나는 점을 고려할 때 혈액에서의 항산화 효소의 활성화를 측정한 이전 연구 결과로는 부족함이 있다 하겠다⁽⁷²⁾. 이에 체중부하 강제수영 모델법을 통해, 마카마이드를 함유한 마카 초임계 추출물의 지구력 증진 및 항산화 효능과 관련하여 혈액과 함께 간, 근육에서의 에너지 대사, 피로 지표, 그리고 항산화 지표들에 대해 효과를 검토하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 마카 및 초임계 추출 용매

본 연구에 사용한 마카는 페루의 Junin 지방에서 재배되어 건조, 분쇄 되어 분말 형태로 수입된 것으로 추출 및 구조 분석을 위한 원료로 사용하였으며, 초임계 유체 추출에 사용한 추출 용매로는 99.9%의 순도를 갖는 식품용 이산화탄소를 사용하였다.

2.2. 초임계 이산화탄소 추출

건조 마카 분말로부터 순도가 높은 지질 성분을 제조하기 위해 압력을 300, 400, 500 bar, 온도를 40, 50, 60℃ 조건별로 변화시키면서 추출을 실시하였다. 실험에 사용된 초임계 추출장치는 아주대학교 생명공학과 연구실에서 설계 및 제작한 ‘JASCO 초임계 유체 시스템’을 이용하였으며 Fig. 3에 나타내었다. 본 설비는 이산화탄소 초임계 유체를 건조 마카 분말과 접촉시켜 마카에 함유되어 있는 마카마이드 성분을 포함한 혼합물을 추출하는 추출기와, 추출이 끝난 후 초임계 유체 속의 추출물을 분리시키는 기능을 갖는 감압분리기로 구성되어 있다. 감압분리기에서는 추출기에서 나온 초임계 유체의 압력을 낮추어 마카마이드 함유 추출물과 분리하여 얻고, 감압분리기에서 분리된 이산화탄소를 다시 회수하여 추출기로 공급하여 순환 재사용하게 된다. 초임계 추출과정을 보다 자세히 정리해보면 Fig. 3에서 보는 바와 같이, 추출기①에 원료인 건조 마카 분말을 충전하고, 열교환기⑨를 통하여 추출 조건 온도에 맞추어 가열된 초임계 이산화탄소를 추출기①의 하단부에 공급한다. 이렇게 공급된 초임계 이산화탄소 유체는 충전된 건조 마카 분말과 접촉하여 마카마이드 함유 지질 성분이 포함된 추출물과 함께 상승한 뒤 추출기 밖으로 방

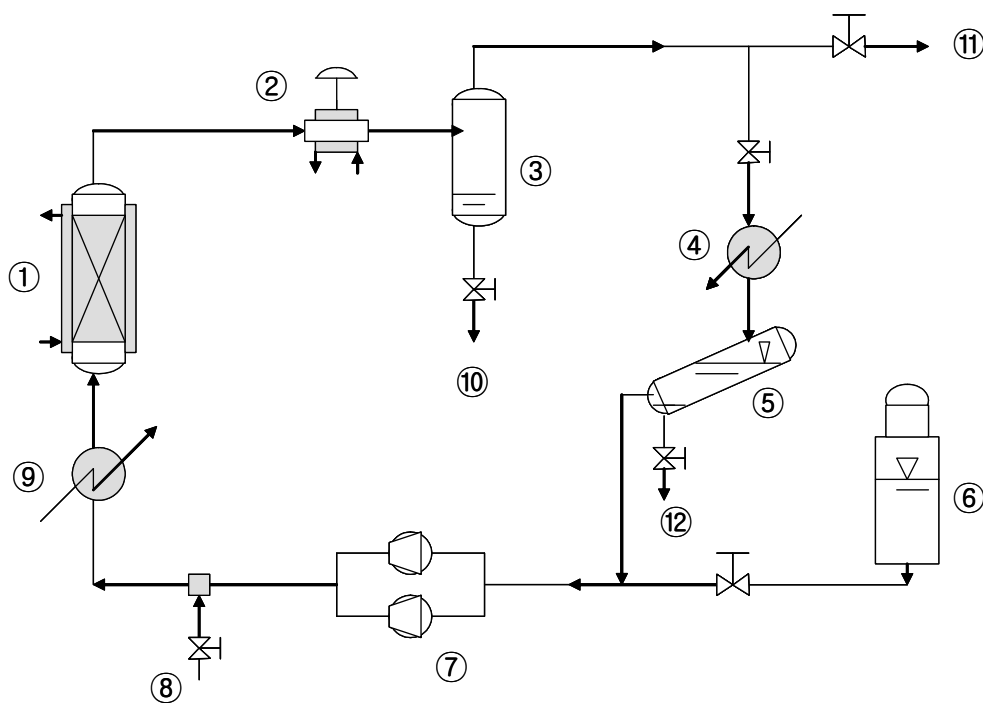


Fig. 3. Flow diagram of supercritical fluid extraction system.

- | | |
|------------------------|--------------------------------------|
| ① Extractor | ② Electronic back pressure regulator |
| ③ Separator | ④ Chiller |
| ⑤ Working tank | ⑥ CO ₂ make-up tank |
| ⑦ CO ₂ pump | ⑧ Modifier inlet |
| ⑨ Heat exchanger | ⑩ Product |
| ⑪ CO ₂ vent | ⑫ Absorbent column |

출되는데, 초임계 이산화탄소와 마카 추출물의 혼합물은 감압밸브②를 경유하며 감압되면서 감압분리기③으로 이동된다. 감압분리기③에서는 추출된 혼합물과 이산화탄소가 분리되며, 분리된 이산화탄소는 열교환기④를 통하면서 액화된 후 저장조⑤로 순환되어 재사용된다. 감압기③에서 분리된 추출물은 제품⑩으로 수거된다. 액체 이산화탄소 저장조⑥에서는 순환되어 공급되는 이산화탄소 외에 전 공정에서 발생하는 약간의 손실을 보충하도록 외부에서 이산화탄소를 보충해 준다. 저장조⑤에 저장된 이산화탄소는 펌프⑦를 통하여 가압되어 초임계 상태로 열교환기⑨를 통하여 다시 추출기에 공급된다. 보조 용매는 필요에 따라 보조 용매 주입구⑧를 통하여 공급될 수 있다. 추출기①은 2개 이상을 설치하여 다수의 공급 밸브와 다수의 배출 밸브를 조절하여 교대로 사용 가능한데, 사용하지 않는 추출기에서는 추출이 끝난 원료를 제거하고 새로운 원료를 충전하여 다음번의 추출에 대비할 수 있다.

마카로부터 고순도 지질을 추출하여 마카마이드 분리 및 구조 분석 실험에 이용한 고체 시료용 추출기는 0.5 l 용량으로 이용하였고, BPR (Max 10,000 psi, TESCO, USA)이 막히거나 감압시 온도 저하로 인한 내부 seal의 파손 현상을 방지하기 위해 30℃ 이상을 유지하여 주었다. 보조 용매는 HPLC 펌프 (PU-980, JASCO Co., Japan)를 이용하여 공급 가능한데 본 실험에서는 보조 용매를 사용하지 않았으며, 이산화탄소는 밸브에 의해 공급을 조절하였다. 추출 용매인 이산화탄소는 5 ml/min의 유량으로 일정하게 주입하였고 추출기의 충전 밀도는 0.3으로 고정하여 120분간 추출하였다. 각 조건별로 제조된 추출물은 추출된 무게를 측정하고 5 ml vial에 넣어 4℃ 냉장보관 하였다.

2.3. 마카 초임계 추출물의 마카마이드 분리 및 구조 분석

마카 초임계 지질 추출물로부터 마카마이드 성분을 분리하기 위해 Muhammad

등⁽¹⁵⁾과 McCollom 등⁽¹⁸⁾의 추출 방법을 변형하여 Fig. 4와 같은 방법으로 분리 진행하였다. 우선 마카 초임계 추출물을 물과 methylene chloride (MC)로 용매 분배한 후 MC층을 농축하였다. MC층 농축물을 실리카 오픈 컬럼(5 kg, 230-400 mesh)에 loading하여 Hex/MC/acetone 용매계로 5 l씩 용출하여 분획화하였다. 분획물로부터의 마카마이드 확인은 분석용 HPLC (Younglin instrument pump SP930D)를 이용하여 gromsil 120 ODS-5 ST 10 μ m (40 mm $\times$ 250 mm) 컬럼으로 Younglin instrument absorbance detector UV 730D로 실험하였다. 분리한 마카마이드의 구조 분석을 위한 GC-Mass는 Agilent 6890 GC system과 JEOL JMS 600 Mass system (Japan)을 사용하여 실험하였고, NMR (핵자기공명) 분광기는 Bruker Avance 500 spectrometer (Germany) 기기를 이용하여 CDCl₃ 용매에 녹여 ¹H 공명주파수 500 MHz, ¹³C 공명주파수 125 MHz에서 분석하였다.

2.4. 초임계 추출 최적화 조건 실험

마카로부터 마카마이드를 목표 성분으로 하여 최적의 추출 조건을 도출하기 위하여 실험설계법에 의해 실험하였다. 우선 추출 수율 및 목표 성분 회수율의 향상을 위해 이산화탄소 초임계 유체 추출 전 2배 용량의 주정에 12시간 침지 후 원료로 사용하였다. 1차 실험은 추출 압력(100 bar, 400 bar), 추출 온도(40℃, 80℃) 및 이산화탄소(CO₂) 투입량(10 kg, 20 kg)의 3가지 요인에 대해 요인별로 2개 수준으로 완전요인 설계법 적용하여 3요인 2수준, 중심점 2회 포함하여 총 10개 구간의 디자인으로 3반복 진행하였다(Fig. 5). 1 l 추출기에 각 200 g의 마카 건조 분말을 시료로 사용하여 추출을 진행하였고 각 조건마다의 생산 수율, 마카마이드 함량, 마카마이드 회수율을 측정값으로 얻은 후 평균값을 결과값으로 입력하여 통계 분석하였다.

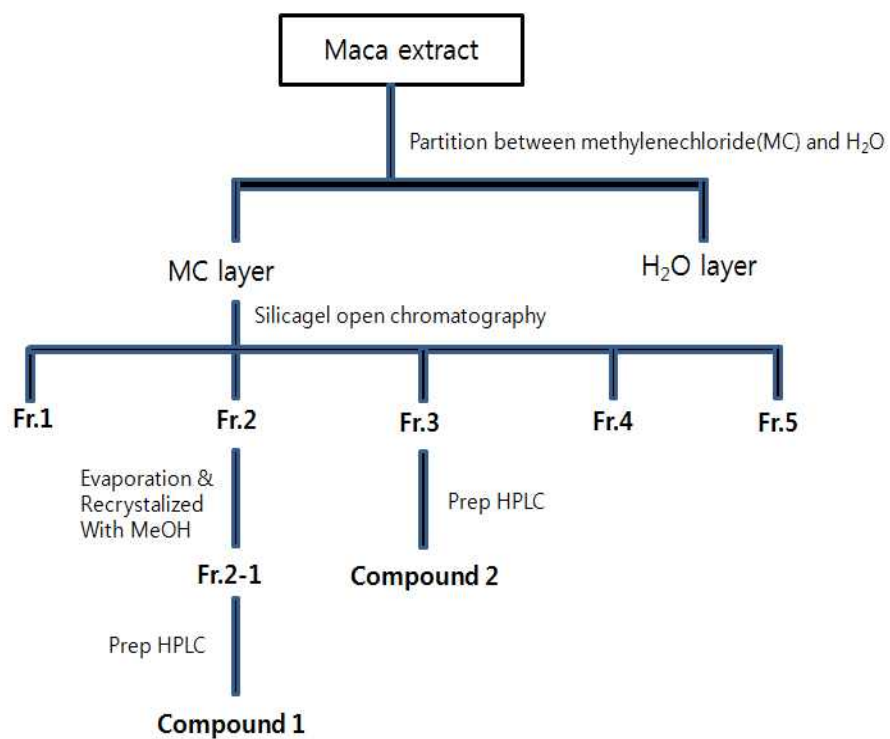


Fig. 4. Separation procedure of macamides from the scCO_2 maca extract.

이때 생산 수율은 원료 투입량을 기준으로 추출되어 나온 추출물을 70 bx로 농축한 후 측정한 중량으로 %를 단위로 나타냈으며, 마카마이드 함량은 마카 초임계 추출물 단위 중량당 *N*-benzylhexadecanamide 함량을 mg/g 단위로 나타내었다. 마카마이드 회수율은 초기 마카 건조 분말에서 분석한 마카마이드 함량을 기준으로, 추출되어 나온 마카 초임계 추출물 총량내 마카마이드 함량으로 산출하여 %를 단위로 나타내었다.

건조 마카 분말의 마카마이드 함량 분석은 30 ml 메탄올에 건조 마카 분말 1 g을 취하여 15분간 초음파추출을 실시하고 상등액만 따로 분리한 뒤 같은 조작을 2회 반복 실시하여 메탄올로 100 ml로 정용하고 0.45 μ m 필터로 여과 후 분석시료로 사용하였다. 마카 초임계 추출물 또한 메탄올에 녹여 0.45 μ m 필터로 여과 후 분석시료로 사용하였다. 마카마이드 함량 분석은 Ganzera⁽⁷³⁾의 방법을 참고하여 *N*-benzylhexadecanamide를 대상으로 Waters Breeze system (Waters, USA)으로 Waters 1525 HPLC 펌프와 Waters 2487 UV 검출기를 연결하여 분석하였다. HPLC 컬럼은 synergic MAX-RP C12 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 4 μ m, Phenomenex, USA)를 사용하였다. 이동상은 water (H₂O)와 acetonitrile (CH₃CN)에 각각 0.025% trifluoroacetic acid (TFA)를 첨가하여 사용하였으며, 이동상 용매 water와 acetonitrile의 비율을 45:55에서 5:95(%)로 40분간 선형적으로 변화시켜 분석을 실시하였다. 컬럼 온도는 40 $^{\circ}$ C, 유속은 1.0 ml/min, 검출기 UV 210 nm에서 분석 하였다. 이상의 모든 분석에 사용된 용매는 99.8% 이상의 순도를 갖는 1급 시약을 사용하였다.

2차 실험은 1차 실험에서 주요인으로 선정된 추출 압력과 추출 온도 2가지 요인으로 최적화 조건을 도출하기 위해 반응표면분석 설계법(response surface methodology, RSM)을 이용하여 실험 구간을 설정 후 측정 지표로는 생산 수율과 마카마이드 회수율을 설정하여 1차 실험때와 동일하게 측정하여 얻었다. 완전요인 및 반응표면 설계법 모두 실험 결과에 대해 미니탭 프로그램

램(ver. 16)을 통해 분산 분석과 회귀 분석 통계 및 그래프 분석 실시하였고 최종적으로 최적화 조건을 도출하였다.

2.5. 초임계 추출물 분석

페루산 건조 마카 분말, 마카 초임계 지질 추출물, 초임계 추출박, 그리고 최적화 조건에서 이산화탄소 초임계 추출 유체를 통해 얻은 마카 초임계 추출물에 대한 일반성분 분석은 식품공전⁽⁷⁴⁾의 방법에 따라 분석하였다. 조지방은 식품공전에 기재된 에테르추출법을 이용하여 무수에테르를 용매로 하여 soxhlet 추출기로 추출하여 정량하였으며, 수분 함량은 상압가열 건조법, 회분은 회화법, 조단백질은 마이크로킬달법으로 각각 분석하였다. 당류는 RI 검출기를 이용한 HPLC (Agilent 1100) 분석법으로 정량하였고 탄수화물은 수분, 조단백질, 조지방, 회분 및 당류 함량을 제한 값으로 계산하였다.

지방산의 경우 Parcerisa가 사용한 방법⁽⁷⁵⁾과 식품공전법을 변형하여 GC (Agilent 7890A)로 분석하였으며, 아미노산은 식품공전⁽⁷⁴⁾의 방법에 따라 아미노산 분석기(Agilent 1100)를 이용해 분석하였다. Phytosterol 분석은 시료를 비누화 반응시키고 불검화물을 석유에테르로 추출한 후 농축하여 1 ml chloroform으로 용해시킨다. 0.20 μ m 필터를 거친 후 10 μ l를 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m) 컬럼을 사용하여 컬럼 온도 30 $^{\circ}$ C, 이동상 water (H₂O)와 acetonitrile (CH₃CN) 비율 15:85, 유속 0.5 ml/min, 검출기 UV 208 nm 조건에서 측정하였다. 표준품으로는 시약용 β -sitosterol 과 campesterol을 사용하여 GC (Agilent 1100) 분석하였다. Total phenolic 함량은 Folin-Ciocalteu 방법에서 변형⁽⁷⁶⁾하여 측정하였고, 추출물 1 g당 mg gallic acid equivalent (GAE)로서 산출하였다.

2.6. 마카 초임계 추출물의 지구력 증진 효능 연구

2.6.1. 수영운동 부하모델을 이용한 유효용량 탐색

6주령의 Spargue-Dawley 종의 수컷 흰쥐를 (주)오리엔트바이오에서 공급받아 사용하였다. 실험기간 동안 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 10\%$ 의 사육실 환경에서 12시간 명암주기를 유지하여 사육하였다. 고형사료(Haelan Teklad Premier Laboratory Diet, Madison, WI, USA, Harlan 20185, 18.6% 단백질, 6.2% 지방, 44.2% 탄수화물)를 사용하였고 물과 식이는 자유로이 섭취하도록 하였다. 본 동물실험은 실험동물에 관한 법률(보건복지부)의 지침에 따라 사육하였다. 1주간 적응시킨 후 본 실험에 사용하였으며, 수영 능력을 고려하여 임의로 각 실험군당 15마리의 흰쥐를 한 그룹으로 나누었다. 실험군은 수영운동 대조군, 마카 초임계 추출물 투여군(30, 100, 300, 1,000 mg/kg body weight)으로 분류하였다. 실험 시료는 최적화 조건에서 추출한 마카 초임계 추출물을 일정 농도로 물에 희석하여 사용하였으며, 3주 동안 1일 1회, 매일 오전 9-10시 사이에 경구투여 하였다.

수영 능력 측정 실험에 이용된 수조는 유사 연구자들⁽⁷⁷⁾이 사용한 것에서 약간 변형하였는데, 가로 80 cm, 세로 50 cm, 높이 70 cm의 아크릴 플라스틱 육면체로 되어 있으며, 외부에 컨트롤 박스를 두어 수온($32\pm 2^{\circ}\text{C}$)과 수위(40-50 cm), 유속(6-8 l/min)이 일정하게 유지되도록 하였다(Fig. 6). 최대수영시간 측정 2일 전 동일한 수조에서 수영운동을 실시함으로써 수조 및 수영운동에 적응하도록 하였다. 실험시작 1주, 3주째 되는 날 체중의 6% 무게 추를 꼬리에 달아 수류가 있는 수조에서 탈진에 이를 때까지 강제유영시켜 수영 지속시간(최대수영시간)을 측정하였다. 1주차 최대수영시간 측정시에는 흰쥐의 두부가 물에 잠겨 7초 동안 떠오르지 못하는 시점을 탈진으로 판단하였고,

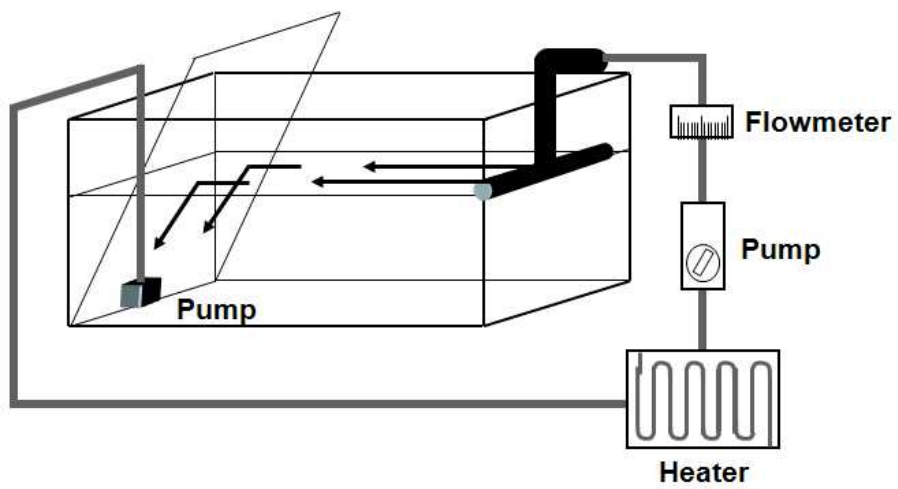


Fig. 6. Swimming pool for measurement of swimming endurance capacity.

3주차 수영시에는 탈진에 이르는 기준 시간을 10초로 설정하고 그 시점까지의 시간을 최대수영시간으로 하였다.

실험 종료 후 에틸에테르로 마취한 상태에서 복부대동맥을 통하여 동맥혈을 채혈하였으며, 1,000 g에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 -70°C 에 냉동 보관하여 혈액생화학적 분석에 이용하였다. 또한, 하지의 골격근 중 가자미근(soleus muscle)과 비복근(gastrocnemius muscle) 및 간을 각각 적출하여 액체질소를 이용하여 급속 동결시킨 후 -70°C 에서 냉동 보관하였다.

혈청 포도당과 lactate dehydrogenase (LDH)는 Kit (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA), free fatty acids (FFA)는 NEFA HR 2 kit (Wako Diagnostics, Richmond, VA, USA), 젖산 농도는 lactate assay kit (Eton Bioscience Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였고, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatine kinase (CK), creatinine, blood urea nitrogen (BUN), inorganic phosphate (Pi)는 autoanalyzer (Advia 1650, Bayer, Tokyo, Japan)로 분석하였다.

근육의 글리코겐 함량은 anthrone 시약을 이용하여 측정하였다. 약 30 mg의 냉동된 가자미근을 0.5 ml 30% potassium hydroxide (KOH) 용액에 넣어 100°C 에서 30분간 가열하여 분해한 뒤 1 ml의 에탄올을 첨가하고 냉장상태로 두어 당이 침전되도록 한다. 이를 원심분리하여 당침전물을 얻은 후 1 ml 증류수로 용해시킨다. 용해시켜 놓은 당용액에 0.2% anthrone 시약을 첨가하고 95°C 에서 20분간 가열한 뒤 냉각 후 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 포도당 표준액을 이용하여 표준곡선을 작성하여 이로부터 조직내 글리코겐 농도를 계산하였다⁽⁷⁸⁾.

근육내 에너지 대사에 관여하는 효소 활성을 측정하기 위하여 근육의 에너

지 산화능력을 알아볼 수 있는 TCA cycle내 citrate synthase (CS)와 succinate dehydrogenase (SDH) 활성을 측정하였다. 이와 더불어 산소 부족시 과량으로 발생된 pyruvate로부터 젖산 생성을 촉매하는 효소인 lactate dehydrogenase (LDH) 활성을 측정하였다. 약 100 mg의 냉동된 가자미근을 1 mM EDTA가 포함된 차가운 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)를 이용해 분쇄, 균질화하였다. 조직 균질액은 10,000 g에서 15분간 원심분리 하여 미토콘드리아 분획과 세포질 분획을 얻었고, CS와 SDH 활성은 미토콘드리아 분획에서 LDH 활성은 세포질 분획에서 측정하였다.

2.6.2. 수영운동 부하모델에서 지구력 증진 효능 검증

앞선 유효용량 결정 실험과 동일한 6주령의 Spargue-Dawley 종의 수컷 흰쥐를 1주간 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다. 실험기간동안 고형사료를 사용하였고 물과 식이는 자유로이 섭취하도록 하였다. 실험시료의 투여는 매일 오전 9-10시 사이에 경구투여 하였고, 온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$ 의 사육실 환경에서 12시간 명암주기를 유지하여 사육하였다. 실험군은 수영운동 대조군과 1차 유효용량 평가에서 대조군 대비 수영시간의 증가에서 농도 유의한 결과를 나타냈던 마카 초임계 추출물 투여군(30, 100 mg/kg body weight)으로 분류하고 각 실험군당 20마리의 흰쥐를 한 그룹으로 하여 3주 동안 1일 1회 경구투여 하였다. 수조 및 수영운동은 상기의 마카 초임계 추출물 유효용량 탐색실험시와 동일하게 진행하였다. 최대수영시간 측정은 1주째와 3주째에 실시하였고 탈진시까지의 측정시간은 2회 모두 흰쥐의 두부가 10초 동안 떠오르지 못하는 시점까지의 수영시간으로 측정하였다.

실험 종료 후 에틸에테르로 마취한 상태에서 복부대동맥을 통하여 동맥혈을 채혈하였으며, 1,000 g에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하였다. 분리한

혈청은 -70°C 에 냉동 보관하여 혈액생화학적 분석에 이용하였다. 또한, 하지의 골격근 중 가자미근(soleus muscle)과 비복근(gastrocnemius muscle) 및 간을 각각 적출하여 액체질소를 이용하여 급속 동결시킨 후 분석 시까지 -70°C 에서 냉동 보관하였다. 혈청 포도당, AST, ALT, LDH, FFA, BUN, CK, lactate, Pi와 근육의 CS, SDH, LDH, 간과 근육의 글리코젠은 유효용량 평가 실험과 동일한 방법으로 분석하였다.

간 및 근육 내 지질과산화도는 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)법을 이용하여 정량하였다. 10% (w/v) 조직 균질액 0.1 ml, 0.5 M HCl 0.4 ml, 20 mM thiobarbituric acid (TBA) 0.4 ml를 혼합하여 95°C 에서 45분간 가열 후 20분간 냉각하였다. *n*-butanol 1 ml를 가하고 30초간 잘 섞은 후 3,000 g에서 15분간 원심분리하고 520 nm에서 용매층에 대한 흡광도를 측정하였다⁽⁷⁹⁾. 그리고 total glutathione (GSH) 농도는 GSH-recycling법을 기본으로 하여 측정⁽⁸⁰⁾하였는데 조직 균질액을 5% sulfosalicylic acid와 혼합 후 원심분리하여 상층액만을 취한다. 0.4 mM NADPH가 포함된 assay mixture를 가한 후 상온에서 10분간 방치한다. 5,5' -di-thio-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 기질 용액을 가한 후 다시 상온에서 10분을 추가 방치 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA)를 이용해 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Catalase 활성은 chromogen으로서 purpald를 이용한 Johansson and Borg 방법⁽⁸¹⁾에 따라 측정하였다. 시료와 함께 100 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 reaction buffer를 제조하고, 이 reaction mixture에 H_2O_2 를 가하면서 반응을 시작한다. 상온에서 20분간 방치 후 10 M potassium hydroxide (KOH)를 가해 반응을 종결시킨다. 34.2 mM purpald를 가한 후 상온에서 다시 10분간 방치시키고 purpald와 formaldehyde와의 반응으로 만들어진 생성물을 65.2 mM potassium periodate (KIO_4)를 가해 산화시키고 550 nm에서 흡광도를 측정하

였다. 효소활성도를 계산하기 위한 표준용액으로는 formaldehyde를 사용하며 mg protein당 1분간 형성된 formaldehyde의 nmol로서 표시하였다.

Superoxide dismutase (SOD) 활성은 pyrogallol autoxidation 방법을 사용하여 측정하였다⁽⁸²⁾. 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)로 제조한 5.2 mM pyrogallol 용액과 시료를 혼합 후 420 nm에서 2분간 감소하는 흡광도를 측정하였다. 결과는 mg protein당 units으로 표시하며, SOD 1 unit은 pyrogallol autoxidation을 50% 저해하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

2.6.3. 통계 분석

본 연구에서 얻은 측정 결과는 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 으로 나타내었고 SPSS 통계 패키지 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 통계분석을 실시하였다. 이상점 검증을 통해 이상점으로 나타난 결과값은 제거한 후, 대조군 및 시료 투여군 간의 차이를 알아보기 위하여 t-test를 실시하였고, 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

3. 결과

3.1. 초임계 이산화탄소 추출을 이용한 마카 지질 추출물 제조

일반적으로 초임계 유체 추출에 있어 그 추출물의 함량 및 조성은 초임계 이산화탄소의 추출 온도 및 추출 압력에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 초임계 이산화탄소 추출을 이용하여 마카로부터 지질 순도가 높은 추출물을 얻기 위해서 우선적으로 초임계 이산화탄소의 추출 온도(40, 50, 60℃) 및 추출 압력(300, 400, 500 bar)을 단계별로 조절하여 추출을 실시하였다. 초임계 추출 조건에 따른 추출물의 조지방 함량은 Table 4에 나타내었다.

추출 압력의 경우 추출 온도 변화와 관계없이 500 bar의 추출 압력에 비해 300 bar의 낮은 추출 압력에서 추출물의 조지방 함량이 높게 나타났고, 일정한 추출 압력에서는 추출 온도 변화에 따른 조지방 함량이 40℃ 온도에서 가장 높게 나타났다. 본 실험 조건 중에서는 300 bar, 40℃ 추출 조건에서 956.4 mg으로 가장 높은 조지방 함량을 추출할 수 있는 것으로 나타났다.

건조 마카 분말과 초임계 이산화탄소 추출(300 bar, 40℃)을 이용한 마카 지질 추출물 그리고 마카 초임계 추출박에 대한 수분 함량, 조단백질 함량, 조지방 함량, 총당 함량, 회분 함량을 측정하여 그 결과를 Table 5에 나타내었다. 건조된 마카 분말과 마카 초임계 추출박의 일반성분을 비교해 보면 조지방을 제외한 나머지 성분들은 거의 그대로 유지되어 있는 것으로 확인되다. 초임계를 이용한 마카 지질 추출물의 경우에는 조지방 함량이 95.6%이고 나머지 조단백, 당류, 회분 함량은 아주 미미한 수준으로 추출물 대부분이 지질로만 구성되어 있음을 확인할 수 있었다.

Table 4. Recovery efficiency of crude fat (mg/g extract) at different extract conditions from dried maca powder

Pressure (bar)	Temperature (°C)		
	40	50	60
300	956.4	914.2	902.7
400	746.3	723.8	732.1
500	784.5	763.1	755.3

Table 5. Composition of dried maca powder, scCO₂ maca extract, and residue

	Composition (%)		
	Dried maca powder	scCO ₂ maca extract	Residue
Moisture	7.8	3.2	7.3
Crude protein	16.6	0.4	16.8
Crude lipid	0.3	95.6	ND ^a
Carbohydrate	69.7	0.0	70.2
Sugar	0.2	0.7	0.2
Ash	5.4	0.1	5.5

^a ND : not detected.

3.2. 마카 초임계 추출물의 마카마이드 분리 및 구조 분석

마카 초임계 추출물에 물과 methylenechloride (MC)로 용매 분배한 하층 MC 층 농축물을 실리카 오픈 컬럼에 loading하여 Hex/MC/Acetone 용매계로 용출 분획화한 것 중에서 fr. 2를 농축하여 용매를 완전히 제거한 후 여기에 메탄올을 넣고 가열하여 냉동고에 over night 방치하였다. 침전물 생성을 확인한 후 상등액을 따라내는 방법으로 메탄올로 5-6회 재결정을 반복하였고, prep HPLC를 사용하여 *N*-benzylhexadecanamide을 얻었다. 한편 fr. 3도 농축한 후 prep HPLC에서 정제하여 *N*-benzyl-5-oxo-6*E*,8*E*-octadecadienamide를 분리하였다.

N-Benzylhexadecanamide로 추정되는 물질은 EI-Mass 결과(Fig. 7)로부터 분자량은 345로 확인되었고, *N*-rule과 13-rule에 따라 홀수 개의 질소가 들어 있으며 분자식은 $C_{23}H_{39}NO$ 로 추정하였다. 1H -NMR에서 7.27 (5H, m, H-phenyl), 5.71 (1H, br s, NH), 4.43 (2H, d, $J=6.0$ Hz, H-1'), 2.18 (2H, t, $J=8.0$ Hz, H-2), 1.62 (2H, m, H-3), 0.86 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H-16), 1.25 (22H, overlapped, H-4~H-14)로 확인(Fig. 8)되었으며, 단 5.71 ppm의 amide N-H peak는 문헌⁽¹⁶⁾치의 chemical shift value (δ_H 6.03)와는 다소 차이가 있는데 이와 같은 protic solvent-exchangable hydrogen은 시료의 농도, 온도, impurity 농도에 따라 그 값이 일정하지 않을 수 있다. 한편 ^{13}C -NMR에서 172.9 (amide carbonyl, C-1), 138.4 (aromatic, C-2'), 128.6, 127.8, and 127.4 (aromatic $\times 5$, C-3', 4', 5', 6' and 7'), 43.5 (C-1'), 36.8 (C-2), 31.9 (C-3), 29.6~25.7 (aliphatic $\times 11$), 22.6 (C-15), and 14.0 (C-16)으로 모두 23개 탄소의 귀속이 가능하였다(Fig. 9). 따라서 Muhammad⁽¹⁵⁾의 1H - and ^{13}C -NMR 결과와 data가 동일한 것으로 판단되어 본 물질은 *N*-benzylhexadecanamide로 구조 분석되었다(Fig. 10).

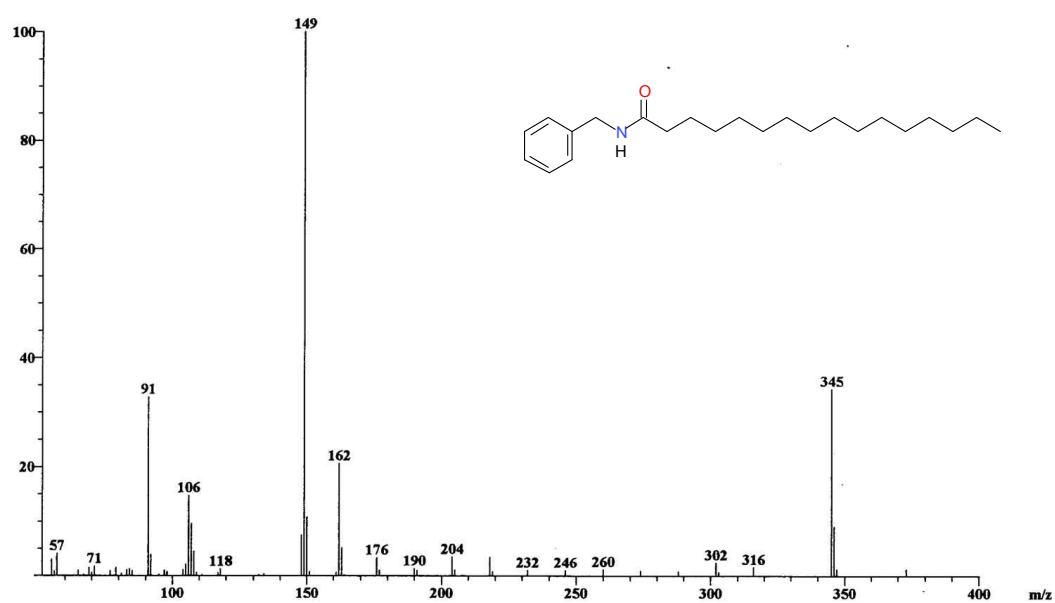


Fig. 7. GC/MS spectrum of compound 1.

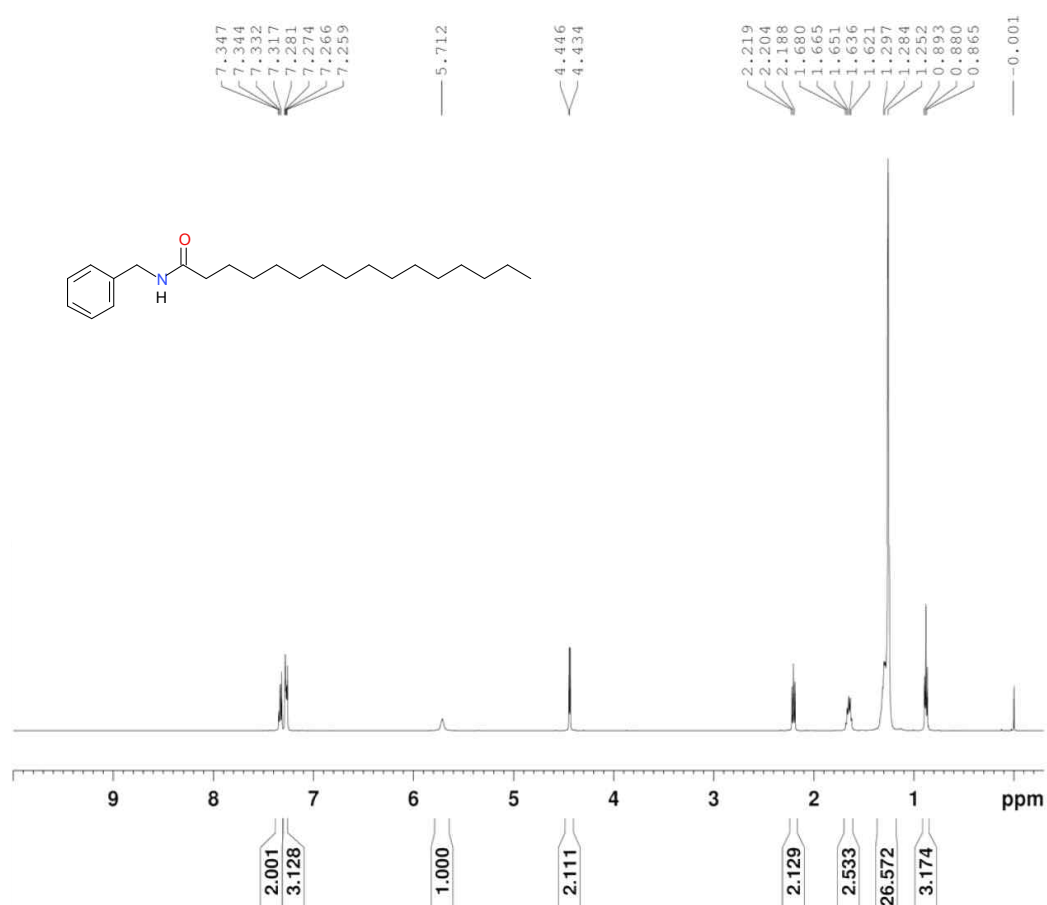


Fig. 8. ¹H-NMR spectrum of compound 1.

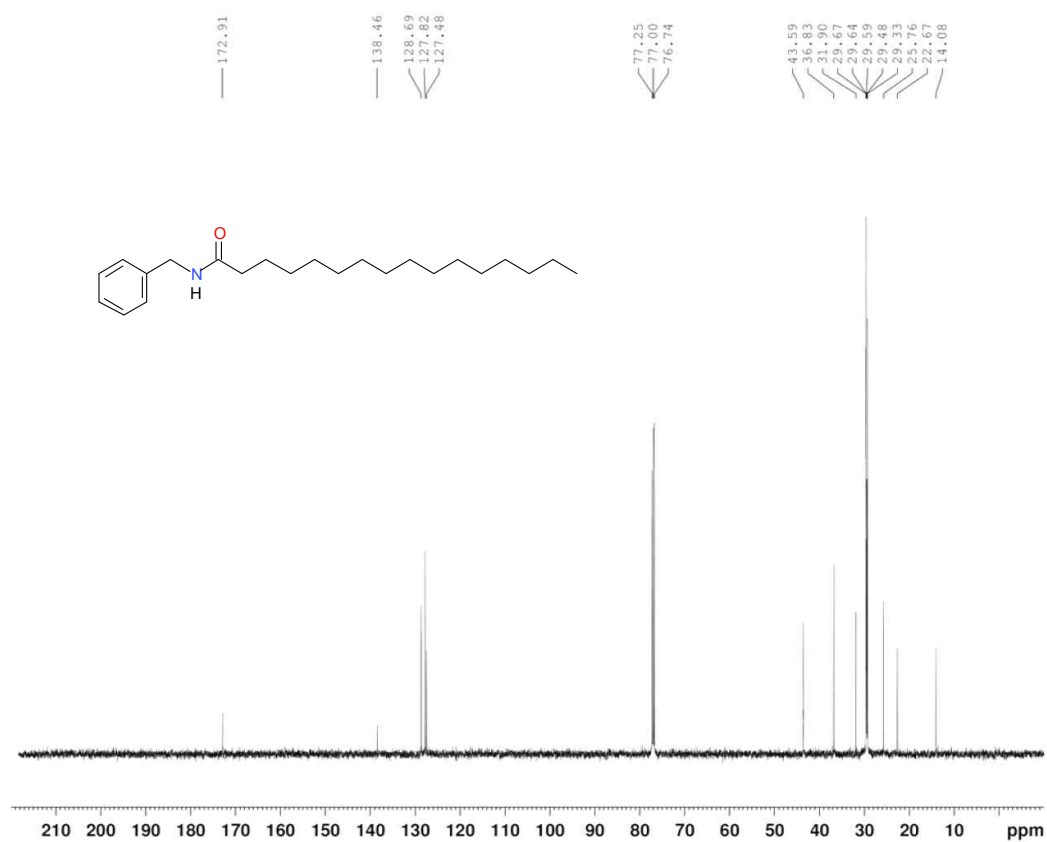


Fig. 9. ¹³C-NMR spectrum of compound 1.

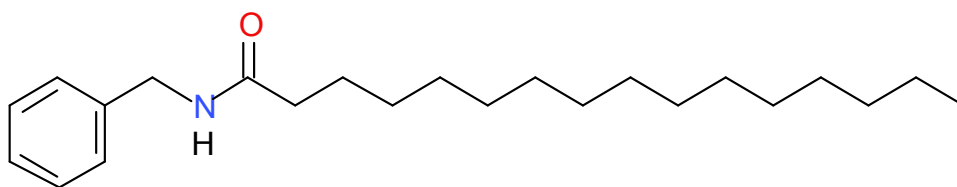


Fig. 10. Structure of *N*-benzylhexadecanamide.

N-Benzyl-5-oxo-6*E*,8*E*-octadecadienamide로 추정되는 물질은 EI-Mass 결과 (Fig. 11)로부터 분자량은 383으로 확인되었으며, *N*-rule과 13-rule에 따라 홀수개의 질소가 있으며 분자식은 $C_{25}H_{37}NO_2$ 로 추정하였다. 1H -NMR에서 7.31~7.26 (5H, aromatic and olefinic, H-3'~H-7'), 7.09 (1H, H-7), 5.78 (1H, *N*-H), 6.16 (2H, H-8, and H-9), 6.04 (1H, $J=15.5$ Hz, H-6), 4.43 (2H, $J=6.0$ Hz, H-1'), 2.50 (2H, $J=7.5$ Hz, H-4), 2.17 (4H, H-2, and H-10), 1.61 (2H, H-3), 1.43~1.29 (14H, H-11~H-17), 0.87 (3H, $J=4.5$ Hz, H-18)의 결과를 얻어(Fig. 12) 문헌과 일치하였다. ^{13}C -NMR에서 201.0 (ketonyl carbon, C-5), 172.8 (amide carbonyl, C-1), 145.7 (C-9), 142.9 (C-7), 138.4 (C-2'), 128.8~127.4 (aromatic and olefinic $\times 6$, C-6, C-3'~C-7'), 43.5 (C-1'), 40.4 (C-4), 36.7 (C-2), 33.0 (C-10), 31.3~25.6 (aliphatic $\times 7$), 24.2 (C-3), 22.4 (C-17), 13.9 (C-18)로 25개 탄소가 귀속되었다(Fig. 13). 따라서 본 물질은 *N*-benzyl-5-oxo-6*E*,8*E*-octadecadienamide로 구조 분석되었다(Fig. 14).

3.3. 초임계 추출 최적화 조건

첫 번째 초임계 추출 공정 실험에서는 추출 온도와 추출 압력, 그리고 추출 시간을 결정하는 용매 투입량 이렇게 총 3가지 요인에 대해 각각 2개의 수준으로 진행하였다. 미니탭 프로그램에서 3요인 2수준 중심점 포함 완전요인 실험을 디자인하였고, 총 10개 실험구간에 대해 구간별로 3반복 추출 실험을 진행한 후 결과값으로 생산 수율, 마카마이드 함량, 마카마이드 회수율에 대해 평균값을 결과값(Table 6)으로 입력 후 통계 분석하였다.

생산 수율에 대한 분산 분석 결과는 추출 온도($p=0.019$)와 추출 압력($p=0.021$) 2가지 요인에서만 $p<0.05$ 이하의 값을 나타내 유의적 영향을 주었

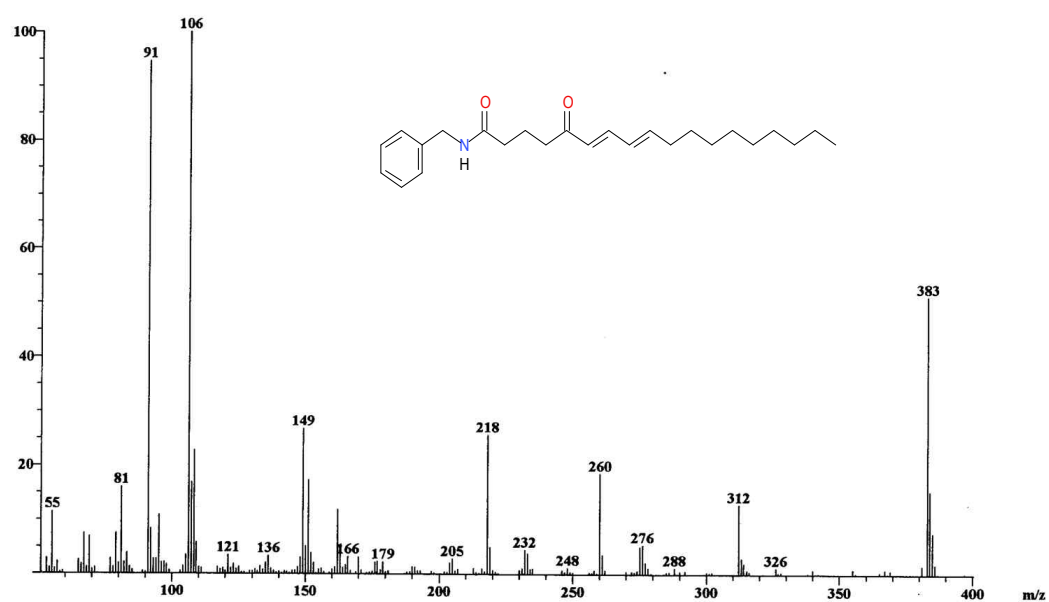


Fig. 11. GC/MS spectrum of compound 2.

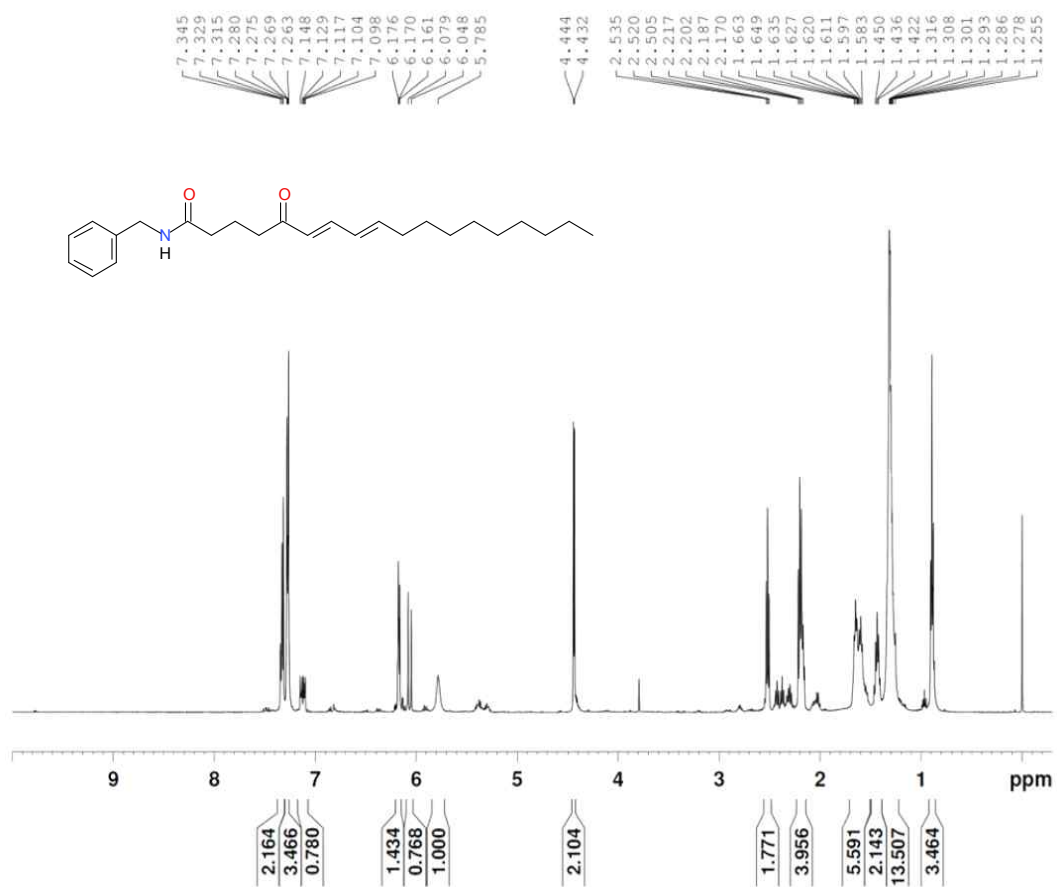


Fig. 12. ¹H-NMR spectrum of compound 2.

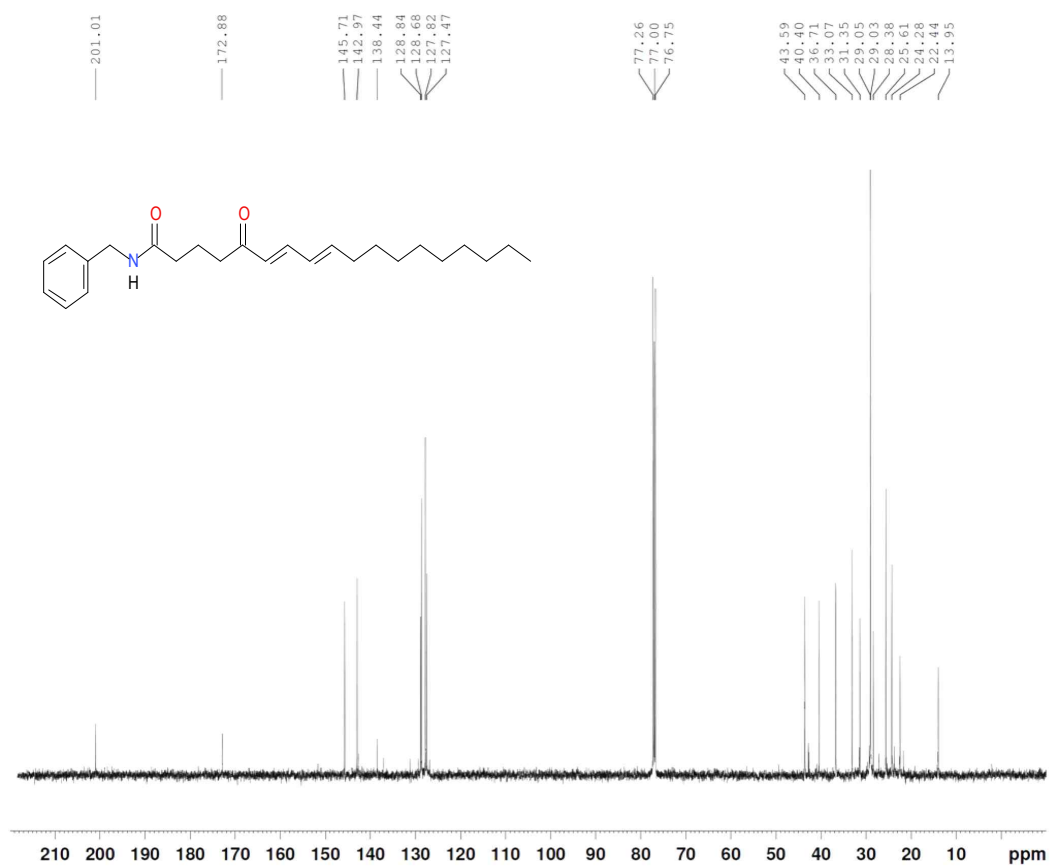


Fig. 13. ¹³C-NMR spectrum of compound 2.

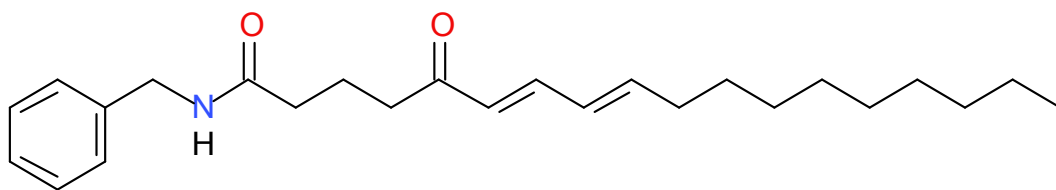


Fig. 14. Structure of *N*-benzyl-5-oxo-6*E*,8*E*-octadecadienamide.

Table 6. Yield, content of macamide, and recovery of macamide at 2³ full factorial design^a

Run order	Temp. (°C)	Pressure (bar)	CO ₂ amount (kg)	Yield (%)	Content of macamide (mg/g)	Recovery of macamide (%)
1	80	100	10	9.3	3.5	83.5
2	80	100	20	9.3	3.6	85.8
3	80	300	10	7.6	4.3	83.8
4	80	300	20	7.5	4.4	84.6
5	60	200	15	7.1	4.9	89.2
6	60	200	15	7.0	5.0	89.7
7	40	300	10	6.1	5.2	81.3
8	40	300	20	6.0	5.3	81.5
9	40	100	10	7.4	5.0	94.9
10	40	100	20	7.4	5.1	96.8

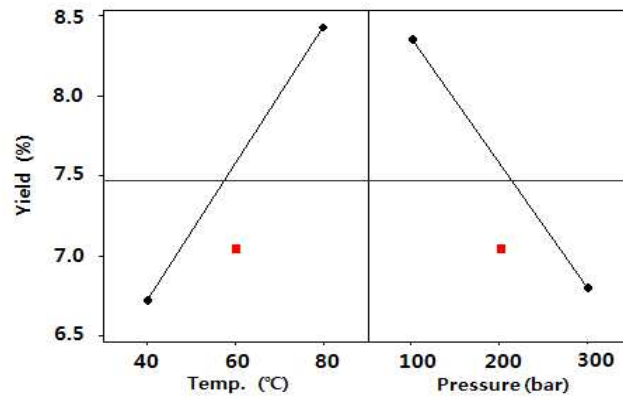
^a Values of yield, content of macamide, and recovery of macamide are the mean from 3 lots.

고, 이산화탄소 용매량 및 요인들간의 상호작용에 대해서는 영향이 없음을 확인하였다. 마카마이드 함량의 경우 추출 온도($p=0.027$)에 대해서만 유의적 영향이 있었고, 마카마이드 회수율은 추출 온도($p=0.038$), 추출 압력($p=0.021$), 추출 온도와 추출 압력과의 교호작용($p=0.023$) 요인 모두가 주효과로 분석되었다. 회귀 분석 결과식은 유의적 결과를 보인 요인만을 대상으로 간단히 정리해보면 $yield=5.9+0.0525Temp.-0.004pressure$, $macamide=6.6-0.045Temp.$, $recovery=117.6-0.46625Temp.-0.128pressure+0.0017125Temp.\times pressure$ 와 같이 나타났다. 생산 수율, 마카마이드 함량 그리고 마카마이드 회수율 각각에 대해 추출 온도와 추출 압력 요인에 대한 주효과 분석 그래프는 Fig. 15와 같다.

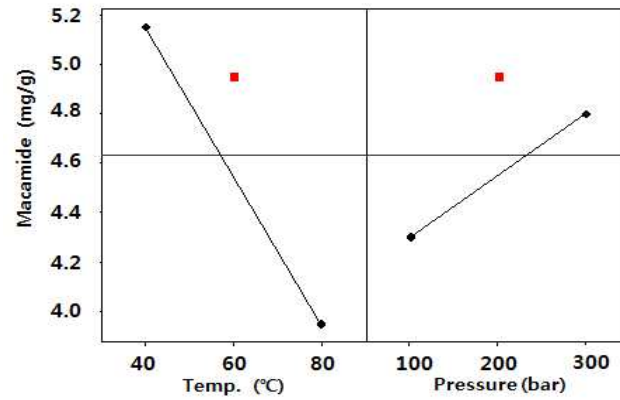
이상의 실험 결과를 분석해 보면, 추출 압력이 일정할 때 추출 온도가 증가함에 따라 용해할 물질에 대한 용해 능력도 감소하기에 추출 온도가 증가하면 추출 수율은 증가하나 마카마이드 함량이 감소하고, 추출 압력이 증가되면 수율은 감소하나 마카마이드 함량은 증가하는 반비례적 관계가 있음을 알 수 있었다. 또한 추출 온도와 추출 압력 요인에서 곡선성이 있음을 확인하였고, 각 3가지 항목에 대한 3D 표면도 그래프는 Fig. 16과 같다. 마지막으로 완전요인 설계법에서의 최적화 도구를 분석하면 추출 온도는 40.4℃, 추출 압력은 100 bar 조건으로 최적 조건이 도출되는데 이때의 d값(만족도, desirability)은 수율 항목이 0.48, 마카마이드 함량 항목이 0.84, 마카마이드 회수율 항목은 0.98로 나타났으며, 3개 d값의 기하 평균값인 전체 D값은 0.74로 나타났다.

첫 번째 실험설계법 실험을 통해 주요인이 추출 온도와 추출 압력으로 나타남에 따라 두 번째 실험으로 2요인 2수준 반응표면분석 설계법(RSM) 실험법을 진행하였다. 해당 설계에서는 총 13개 구간으로 디자인되나 60℃, 58.6 bar 조건은 초임계 상태가 아닌 조건이기에 이 구간을 제외한 12개 구간으로 설계 조정하여 Table 7과 같이 생산 수율과 마카마이드 회수율 값 결과를 얻었다.

(A)



(B)



(C)

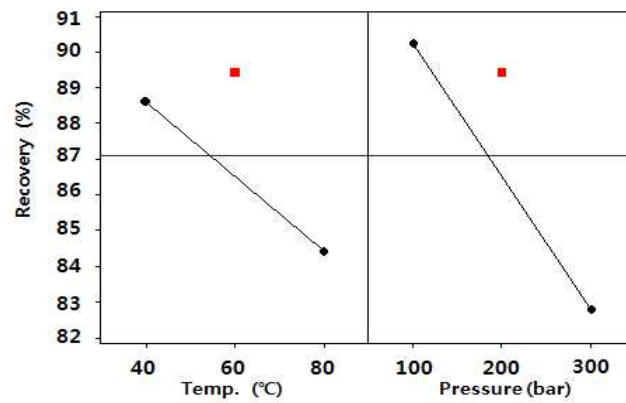
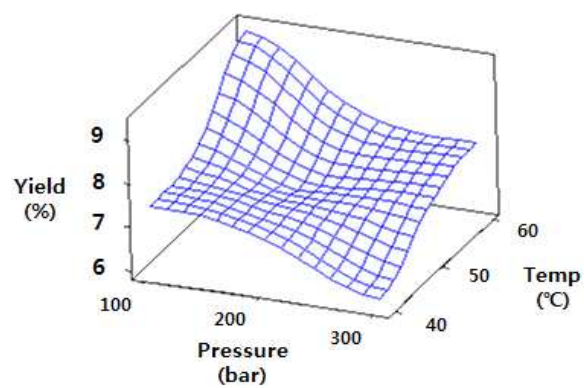
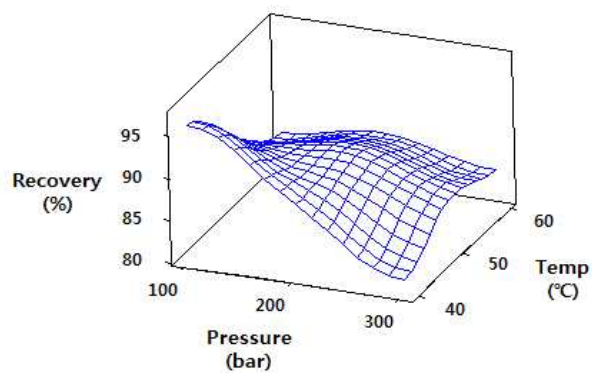


Fig. 15. Main effect plots of yield (A), content of macamide (B), and recovery of macamide (C).

(A)



(B)



(C)

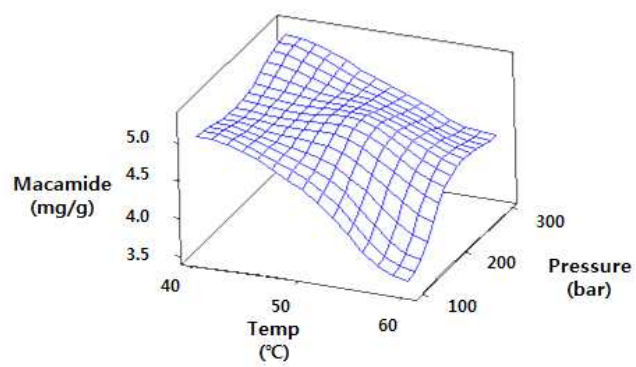


Fig. 16. Response surface plots of yield (A), recovery of macamide (B), and content of macamide (C).

Table 7. Design of RSM for yield and recovery of macamide

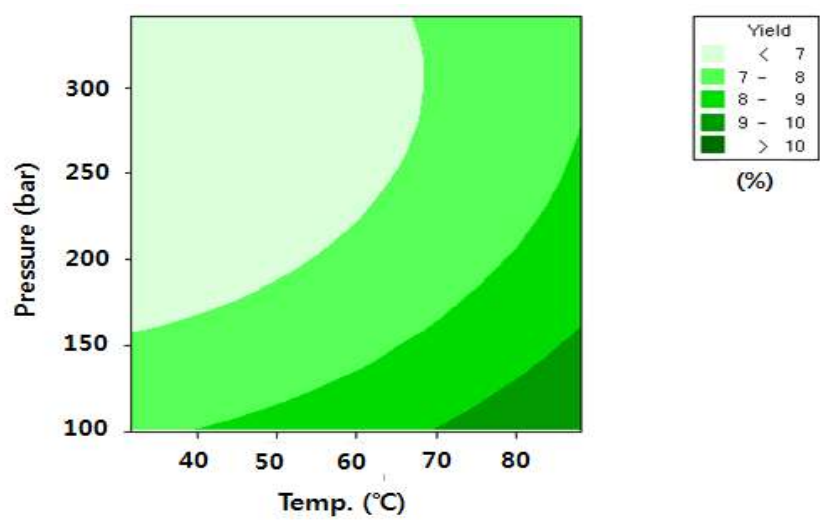
Run order	Temp. (°C)	Pressure (bar)	Yield (%)	Recovery of macamide (%)
1	60	200	7.20	86.7
2	60	341.4	6.60	83.3
3	60	200	7.15	87.0
4	80	100	9.80	83.3
5	40	300	8.10	81.3
6	31.7	200	6.80	89.2
7	60	200	7.25	86.5
8	60	200	7.22	87.0
9	80	300	7.90	83.9
10	88.3	200	8.10	81.5
11	40	100	7.80	94.3
12	60	200	7.13	87.5

얻은 결과를 바탕으로 통계 분석을 진행하여 생산 수율에 대한 추출 온도와 추출 압력의 등고선 플롯, 마카마이드 회수율에 대한 추출 온도와 추출 압력의 등고선 플롯을 얻었다. 1차 완전요인 실험법의 결과와 유사하게 생산 수율의 경우 온도가 높고 압력이 낮을수록 높게 나타났고, 마카마이드 회수율은 온도가 낮고 압력도 낮은 부분에서 가장 높은 값이 나타남을 확인하였다(Fig. 17). 회귀 분석 결과식은 $yield=10.0587-0.0106897Temp.-0.0264903pressure+0.000424418(Temp.)^2+0.0000460698(pressure)^2-0.000025Temp.\times pressure$, $recovery=111.862-0.181207Temp.-0.129615pressure-0.00232793(Temp.)^2-0.00000364845(pressure)^2+0.0017Temp.\times pressure$ 로 나타났다. 중첩 등고선도(Fig. 18) 및 최적화 도구를 통해 도출된 최적 조건은 추출 온도 38.6℃, 추출 압력 100 bar로 1차 완전요인 실험법과 유사한 조건이었고, 0.99의 D값을 얻었다.

3.4. 마카 초임계 추출물 성분 분석

최적화 조건에서의 초임계 추출을 적용하여 얻은 마카 지질 추출물은 일반 성분 항목별로 수분 29.7%, 지방 10.8%, 단백질 11.8%, 당류 5.2%, 회분 0%로 분석되었고 이로부터 탄수화물 47.7%값과 열량 340 kcal값을 얻었다(Table 8). 앞선 일반 건조 마카 분말과 고순도 지질 추출물과 결과를 비교해 보면 마카 초임계 추출물이 단백질, 지방, 탄수화물 함량에서 중간 수준의 결과를 보였고, 회분의 경우 이산화탄소 초임계 추출 공정에서는 용해도가 낮아 추출되지 않는다고 알려진 것과 동일한 결과를 보였다. 그리고 본 연구에서 추출 목적 성분이었던 마카마이드 함량은 4개 batch 평균값이 *N*-benzylhexadecanamide 4.77 mg/g, *N*-benzyl-5-oxo-6*E*,8*E*-octadecadienamide 3.09 mg/g으로, 2가지 마카마이드 합은 7.86 mg/g로 확인되어(Table 9), 이 또한 건조 마카 분말(0.423 mg/g)보다는 높고 고순도 지질 추출물보다는 낮은 수준을 보였다.

(A)



(B)

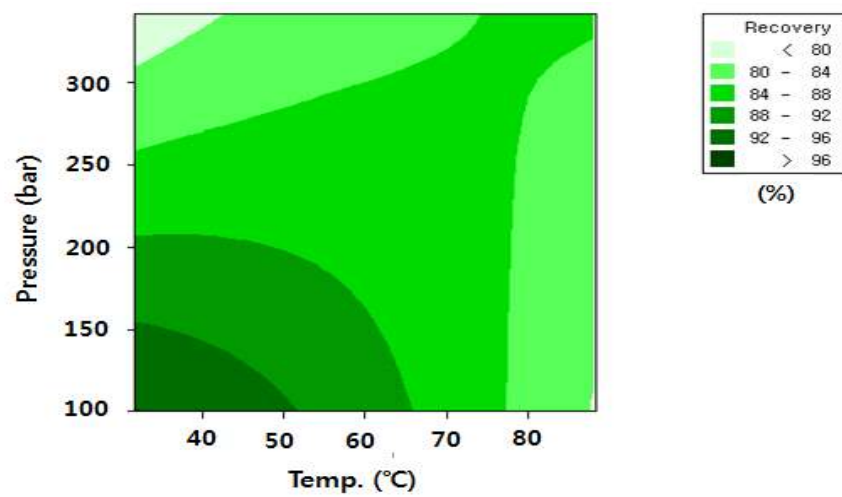


Fig. 17. Contour plots of yield (A) and recovery of macamide (B).

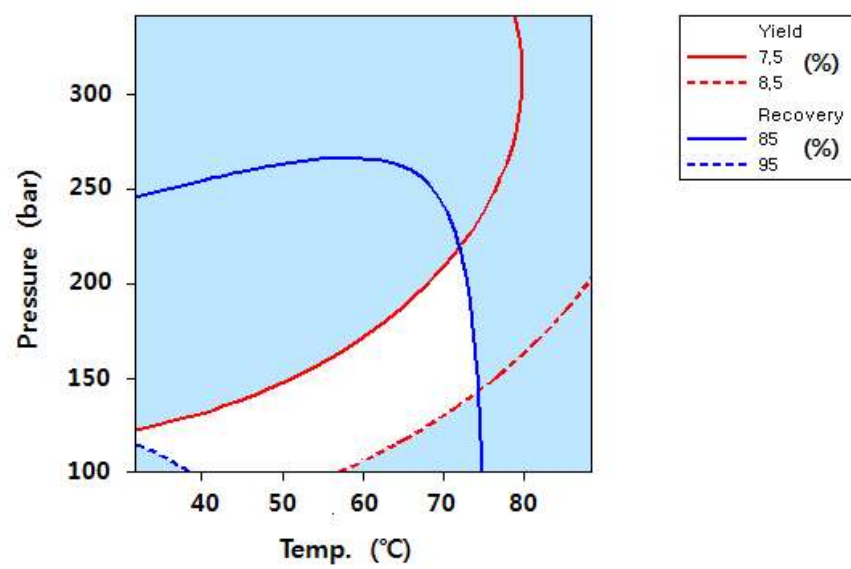


Fig. 18. A contour plot of yield and recovery of macamide.

Table 8. Composition of scCO₂ maca extract at optimized condition

	Composition
Calorie (Kcal)	340
Moisture (%)	29.7
Carbohydrate (%)	47.7
Sugar (%)	5.2
Protein (%)	11.8
Lipid (%)	10.8
Ash (%)	0

Table 9. Amounts of macamides in scCO₂ maca extract at optimized condition

Macamides	Content ^a (mg/g)
<i>N</i> -Benzylhexadecanamide	4.77±0.35
<i>N</i> -Benzyl-5-oxo-6 <i>E</i> ,8 <i>E</i> -octadecadienamide	3.09±0.16
Total	7.86±0.36

^a Values are expressed as mean±SEM.

지방산의 경우 linoleic acid 3.55%, palmitic acid 2.58%, oleic acid 1.85%, linolenic acid 1.75% 등 4개의 지방산이 가장 많은 부분을 차지하였고 전체적으로 봤을 때 불포화 지방산 7.52% (전체 지방산 기준으로는 69%), 포화 지방산 3.13% (29%), 트랜스 지방산이 0.14% (1%)로 구성되어져 있었다. 일반적인 건조 마카에서의 지방산 조성은 전체 지방 중 불포화 지방산 52.7%, 포화 지방산 40.1%의 구성에 linoleic acid, palmitic acid 그리고 oleic acid가 가장 많은 지방산으로 보고되고 있다⁽⁵⁾. 초임계 추출을 통해 지용성 성분이 주로 추출되었기에 건조 마카와 마카 초임계 추출물간에는 유사한 패턴을 보이고 있으며, 불포화 지방산의 구성비가 소폭 상승한 것을 확인할 수 있었다(Table 10).

아미노산은 총 1.2%로 분석되었는데 개별 아미노산의 조성을 살펴보면 glutamate 267 mg, valine 190 mg, alanine 123.9 mg순으로 가장 많고, 일반적인 건조 마카 분말에서의 아미노산 조성과는 약간 차이를 보였다. 또한 BCAA의 구성비는 총 아미노산의 약 30%로 증가함을 알 수 있었다(Table 11). Phytosterol은 β -sitosterol 5.67 mg/g, campesterol 1.4 mg/g으로 각각 분석되어 총 7.07 mg/g으로 확인되었으며(Table 12), total phenolic compound는 26.5 mg/g으로 정량되었다.

3.5. 수영운동 부하모델을 이용한 유효용량 탐색

마카 초임계 추출물을 각각 0, 30, 100, 300, 1,000 mg/kg 투여한 뒤 실험 7일째와 21일째 탈진시까지의 수영시간을 측정한 결과를 Fig. 19에 나타내었다. 30 및 100 mg/kg의 마카 초임계 추출물을 투여 받은 그룹에서 대조군에 비해 최대수영시간이 증가되었고, 그 이상 300, 1,000 mg/kg 농도를 투여 받은 그룹에서는 대조군과 유사한 수영시간을 나타냈다. 특히 마카 초임계 추출

Table 10. Fatty acids composition of scCO₂ maca extract at optimized condition

Fatty acids	Content(%)	Fatty acids	Content(%)	Fatty acid	Content(%)
C14:1	ND ^a	C4:0	ND	C18:1(t)	0.024
C15:1	ND	C6:0	ND	C18:2(t)	0.066
C16:1	0.072	C8:0	ND	C18:3(t)	0.050
C17:1	ND	C10:0	ND		
C18:1	1.850	C11:0	ND		
C18:2	3.546	C12:0	0.005		
C18:3(γ)	0.031	C13:0	ND		
C18:3(α)	1.723	C14:0	0.016		
C20:1	0.039	C15:0	ND		
C20:2	0.015	C16:0	2.578		
C20:3(ω6)	ND	C17:0	ND		
C20:3(ω3)	ND	C18:0	0.316		
C20:4	0.018	C20:0	0.062		
C20:5	0.018	C21:0	ND		
C22:1	0.008	C22:0	0.064	C24:1	0.128
C22:2	0.055	C23:0	ND		
C22:6	0.020	C24:0	0.088		
C24:1	0.128				
Unsaturated fatty acids	7.523	Saturated fatty acids	3.128	Trans fatty acid	0.139

^a ND : not detected.

Table 11. Composition of amino acids of scCO₂ maca extract at optimized condition

Amino acids	Content (mg/100g)
Aspartate	29.1
Glutamate	267.0
Serine	27.6
Histidine	ND ^b
Glycine	52.7
Threonine	56.3
Arginine	72.3
Alanine	123.9
Tyrosine	20.7
Cystine	23.1
Valin ^a	190.0
Methionine	20.4
Phenylalanine	56.2
Isoleucine ^a	67.0
Leucine ^a	99.4
Lysine	26.8
Proline	67.0

^a Valine, isoleucine, and leucine are the BCAA (branched chain amino acid).

^b ND : not detected.

Table 12. Phytosterol content of scCO₂ maca extract at optimized condition

Phytosterol	Content (mg/g)
β-Sitosterol	5.67
Campesterol	1.40
Total	7.07

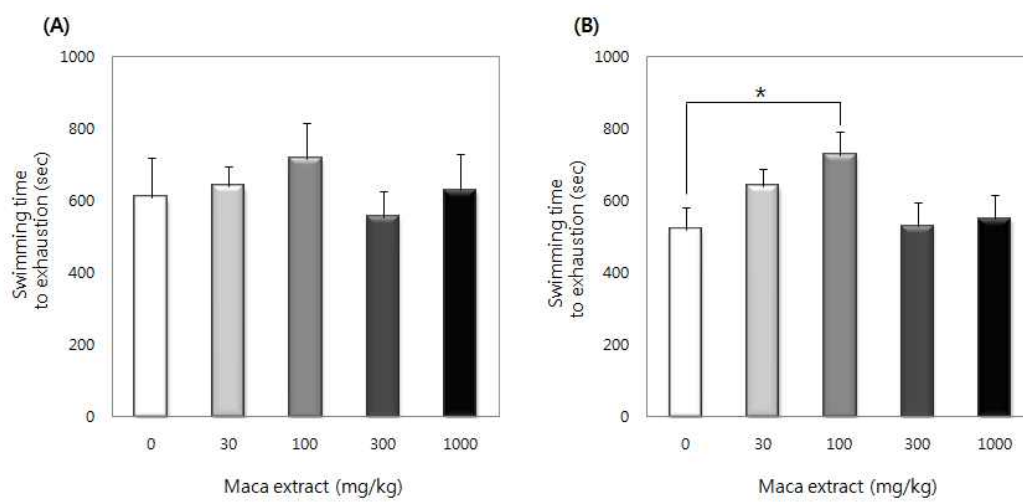


Fig. 19. Swimming time to exhaustion on day 7 (A) and day 21 (B) in rats fed with scCO₂ maca extract (mean±SEM, n=13-14/group).
* $p < 0.05$ compared to the control at that point in time.

물 100 mg/kg을 3주 동안 투여 받은 경우 최대수영시간이 대조군보다 약 40% 증가하였다(519.1 ± 63.3 vs 726.2 ± 64.4). 3주 동안 마카 초임계 추출물의 섭취는 실험동물의 체중, 간, 비복근 및 가자미근 무게에 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Table 13).

마카 초임계 추출물의 보충이 최대수영시간 측정 후의 혈액생화학적 지표에 미치는 영향은 Table 14에 나타내었다. 간독성의 지표가 되는 혈청 AST 및 ALT 수준은 마카 초임계 추출물 보충에 따른 유의적인 영향을 받지 않아 본 실험에 사용된 마카 초임계 추출물 1,000 mg/kg 농도까지는 간독성은 발생되지 않는 것으로 확인되었다. 혈액 중 에너지원인 혈청 포도당 및 유리지방산 함량에서도 수영운동 및 마카 초임계 추출물 보충에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. LDH와 CK는 근육에 풍부하게 존재하는 효소로서 특히 고강도의 무산소성 운동시 빠르게 에너지를 생성하는데 관여하나, 근육 피로 및 근육 세포 파괴시 혈액으로 유리되어 수치가 상승하게 된다. 본 실험에서는 혈청 LDH 활성의 경우 마카 초임계 추출물 100-1,000 mg/kg 투여군에서는 대조군과 차이가 나타나지 않았으나 30 mg/kg 투여군의 경우 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, 혈청 CK에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

또 다른 피로 지표인 Pi는 운동 중인 근육에서 근수축을 위한 에너지 공급원으로 ATP가 분해되면서 다량 발생하여 혈중 Pi 농도가 급격히 증가하게 된다. Pi가 증가되면 근섬유의 결합이 약화되면서 힘 생성을 저하시키는 것으로 알려져 있다. 수영지속시간이 길었던 그룹의 경우 운동량 증가에 따라 혈중 LDH, CK, lactate, Pi의 증가가 예상되었으나 100 mg/kg 보충군의 경우 수영지속시간이 대조군에 비해 40%나 증가했음에도 불구하고 혈청의 LDH, CK, lactate, Pi 수준은 대조군과 차이가 없었다.

근육에서의 저장 에너지원인 글리코겐 함량 및 근육 내 여러 가지 에너지 대사 관련 효소의 활성 변화는 Table 15에 나타내었다. 근육의 저장 에너지원

Table 13. Effect of scCO₂ maca extract on body weight and organ weights in forced swimming rats

	Control	Maca extract ^a (mg/kg)			
		30	100	300	1000
Body weight (g)	334.4±5.1	334.8±2.7	337.0±6.2	336.7±4.3	327.2±5.3
Liver (g/BW kg)	38.04±0.50	38.35±0.63	39.05±0.85	37.72±0.76	38.97±0.91
Gastrocnemius L (g/BW kg)	6.32±0.09	6.31±0.09	6.30±0.09	6.40±0.11	6.24±0.07
Gastrocnemius R (g/BW kg)	6.28±0.09	6.11±0.13	6.21±0.10	6.30±0.09	6.13±0.07
Soleus L (g/BW kg)	0.46±0.02	0.45±0.02	0.46±0.02	0.45±0.02	0.44±0.01
Soleus R (g/BW kg)	0.45±0.02	0.45±0.01	0.46±0.02	0.46±0.02	0.43±0.01

^a Values are expressed as mean±SEM (n=13-14/group).

Table 14. Effect of scCO₂ maca extract on serum biochemical parameters in forced swimming rats

	Control	Maca extract ^a (mg/kg)			
		30	100	300	1000
AST (U/l)	96.7±3.1	94.0±3.6	101.6±2.7	96.5±2.9	92.4±2.6
ALT (U/l)	53.7±2.4	50.9±2.7	55.3±1.9	56.2±1.8	54.2±2.3
LDH (U/l)	363±27	496±52*	399±29	376±25	397±22
CK (U/l)	264±14	259±11	276±10	268±15	248±8
Creatinine (mg/dl)	0.62±0.01	0.61±0.01	0.60±0.00	0.62±0.01	0.64±0.01
BUN (mg/dl)	18.0±0.7	18.1±0.7	17.9±0.7	17.0±0.6	17.5±0.5
Glucose (mg/dl)	229±13	252±6	256±7	235±10	254±9
FFA (μEq/l)	339±19	302±20	366±25	308±23	378±24
Lactate (mM/l)	20.1±0.9	17.9±1.0	18.1±0.9	19.9±1.5	19.9±1.4
Pi (mg/dl)	14.6±0.5	14.3±0.3	14.6±0.4	14.8±0.5	14.5±0.4

^a Values are expressed as mean±SEM (n=13-14/group). * $p<0.05$ compared to the control.

Table 15. Effect of scCO₂ maca extract on glycogen and enzyme activities in skeletal muscle of forced swimming rats

	Control	Maca extract ^a (mg/kg)			
		30	100	300	1000
Glycogen ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue)	2.50 ± 0.18	2.38 ± 0.21	2.43 ± 0.16	2.44 ± 0.12	2.23 ± 0.27
LDH ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	2.48 ± 0.07	2.52 ± 0.09	2.47 ± 0.06	2.48 ± 0.005	2.64 ± 0.07
CS ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	0.115 ± 0.006	0.117 ± 0.007	0.119 ± 0.008	0.115 ± 0.007	0.118 ± 0.005
SDH ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	0.239 ± 0.010	0.247 ± 0.010	0.240 ± 0.005	0.235 ± 0.009	0.239 ± 0.006

^a Values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=13-14/group).

인 글리코겐 함량에서도 100 mg/kg 마카 초임계 추출물 투여군은 대조군과 차이가 없어 운동시간이 증가되었음에도 근육의 글리코겐 고갈 수준은 대조군과 유사한 것으로 보였다. 근육 내 에너지 대사 관련 효소인 LDH, CS 및 SDH 활성에서도 마카 초임계 추출물 보충에 따른 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 이상의 결과에서 마카 초임계 추출물의 유효 용량을 30-100 mg/kg 구간으로 설정하여 2차 확인 실험을 진행하였다.

3.6. 수영운동 부하모델에서 지구력 증진 효능 검증

마카 초임계 추출물을 각각 0, 30, 100 mg/kg 투여한 뒤 실험시작 7일째와 21일째 탈진시까지의 수영시간을 측정한 결과를 Fig. 20에 나타내었다. 30 mg/kg의 마카 초임계 추출물을 투여 받은 그룹은 7일째와 21일째 모두 대조군에 비해 최대수영시간이 증가되었다. 100 mg/kg을 투여받은 그룹은 7일째에는 수영시간의 증가가 나타나지 않았으나 실험시작 21일째에는 최대수영시간이 대조군보다 유의적으로 약 41% 증가하여 유효용량 평가시험과 유사한 결과를 나타내었다(444.1 ± 46.6 vs 625.3 ± 71.1). 3주 동안의 마카 초임계 추출물 섭취는 체중, 간, 비복근 및 가자미근 무게에 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Table 16, Fig. 21).

마카 초임계 추출물의 보충이 최대수영시간 측정 후의 혈액생화학적 지표에 미치는 영향을 Table 17에 나타내었다. 간독성의 지표가 되는 혈청 AST 및 ALT 수준은 마카 초임계 추출물 보충에 따른 유의적인 영향을 받지 않아 유효용량 평가에서와 같이 마카 초임계 추출물의 투여로 인한 간독성은 발생되지 않는 것으로 확인하였다. 100 mg/kg 마카 초임계 추출물 투여군의 경우 수영시간이 유의적으로 증가했음에도 에너지원인 포도당과 유리지방산, 피로 지표 물질인 혈청 젖산과 Pi 수준이 대조군과 유사하게 나타났다. 그러나 LDH의 경

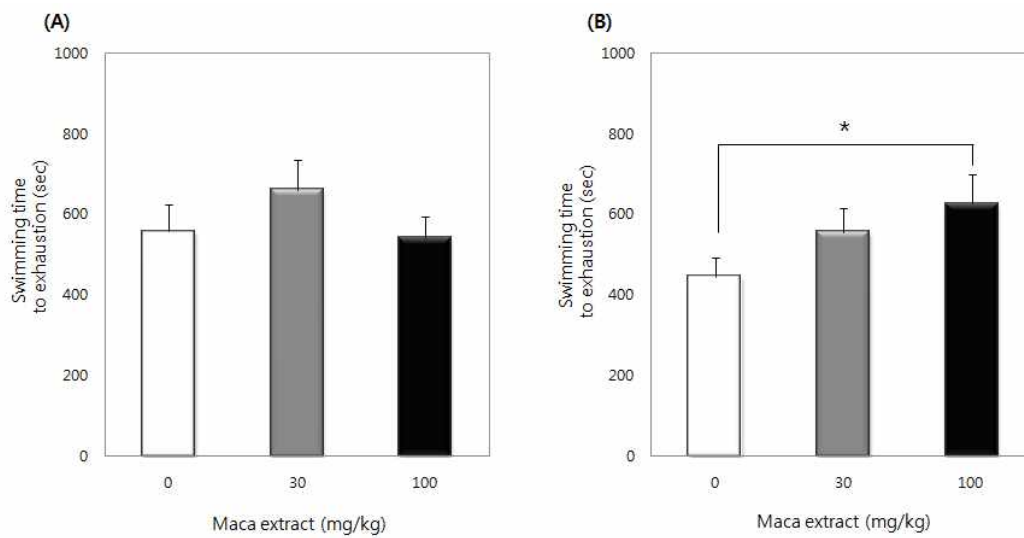


Fig. 20. Swimming time to exhaustion on day 7 (A) and day 21 (B) in rats fed with scCO₂ maca extract (mean±SEM, n=19-20/group).

* $p < 0.05$ compared to the control at that point in time.

Table 16. Effect of scCO₂ maca extract on body weight and organ weights in forced swimming rats

	Control	Maca extract ^a (mg/kg)	
		30	100
Body weight (g)	347.6±3.6	344.5±4.0	339.6±4.7
liver (g/BW kg)	41.86±0.60	41.17±0.68	42.03±0.67
Gastrocnemius L (g/BW kg)	6.26±0.07	6.24±0.09	6.26±0.08
Gastrocnemius R (g/BW kg)	6.37±0.07	6.36±0.08	6.37±0.08
Soleus L (g/BW kg)	0.46±0.02	0.49±0.02	0.48±0.01
Soleus R (g/BW kg)	0.49±0.01	0.46±0.01	0.45±0.01

^a Values are expressed as mean±SEM (n=19-20/group).

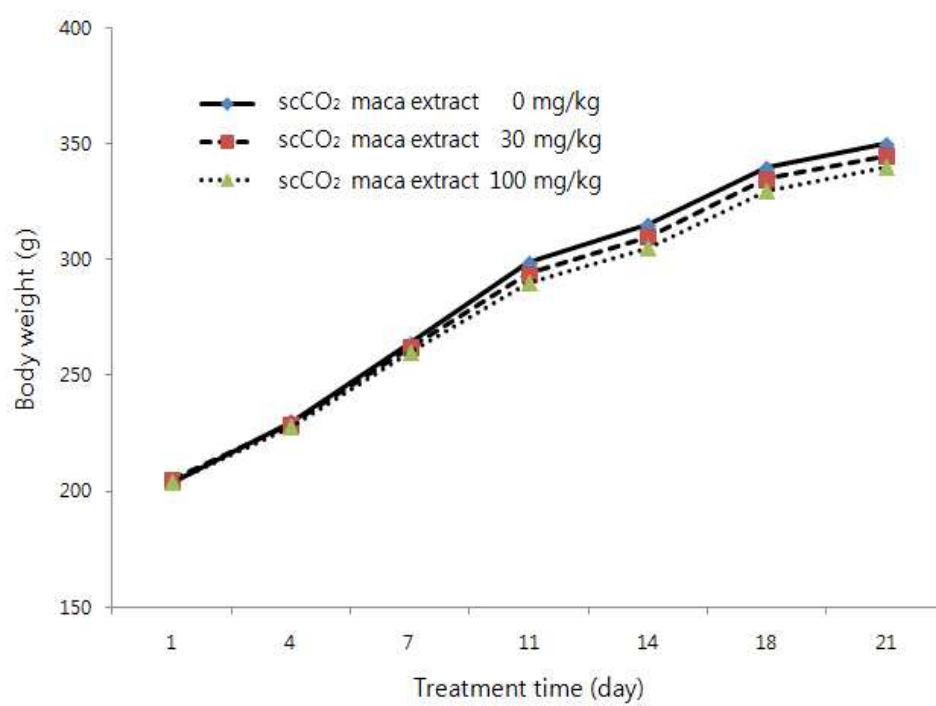


Fig. 21. Changes of body weight during 21 days.

Table 17. Effect of scCO₂ maca extract on serum biochemical parameters in forced swimming rats

	Control	Maca extract ^a (mg/kg)	
		30	100
AST (U/l)	96.7±2.9	98.0±2.3	96.2±2.3
ALT (U/l)	55.0±1.6	57.8±1.5	57.0±1.5
LDH (U/l)	426±53	316±16	300±12*
CK (U/l)	254±9	246±9	252±11
BUN (mg/dl)	18.0±0.6	16.6±0.4	17.9±0.5
Glucose (mg/dl)	242±12	243±10	265±12
FFA (μEq/l)	429±18	415±23	420±26
Lactate (mM/l)	21.5±0.7	21.4±0.9	21.7±0.9
Pi (mg/dl)	14.0±0.3	14.2±0.3	14.3±0.3

^a Values are expressed as mean±SEM (n=19-20/group). * $p<0.05$ compared to the control.

우 근육의 피로 및 세포 파괴시 혈액으로 유리되어 수치가 상승되는데⁽⁵³⁾ 3주간 마카 초임계 추출물을 투여하고 최대수영시간 측정 직후의 혈액 LDH 수준을 살펴보았다. 마카 초임계 추출물 섭취시 용량에 비례하여 최대수영시간이 증가되었음에도 불구하고 30, 100 mg/kg 마카 초임계 추출물 투여군의 LDH 수치가 대조군에 비해 낮게 나타났고(426 ± 53 vs 316 ± 16 , 300 ± 12), 특히 100 mg/kg 보충군의 경우 대조군에 비해 약 30%의 감소를 보였다($p < 0.05$).

간과 근육 내 저장 글리코겐의 함량은 마카 초임계 추출물 보충에 따른 차이가 나타나지 않았고(Table 18), 근육의 LDH 활성화도 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 그러나 근육 내 포도당을 분해하여 유산소 하에서 에너지를 발생시키는 TCA cycle의 첫번째 단계인 CS의 경우 30, 100 mg/kg 마카 초임계 추출물 보충군에서 대조군에 비하여 점차 활성이 증가되었고, SDH의 경우에도 유의차를 보이지는 않았지만 마카 초임계 추출물 투여군에서 약간 높게 나타났다. 이로서 마카 초임계 추출물의 보충은 무산소 에너지 대사보다는 유산소 하에서 ATP 발생을 위한 근육의 산화능력을 증가시킬 수 있을 것으로 생각되었다(Table 19).

그리고 마카 초임계 추출물이 과도한 운동으로 인해 유발되는 산화 스트레스를 경감시켜 주는지에 대해 알아보기 위해 강제수영으로 탈진한 흰쥐의 간과 근육에서 지질과산화물(TBARS) 지표, total GSH, catalase 및 SOD를 측정하였다(Table 20, 21). 지질과산화 지표로서의 근육 TBARS 수준은 대조군에 비해 100 mg/kg 용량으로 마카 초임계 추출물을 투여한 군에서 유의적으로 낮게 나타났다. 그러나 간에서의 TBARS 수준은 다른 군과 차이가 없었다. 가장 중요한 항산화 물질의 하나인 total GSH의 경우 간과 근육에서 모두 대조군 대비 100 mg/kg 마카 초임계 추출물 투여군에서 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 22). Catalase 활성의 경우 간에서의 활성은 100 mg/kg 마카 초임계 추출물 투여군에서 대조군 대비 유의적으로 높게 나타났으나, 근육에서는 차이

Table 18. Effect of scCO₂ maca extract on skeletal muscle and liver glycogen in forced swimming rats

	Control	Maca extract ^a (mg/kg)	
		30	100
Muscle glycogen (mg/g)	2.2±0.2	2.2±0.2	2.3±0.2
Liver glycogen (mg/g)	23.7±1.8	21.6±1.8	25.6±1.3

^a Values are expressed as mean±SEM (n=19-20/group).

Table 19. Effect of scCO₂ maca extract on skeletal muscle enzyme activities in forced swimming rats

	Control	Maca extract ^a (mg/kg)	
		30	100
LDH (μ M/min/mg protein)	2.31 $\pm$ 0.09	2.37 $\pm$ 0.08	2.31 $\pm$ 0.05
CS (μ M/min/mg protein)	0.096 $\pm$ 0.004	0.110 $\pm$ 0.005	0.113 $\pm$ 0.007*
SDH (μ M/min/mg protein)	0.271 $\pm$ 0.015	0.304 $\pm$ 0.017	0.282 $\pm$ 0.013

^a Values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=19-20/group). * p <0.05 compared to the control.

Table 20. Effect of scCO₂ maca extract on liver antioxidant status in rats swum to exhaustion

	Control	Maca extract ^a (mg/kg)	
		30	100
TBARS (nM/g)	40.5±2.0	41.5±1.6	41.4±0.6
GSH (μM/g)	7.03±0.17	7.04±0.20	7.65±0.16*
SOD (U/mg) ^b	32.3±0.43	33.9±0.76	33.0±0.70
Catalase (μM/min/mg) ^c	1.65±0.06	1.76±0.03	2.09±0.05*

^a Values are expressed as mean±SEM (n=19-20/group). * $p<0.05$ compared to the control.

^b One unit of SOD is defined as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of pyrogallol autoxidation.

^c Catalase activity is expressed as μM of formaldehyde formed/min/mg protein.

Table 21. Effect of scCO₂ maca extract on skeletal muscle antioxidant status in rats swum to exhaustion

	Control	Maca extract ^a (mg/kg)	
		30	100
TBARS (nM/g)	19.8±0.8	19.6±1.0	17.3±0.7*
GSH (μM/g)	1.02±0.03	1.08±0.03	1.12±0.02*
SOD (U/mg) ^b	8.08±0.23	7.99±0.21	8.23±0.20
Catalase (μM/min/mg) ^c	0.019±0.001	0.021±0.001	0.019±0.001

^a Values are expressed as mean±SEM (n=19-20/group). * $p<0.05$ compared to the control.

^b One unit of SOD is defined as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of pyrogallol autoxidation.

^c Catalase activity is expressed as μM of formaldehyde formed/min/mg protein.

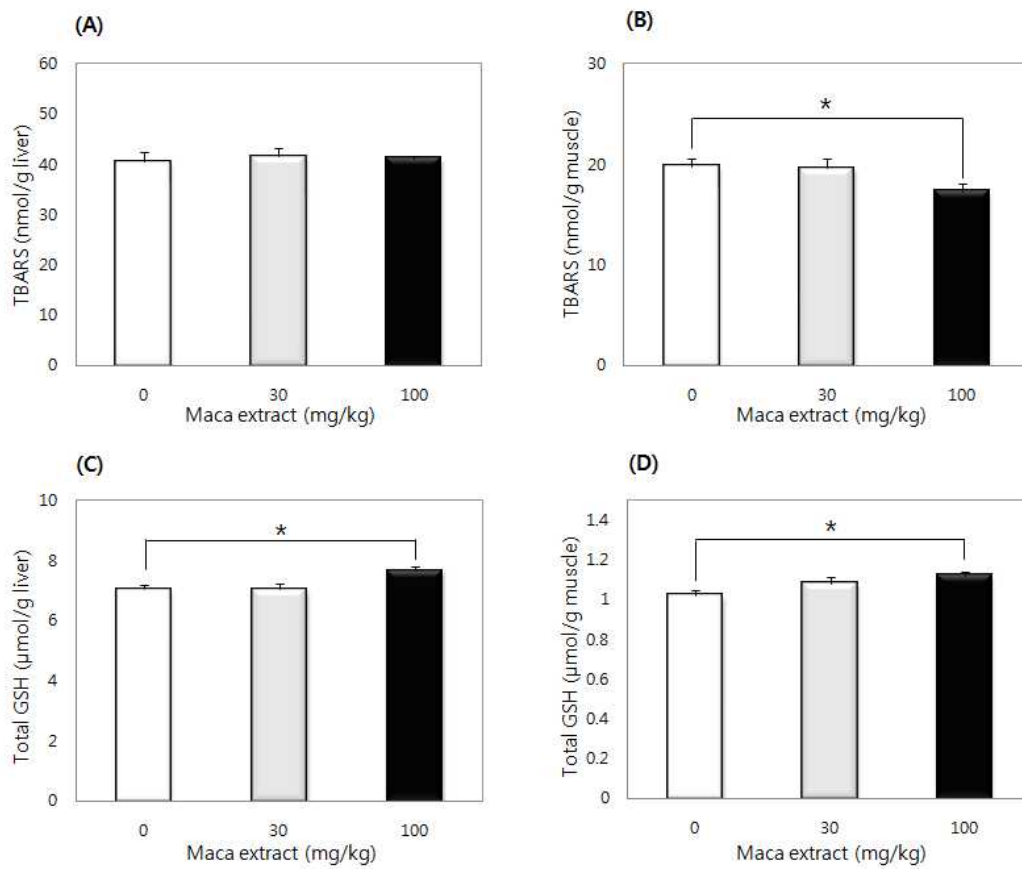


Fig. 22. Effect of scCO₂ maca extract supplementation on lipid peroxidation (A, B) and total GSH (C, D) in liver (left) and skeletal muscle (right) of exhaustive swimming rats. Values are expressed as mean±SEM (n=19-20/group). * $p < 0.05$ compared to the control.

가 없었다. SOD 활성의 경우는 대조군과 투여군 모두에서 유사한 수준으로 나타났다. 이로서 마카 초임계 추출물은 운동시 발생하는 산화스트레스로 인한 근육내 지질과산화를 억제하고 자유기 환원 작용을 통해 산화스트레스를 경감시켜 지구력 증진 효과를 나타낼 것으로 생각되었다.

4. 고찰

본 논문은 페루인삼으로 알려진 페루 고지대 특산품인 마카로부터, 유기용매와는 달리 안전성이 우수한 이산화탄소 초임계 유체 추출을 이용하여, 마카의 2차 대사산물인 마카마이드를 함유한 추출물의 최적화 생산 조건 설정 및 그를 이용한 지구력 증진 효능 검증에 대한 연구 내용이다. 이산화탄소 초임계 유체를 통한 마카 건조 분말에서의 추출에서는 초기 마카 건조 분말내 1% 이하 수준으로 함유된 조지방을 선택적으로 추출하여 유기용매를 사용하지 않고서도 95% 이상의 고순도 마카 초임계 지질 추출물을 손쉽게 얻을 수 있었다 (Table 4, 5). 일정 온도에서 초임계 유체의 압력을 증가시키면 초임계의 밀도와 용매력이 증가하게 되고 초임계 유체의 밀도와 추출물의 밀도가 같을 때 최대 용해도를 갖게 되는데⁽⁴¹⁾, 마카 분말에 대한 추출 결과에서 추출 압력의 증가에 따른 조지방 함량의 감소는 지질성분이 아닌 다른 성분에 대한 용해도가 증가되면서 지질성분의 용해도에 대한 상대적 농도가 감소된 것이라 여겨진다. 온도의 경우 일반적으로 증가할수록 밀도의 감소를 가져와 용해도의 감소를 유발한다고 알려져 있는데, 금번 실험에서도 300, 500 bar에서는 낮은 온도인 40℃에서 조지방의 함량이 가장 높게 나타나 일치하였다. 그러나 400 bar에서는 다소 다른 결과를 보였는데, 이는 특정 압력을 기준으로 온도에 의한 영향이 다른 경향을 보였다는 보고⁽⁸³⁾와 같이 온도의 영향은 일관성 있게 나타나지는 않았다.

마카의 초임계 추출 공정 최적화는 경제성 측면을 고려하여 전체 생산 수율과 목표 물질로 삼았던 마카마이드 회수율을 동시에 높은 수준으로 만족시킬 수 있는 최적화 조건을 도출하였다. 완전요인 설계법에 의한 실험 결과 추출 압력과 추출 온도 요인이 가장 중요한 주효과 요인으로 유의적인 결과를 나타

념을 알 수 있었고(Fig. 15), RSM 설계법 실험을 진행하여 최적화 생산 조건으로 38.6℃, 100 bar가 도출(Fig. 16)되었다. 본 조건은 이산화탄소의 임계점 부근에 해당되는 것으로 임계점 부근에서의 이산화탄소 밀도에 추출 압력과 추출 온도가 가장 많이 영향을 준다는 내용⁽³⁶⁾과 일치하며, TG가 주된 형태인 유지류의 300-400 bar 추출 압력 범위⁽⁴⁴⁾나 감귤박으로부터 카로티노이드 등의 기능성분의 추출 최적화 조건⁽⁸⁴⁾과 비교했을 때도 훨씬 경제적인 공정이라 하겠다.

마카 초임계 추출물의 주요 성분들과 Dini⁽⁸⁾의 일반 마카 분말에 대한 보고와 비교했을 때 탄수화물과 단백질은 다소 낮아진 대신 지방 함량이 30배 이상 높아졌기에 본 연구에서 얻고자 하였던 마카마이드가 다량 함유된 지질 추출물 생산 목표에 부합되었다(Table 8). 지방산의 구성비를 살펴보면 불포화 지방산의 비율이 증가하였는데(Table 10), 이는 지방산 종류에 따라 이산화탄소에 대한 용해도가 다르며, 탄소수가 적고 극성이 낮으며 불포화도가 높은 지방산일수록 용해도가 증가했다는 실험결과들^(37,39)과 일치하게 나타난 것으로 해석된다. 지방산의 형태적 특성으로 볼 때 포화지방산은 일자 형태를 가지고 있으므로 층층이 쌓여지게 되지만, 불포화 지방산은 공간적인 구조를 보임으로서 층층이 쌓여질 수 없고 따라서 용매인 이산화탄소와 접촉할 확률이 더 높아지게 되므로 용해도가 더 크게 나타나는 것으로 생각되기에⁽³⁷⁾ 마카 분말의 지방산 조성이 초임계 유체 추출을 거치면서 좀 더 생리적 기능 측면에서 우수하게 변화되는 부가 효과도 얻을 수 있었다.

마카마이드 2종의 경우 국내 수입되는 마카 건조 분말로부터 실험적으로 얻은 평균 함량 0.4 mg/g 수준에서 약 20배 농축된 7.86 ± 0.36 mg/g의 결과를 얻었다(Table 9). 단순히 이 함량을 지표로 한국식품의약품안전청으로부터 운동수행 능력 향상에 대한 기능성으로 개별인정 받은 마카 분말의 인체 시험 일일섭취량 1,500-3,000 mg을 환산해 본다면, 마카 초임계 추출물의 경우

50-150 mg으로도 동일한 효과를 기대해 볼 수 있는 결과이다. 마카의 추출에 대한 특허(US 6,267,995 B1(2001), US 6,428,824 B1(2002), US 6,552,206 B1(2003))에서는 알코올과 메탄올을 이용하여 추출하는 단계와 필요에 따라 역상크로마토그래피 컬럼을 이용하여 정제하는 단계로 구성하여 마카마이드를 최대 10%까지 농축시킬 수 있다고 한다. 하지만 특허를 포함하는 기존 마카 추출법은 마카마이드 함량을 높이기 위해서는 여러 단계의 유기용매 추출 과정과 추가적인 정제 단계를 적용해야 하는데 이러한 방법으로 생산된 추출물은 현실적으로 식품 원료로서 사용이 불가능하고 생산 비용이 높아져 실제 공정에서는 적용되기 어려운 한계가 있다. 또한 이들 추출법은 추출 과정에 유해한 유기용매를 사용한다는 점에서 환경 문제를 유발할 가능성이 많고, 식품 안전 이슈에 민감한 소비자들에게 부정적 인식을 줄 수 있다.

본 연구에서는 마카만의 특이 성분이라는 하나, 현재까지는 구조 동정^(15,16)이나 마카의 생태종이나 재배 환경에 따른 함량 확인 수준의 연구^(11,17)가 주로 이뤄지고 있는 마카마이드 성분을 최대한 회수한 마카 추출물을 얻고자 하였다. 본 결과들을 토대로 활용하여 특허를 출원, 등록 (등록번호 10-0814133) 하였는데, 특허 명칭은 ‘마카마이드 고함유 마카추출물 제조방법’이다. 본 특허는 초임계 이산화탄소를 이용하여 특정 온도와 압력으로 기울기 구배(*gradient*)로 증가시켜 추출함으로서 기존 유기용매 추출에 의해 생산된 마카 추출물에 비해 마카마이드가 고효율로 추출되어 경제적 효용가치가 뛰어나며 유해한 유기용매가 잔류하지 않기 때문에 식품원료로서의 안전성도 확보할 수 있는 특징을 가지고 있다.

본 논문에서는 결과를 보고하지 않았으나 예비 실험으로 진행하였던 초임계 이산화탄소의 유속, 마카 분말의 입도, 추출기 내부에서의 이산화탄소 유체의 흐름 방향 등은 마카마이드 회수율이나 생산 수율에 별다른 영향을 주지 않는 것으로 확인한 바 있다. 추후에는 현재 도출된 회수율 94.6%와 생산 수율

7.9%에서 조금 더 향상시켜 생산 원가를 절감하거나 또는 현재 목표 성분으로 추출한 마카마이드 2종 외 다른 마카엔이나 알칼로이드 성분까지 함께 추출할 수 있는 조건에 대해 추가 연구를 해 볼 필요가 있겠다. 특히 마카엔은 마카마이드보다 마카내 함유량이 많은 것으로 보고⁽¹¹⁾되어 유리할 것으로 생각되며, 마카마이드의 경우 고도가 낮은 지역에서 생육된 마카에서는 그 함량이 낮은 것으로 알려져 있어⁽¹⁷⁾ 향후 페루 고산지대 이외의 다른 지역으로 재배지를 확대할 경우 더욱 필요하리라 생각된다.

마카 초임계 추출물의 효능 검증은 다양한 기능성 중에서 지구력 증진에 대한 효과를 확인하고자 체중부하 강제수영 운동 모델법을 이용하였다. 우선 마카 초임계 추출물의 유효용량을 탐색한 결과 3주 동안 마카 초임계 추출물 30, 100 mg/kg을 투여 받은 그룹에서 농도 비례하여 최대수영시간 증가가 관찰되었고, 300, 1,000 mg/kg 투여군의 경우에는 최대수영시간의 증가가 관찰되지 않아 30, 100 mg/kg을 유효용량으로 선정하였다(Fig. 19). 유효용량으로 선정한 30, 100 mg/kg 용량으로 마카 초임계 추출물을 3주 동안 투여하여 탈진시까지의 수영시간을 측정하였을때도 용량 결정 실험시와 유사하게 100 mg/kg 섭취군에서 유의적인 최대수영시간 증가가 관찰되었다(Fig. 20). 특히 최대수영시간이 증가했음에도 체중은 모든 군에서 동일한 수준을 나타내 지구력 증진 및 항피로 효능이 단순 체중 증가에 의한 것이 아님을 시사해주며(Fig. 21), 이는 발효 마카 투여시 체중 감량 효과를 보였던 결과⁽⁶⁸⁾를 제외한 대부분의 마카를 이용한 실험 결과와 유사하였다.

이러한 지구력 증진의 원인을 설명하기 위하여 혈청 지표들과 글리코겐 저장 정도 그리고 항산화 상태를 측정하였는데, 마카 초임계 추출물 투여군의 경우 약 40% 수준의 최대수영시간 증가를 보여주었음에도 불구하고 혈청 포도당, FFA, 젖산, 그리고 간과 근육 글리코겐의 수준은 대조군과 비교하여 차이가 없었다(Table 17, 18). 이는 여러 기능 소재들의 복합물을 3주 동안 투여

시 수영시간은 유의적으로 증가하였으나 간의 글리코겐, 혈청 포도당, 젖산, Pi 등이 대조군과 차이가 없었던 연구⁽⁴⁶⁾와 유사한 결과이다. 그리고 버섯 에탄올 추출물도 4주간 투여시 수영시간은 유의적으로 증가하였으나 간과 근육의 글리코겐은 변화가 없었다⁽⁸⁵⁾. 이런 경우 다른 에너지원의 사용을 촉진했을 것이라는 해석이 가능할 수 있고, 항피로 지구력 증진 효과 연구에서 보통 기대되는 글리코겐 절약 효과는 마카 초임계 추출물의 투여기간을 늘린다면 나타날 수 있을 것으로 기대된다.

마카 초임계 추출물 100 mg/kg 보충시 최대수영시간 증가와 더불어 근육 피해 지표인 혈청 LDH 활성은 감소되고 근육 미토콘드리아의 CS 활성은 증가되는 것으로 나타나(Table 17, 19), 마카 초임계 추출물의 보충은 근육세포의 손상을 감소시키고 에너지 발생을 위한 근육의 산화능력을 증진시킴으로서 최대수영시간 증가에 기여하는 것으로 판단되었다. 또한 산화스트레스 지표인 TBARS가 근육내에서 유의적으로 감소되었고, 비효소적 항산화제로 중요한 GSH가 간과 근육에서 상승하였고, 간에서의 catalase 활성이 증가되어(Table 20, 21) 마카 초임계 추출물은 실험 동물에서의 항산화 지표 변화에 유의적 영향을 줌으로써 운동에 따른 산화적 스트레스를 감소시켜 수영시간 증가에 영향을 미친 것으로 생각되었다. 이런 마카 초임계 추출물의 항산화 효능은 마카의 메탄올 추출물을 이용한 primary 간세포 실험에서 t-BH로 독성 처리시 증가하는 LDH와 AST를 유의적으로 감소시켜 산화 손상을 막아주었다는 결과⁽²⁰⁾와도 관련이 있다고 하겠다. 그리고 Seabuckthorn 추출물을 투여한 연구⁽⁸⁶⁾에서 흰쥐의 수영시간이 유의적으로 증가하였는데, 이는 운동으로 인한 조직 손상에 대한 보호 작용의 결과로, 조직에서의 MDA 감소, catalase 증가, SOD 증가가 나타난 바 있어 금번 연구와 유사한 기작이라고 할 수 있다.

Benzylglucosinolate를 기능성분의 하나로 포함하고 있는 마카 물 추출물을 이용한 흰쥐에서의 지구력 증진 실험을 통한 항피로 연구에서는 에너지 급원

으로서 지방산 이용의 증가와 축적된 젖산의 분해가 증가되어 지구력이 증진되는 것으로 보고된 바 있다⁽⁸⁷⁾. 그러나 본 연구에서는 물 추출과 달리 마카 마이드가 다량 함유된 마카 초임계 추출물을 이용하여 실험하였고, 마카 초임계 추출물의 경우 에너지 급원이나 혈청 젖산 수준에는 영향을 미치지 않고 체내 항산화 시스템에 영향을 주는 것으로 나타났다. 일반적으로 과도한 운동은 에너지 급원의 양을 감소시키고 젖산과 같은 대사물질을 증가시킨다. Wilber⁽⁸⁸⁾에 의하면 탈진에 이르게 하는 심한 수영은 혈액의 젖산 수준을 증가시키고 젖산의 축적 속도는 수영시간과 상반된 관련성을 가지고 있다고 하였다. 이에 마카 초임계 추출물의 투여로 최대수영시간이 유의적으로 증가하였음에도 독성 대사 산물인 젖산의 축적에 변화가 없다는 것은 의미 있는 결과라고 하겠다.

피로의 기작은 매우 다양한데 그 가운데 활성산소 반응기 이론에 대한 관심은 점차 증가되고 있다. 운동 중 다량의 산소를 소모하게 되면 전자전달계 작용의 결과로서 자유기의 생성 속도도 가속화되는데⁽⁸⁹⁾, 근육 운동이 활성산소종의 생성을 증가시키고 이런 산화적 스트레스로 인해 근육 손상과 근육 피로를 유발하게 된다고 하였다^(55,90). 이렇게 발생한 자유기는 1) 근육 세포의 DNA, 세포막의 지질 등에 산화적 손상을 가져와 결국 근육 세포의 사멸을 일으키고, 2) 미토콘드리아에 작용하여 에너지 발생과정에 관여하는 다양한 효소들의 활성을 감소시켜 에너지 생성을 감소시키며, 3) 근섬유조직에서 근수축과 관련된 탈분극 감소, 칼슘이온의 농도 변화 및 actin, myosin 단백질의 분해가 증가됨으로 근육의 수축력 감소 및 피로를 유발하게 된다⁽³³⁾.

금번 실험에서 마카 초임계 추출물의 투여로 탈진된 흰쥐의 근육에서 TBARS가 감소하고 간과 근육에서의 GSH가 증가하였으나, 항산화 효소 활성의 경우 간에서의 catalase만 증가하고 SOD에서는 변화가 없었던 것으로 나타났다. 이는 GSH에 의한 hydrogen peroxide가 비활성화되는 항산화 시스템이 주가 되는

것으로 생각해 볼 수 있으며, 산화제와 항산화제의 균형, 운동 강도와 시간, 그리고 훈련에의 적응 등에 영향을 받은 것으로도 해석해 볼 수 있다.

Sandoval⁽⁷⁰⁾의 연구에서 마카가 자유기 소거능과 함께 자유기에 의한 세포 괴사(apoptosis)에 대한 보호 효과가 있음이 보고된 바 있다. LDH의 경우 원래 근육 세포에 존재하는데 근육 손상에 의해 혈액 내로 유출되기 때문에 혈청 LDH는 근육 손상의 지표로 여겨지고 있으며, 이런 혈청 LDH의 감소와 근육 TBARS 수준의 감소는 마카 초임계 추출물이 강제수영과 같은 과도한 운동에 의해 초래된 지속된 근육 세포 손상과 지질과산화에 대한 보호효과가 있음을 대변해 준다. Cao⁽⁹¹⁾의 연구에서는 강제 운동으로 인해 유발된 혈청 LDH 상승이 인삼을 포함한 총 4종의 생약혼합물의 투여로 유의적으로 감소한 결과를 보여 주었는데, 이는 면역 시스템의 조절을 통한 것으로 해석한 바 있다. 마카 초임계 추출물의 경우도 추후 근육 종류별, LDH 동위효소 종류별에 따른 심화 연구가 수행된다면 보다 자세한 체내 대사예의 영향 및 기전을 파악하는데 도움이 될 것이다.

본 연구에서는 마카의 지질 분획을 좀 더 효과적으로 추출하기 위해 이산화탄소 초임계 유체 추출법을 적용하였고, 지방 10.8%, 스테롤 0.7%, 마카마이드 0.78%를 함유한 추출물을 얻어 이를 이용한 지구력 증진 효과에 미치는 영향을 고찰해 보았다. 결론적으로 항산화 기작을 통한 지구력 증진을 마카 초임계 추출물 용량 의존적으로 확인할 수 있었으며, 투여용량 측면에서도 다른 연구들과 비교하여 최대 40배 적은 용량으로도 효과를 확인할 수 있어 마카에만 특징적으로 함유되어 있는 마카마이드류의 성분들이 기능성분의 하나일 수 있다는 근거를 마련하였다. 체표면적(body surface area, BSA)을 기준으로 환산한 인체 임상시험 투여량(human equivalent dose, HED) 연구⁽⁹²⁾의 환산식을 적용해 보면, 기존의 마카 분말을 이용한 임상시험 섭취량과 비교하여 30% 수준이고, 다른 다양한 기능성 소재들의 지구력 증진 실험 결과들^(59,60,61,62,85,86)

과 비교해 볼 때도 2-15배 적은 용량에서 유의성 있는 증진 효과가 나타나 상대적으로 우수한 소재라 하겠다.

현재까지 마카 추출물 관련 모든 연구는 에탄올, 메탄올, 아세톤, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 디클로로메탄 등과 같은 유기용매를 이용하는 추출^(20,35,65,66,93)들로 마카마이드가 포함된 지질 분획보다는 수용성 글루코시놀레이트나 다당체, 펩타이드류 등에 초점이 맞추어져 있었다. 통상적으로 식품의 원료로 사용 가능한 일반 건조 마카 분말^(3,4,69)과 그를 이용한 물^(14,87), 주정(에탄올) 추출^(27,65,71) 원료의 경우 동물과 인체를 대상으로 한 여러 실험 결과를 살펴보면 기능성을 나타내기 위한 유효용량이 너무 많아 실용화 측면에서 다양한 제품을 개발하는 데는 한계가 있어왔다. 본 논문은 유해 유기용매를 사용하지 않으면서 마카내 마카마이드를 포함한 여러 성분들을 최대한 추출한 마카 추출물을 경제적으로 간단하게 생산할 수 있는 방법을 개발하여 지구력 증진 효과에 대해 검증한 의미 있는 연구이다.

5. 결론

본 연구 결과를 요약하면 여러 가지 생리활성이 보고된 바 있는 페루 고산 지대 특화 작물인 마카로부터 마카의 고유 성분인 마카마이드를 다량 함유한 추출물을 얻기 위해 초임계 이산화탄소 유체 추출을 통해 마카 지질 추출물을 얻었으며, 2종의 마카마이드 성분을 GC/MS와 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR 분석을 통해 *N*-benzylhexadecanamide($\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{NO}$)와 *N*-benzyl-5-oxo-6*E*,8*E*-octadecadienamide($\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{NO}_2$)로 확인하였다. 이산화탄소 초임계 유체 추출 공정 최적화는 실험 설계법을 이용하여 생산 수율과 마카마이드 회수율이 높은 조건으로 추출 온도 38.6°C, 추출 압력 100 bar가 도출되었고, 최적화 조건에서 생산된 마카 초임계 추출물내 마카마이드 함량은 마카 분말 대비 20배 이상 농축되었다.

최적화 조건에서 생산된 마카 초임계 추출물에 대한 기능성 평가 검증으로 체중부하 강제수영 모델을 이용하여 지구력 증진 효과 검증 실험을 진행하였다. 1차 유효 용량 평가에서 30, 100 mg/kg 투여군을 선정하였고, 2차 본실험에서도 100 mg/kg 투여군에서 수영시간이 약 40% 증가된 결과를 얻었다. 혈액, 간, 근육 조직에서의 에너지, 피로, 항산화 관련 지표들을 비교 분석한 결과 혈액의 LDH 감소, 근육의 TBARS 감소, 근육의 CS 증가, 그리고 간과 근육의 GSH가 증가됨을 확인하였다. 마카 초임계 추출물의 지구력 증진 효과는 근육 세포의 손상 억제 효과, 유산소하에서 근육의 산화능력 증진, 자유기를 환원시켜 산화 스트레스를 경감시켜 근육내 지질과산화를 억제하는 기작과 관련이 있는 것을 알 수 있었다.

마카 초임계 추출물의 보충은 지구력 증진 및 피로 저감에 도움을 줄 수 있을 것으로 평가되나 추후 근육 세포에서 세포의 산화적 손상 및 세포 사멸에

미치는 영향 등 메커니즘에 대한 연구 및 임상 시험이 추가적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다. 이상의 모든 실험 결과를 종합하여 볼 때 마카의 특징적 성분인 마카마이드를 다량 함유하도록 공정 최적화된 초임계 추출물을 제조할 수 있었고, 본 소재를 기능성 소재로서 보충할 경우 유산소 운동 과정과 산화 스트레스에 의한 체내 과정에 영향을 주어 지구력 증진에 효과가 있다는 것을 확인하였기에 기능성 소재로서 건강기능식품 제품에 적용할 수 있는 근거를 마련하였다.

6. 참고문헌

1. Valerio L.G. and Gonzales G.F. (2005) Toxicological aspects of the south American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and maca (*Lepidium meyenii*). *Toxicol. Rev.* **24**(1): 11-35.
2. Hermann M. and Heller J., eds. (1997) *Andean roots and tubers: ahipa, arracacha, maca and yacon*. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute.
3. Yu L.J. and Jin W.W. (2004) Study on the nutritional components and anti-fatigue effects of dry powder of maca (*Lepidium meyenii*). *Chin. Food Chem.* **25**(1): 164-166.
4. Vecera R., Orolin J., Skottova N., Kazdova L., Oliyarnil O., Ulrochova J. and Simanek V. (2007) The influence of maca (*Lepidium meyenii*) in antioxidant status, lipid and glucose metabolism in rat. *Plant Foods Hum. Nutr.* **62**: 59-63.
5. Gonzales G.F. (2012) Ethnobiology and ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (maca), a plant from the peruvian highlands. *Evi. Based Compliment. Alternat. Med.* Article ID 193496.
6. Balick M. J. and Lee R. (2002) Maca: from traditional food crop to energy and libido stimulant. *Altern. Ther. Health Med.* **8**(2): 96-98.
7. Brinckmann J. and Smith E. (2004) Maca culture of the junin plateau. *J. Altern. Complement. Med.* **10**(3): 426-430.
8. Dini A., Migliuolo G., Rastrelli L., Saturnino P. and Schettino O. (1994) Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chem.* **49**(4):

347-349.

9. Wang Y., Wang Y., McNeil B. and Harvey L.M. (2007) Maca: an andean crop with multi-pharmacological functions. *Food Res. Int.* **40**: 783-792.
10. Gonzales G.F. and Valerio L.G. (2006) Medicinal plants from Peru: a review of plants as potential agents against cancer. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **6**: 429-444.
11. Clement C., Grados D.A.D., Avula B., Khan I.A., Mayer A.C., Aguirre D.D.P., Manrique I. and 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.
12. Gonzales G.F., Nieto J., Rubio J. and Gasco M. (2006) Effect of black maca (*Lepidium meyenii*) on one spermatogenic cycle in rats. *Andrologia* **38**: 166-172.
13. Gonzales G.F., Miranda S., Nieto J., Fernandez G., Yucra S., Rubio J., Yi P. and Gasco M. (2005) Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **3**: 5.
14. Valentova K. and Ulrichova J. (2003) *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* prospective andean crops for the prevention of chronic diseases. *Biomed. Papers* **147(2)**: 119-130.
15. Muhammad I., Zhao J., Dunbar D.C. and Khan I.A. (2002) Constituents of *Lepidium meyenii* 'maca'. *Phytochem.* **59(1)**: 105-110.
16. Zhao J., Muhammad I., Dunbar D.C., Mustafa J. and Khan I.A. (2005) New alkalamides from maca (*Lepidium meyenii*). *J. Agric. Food Chem.*

53: 690–693.

17. Zhao J., Avula B., Chan M., Clement C., Kreuzer M. and Khan I.A. (2012) Metabolomic differentiation of maca (*Lepidium meyenii*) accessions cultivated under different conditions using NMR and chemometric analysis. *Planta Med.* **78**: 90–101.
18. McCollom M.M., Villinski J.R., McPhail K.L., Craker L.E. and Gafner S. (2005) Analysis of macamides in samples of maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC–UV–MS/MS. *Phytochem. Anal.* **16**: 463–469.
19. Cui B., Zheng B.L., He K. and Zheng Q.Y. (2003) Imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii*. *J. Nat. Prod.* **66**: 1101–1103.
20. Valentova K., Buckiova D., Kren V., Peknicova J., Ulrichova J. and Simanek V. (2006) The *in vitro* biological activity of *Lepidium meyenii* extracts. *Cell Biol. Toxicol.* **22**: 91–99.
21. McKay D. (2004) Nutrients and botanicals for erectile dysfunction: examining the evidence. *Altern. Med. Rev.* **9**(1): 4–16.
22. Gonzales G.F., Gasco M., Cordova A., Chung A., Rubio J. and Villegas L. (2004) Effect of *Lepidium meyenii* (maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340m). *J. Endocrinol.* **180**(1): 87–95.
23. Bustos-Obregon E., Yucra S. and Gonzales G.F. (2005) *Lepidium meyenii* (maca) reduces spermatogenic damage induced by a single dose of malathion in mice. *Asian J. Androl.* **7**(1): 71–76.
24. Gonzales G.F., Cordova A., Vega K., Chung A., Villena A., Gonez C. and Castillo S. (2002) Effect of *Lepidium meyenii* (maca) on sexual desire and its absent relationship with serum testosterone levels

- in adult healthy men. *Andrologia* **34(6)**: 367-372.
25. Jin W.W., Zhang Y.Z., Ao M.Z., Xiong Y. and Yu L.J. (2007) Improvement of mice immune function with compounds of powdered maca (*Lepidium meyenii*) and ginsenosides. *Chin. J. New Drugs* **16(1)**: 45-48.
 26. Pino-Figueroa A., Nguyen D. and Maher T.J. (2010) Neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (maca). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1199**: 77-85.
 27. Zhang Y., Yu L., Ao M. and Jin W. (2006) Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat. *J. Ethnopharmacol.* **105**: 274-279.
 28. Rubio J., Dang H., Gong M., Liu X., Chen S.l. and Gonzales G.F. (2007) Aqueous and hydroalcoholic extracts of black maca (*Lepidium meyenii*) improve scopolamine-induced memory impairment in mice. *Food Chem. Toxicol.* **45(10)**: 1882-1890.
 29. Rubio J., Caldas M., Davila S., Gasco M. and Gonzales G.F. (2006) Effect of three different cultivars of *Lepidium meyenii* (maca) on learning and depression in ovariectomized mice. *BMC Complement. Altern. Med.* **6**: 23.
 30. Ranilla L.G., Kwon Y.I., Apostolidis E. and Shetty K. (2010) Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herb and spices in Latin America. *Bioresource Technol.* **101**: 4676-4689.
 31. Lopez-Fando A., Gomez-Serranillos M.P., Iglesias I., Lock O.,

- Upamayta U.P. and Carretero M.E. (2004) *Lepidium peruvianum* chacon restores homeostasis impaired by restraint stress. *Phytother. Res.* **18**: 471-474.
32. Gonzales-Castaneda C. and Gonzales G.F. (2008) Hypocotyls of *Lepidium meyenii* (maca), a plant of the peruvian highlands, prevent ultraviolet A-, B-, and C-induced skin damage in rats. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **24**: 24-31.
 33. Couillard A. and Prefaut C. (2005) From muscle disuse to myopathy in COPD: potential contribution of oxidative stress. *Eur. Respir. J.* **26**: 703-719.
 34. Gonzales G.F., Cordova A., Gonzales C., Chung A., Vega K. and Villena A. (2001) *Lepidium meyenii* (maca) improved semen parameters in adult men. *Asian J. Androl.* **3**: 301-303.
 35. Kwon Y.S., Jeon I.S., Hwang J.H., Lim D.M., Kang Y.S. and Chung H.J. (2009) Biological activities of maca (*Lepidium meyenii*) extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38(7)**: 817-823.
 36. Lee Y.W. (2001) Supercritical fluid technology. *News Inf. Chem. Eng.* **19(3)**: 325-333.
 37. Lee M.J., Kim K.H. and Bae J.O. (2006) The effects of supercritical carbon dioxide on the extraction of perilla oil. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35(10)**: 1439-1443.
 38. Kim K.J. and Lee Y.W. (2010) Supercritical fluid technology for green food processing. *Food Sci. Industry* **43(1)**: 35-52.
 39. Kwon Y.A. (1997) Determination of solubility of fatty acid methyl ester in supercritical carbon dioxide. *Food Eng. Prog.* **1(3)**:

226-232.

40. Palmer M.V. and Ting S.S.T. (1995) Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chem.* **52**: 345-352.
41. Turner C., King J.W. and Mathiasson L. (2001) Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. *J. Chromatogr. A* **936**: 215-237.
42. Reverchon E. (1997) Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *J. Supercr. Fluids* **10**: 1-37.
43. Ju Y.W., Lee M.Y., Woo M.J. and Byun S.Y. (2005) The current status of supercritical fluid extraction technology and industrial applications. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **20(5)**: 329-337.
44. Hwang A.R., Lim G. and Ryu J.H. (2010) Ultrasound-assisted extraction of canola oil using supercritical fluid process. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **25**: 437-442.
45. Kim C.H., Shin H.C. and Won C.W. (2005) Prevalence of chronic fatigue and chronic fatigue syndrome in Korea: community-based primary care study. *J. Kor. Med. Sci.* **20**: 529-534.
46. Song T.C., Han D., Lee C.H., Kim Y.E., Jung K.A. and Kim H.Y. (2005) Effect of dietary supplementation of two tonic formula on the forced-swimming capacity of rats. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37(4)**: 648-655.
47. 식품의약품안전청. (2005) 건강기능식품의 기능성 시험 가이드(III): 피로회복 관련 기능성 시험. 서울: 식품의약품안전청.
48. Lim K. and Suh H. (2003) The evaluation methods for endurance

- performance in human. *Kor. J. Exerc. Nutr.* **7(2)**: 149-154.
49. Wang L., Zhang H.L., Lu R., Zhou Y.J., Ma R., Lv J.Q., Li X.L., Chen L.J. and Yao Z. (2008) The decapeptide CMS001 enhances swimming endurance in mice. *Peptides* **29**: 1176-1182.
 50. Kim C.J., Kim H.J., Lee Y.H., Lee Y.A., Lee J.K., Moon S.W., Park J.H., Jang Y.U., Cho J.H. and Sim S.S. (2000) Anti-fatigue and hepatoprotective activities of nokyangbotang. *Yakhak Hoeji* **44(3)**: 224-231.
 51. Glaister M. (2005) Multiple sprint work: physiological responses, mechanisms of fatigue and the influence of aerobic fitness. *Sports Med.* **35(9)**: 757-777.
 52. Murase T., Haramizu S., Shimotoyodome A., Nagasawa A. and Tokimitsu I. (2005) Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **288**: R708-R715.
 53. Shin Y.W., Choi H.J., Park J.E., Kim D.H., Park J.H. and Kim N.J. (2006) Effect of heat processed ginseng on anti-fatigue. *Kor. J. Pharmacogn.* **37(4)**: 246-252.
 54. Ji L.L. (1995) Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radical Biol. Med.* **18(6)**: 1079-1086.
 55. Davies K.J.A., Quintanilha A.T., Brooks G.A. and Packer L. (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophysic. Res. Com.* **107(4)**: 1198-1205.
 56. Lee W.L. (2003) Effects of exhaustive exercise and antioxidants supplementation on oxidative damage, antioxidants enzyme activity

- and mRNA expression in rats. *Exerc. Sci.* **12(4)**: 679-692.
57. Hong S.G., Yang D.S., Kang B.J., Lee H.S. and Yoon Y. (2003) Effects of formula (JR-22) maybe containing traditional herbs on maximal exercise performance and antioxidant materials in murine model. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32(7)**: 1076-1081.
 58. Do J.H., Lee S.K., Lee J.W., Lee E.K. and Kim S.H. (2000) Study on antioxidant and stamina activities of kejihongsamatang. *J Ginseng Res.* **24(4)**: 202-205.
 59. Lee M.K., Lim H.H., Song Y.K., Ko I.G., Kim H., Shin M.S., Lee T.H., Kim C.J., Joo K.J., Choi H.H., Park J.K. and Lim B.V. (2006) Effect of the mixture of red ginseng and paenia radix on the treadmill running and swimming exercise in rats. *Kor. J. Exerc. Nutr.* **10(3)**: 255-263.
 60. Kim S., Jo S.K., An M.Y., Shin D.H. and Kim S.H. (2002) Antifatigue effect and improvement of hematotoxicity by dongchongxiacao (*Paecilomyces japonica*). *J. Vet. Clin.* **19(3)**: 328-332.
 61. Kim H., Park S., Han D.S. and Park T. (2003) Octacosanol supplementation increases running endurance time and improves biochemical parameters after exhaustion in trained rats. *J. Med. Food* **6(4)**: 345-351.
 62. Harada R., Taguchi Y., Urashima K., Sato M., Ohmori T. and Morimatsu F. (2002) Enhancement of swimming endurance in mice by chicken breast extract. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **55(2)**: 73-78.
 63. Zhang M., Izumi I., Kagamimori S., Sokejima S., Yamagami T., Liu Z. and Qi B. (2004) Role of taurine supplementation to prevent

- exercise-induced oxidative stress in healthy young men. *Amino Acids* **26**: 203-207.
64. You Y., Park J., Yoon H.G., Lee Y.H., Hwang K., Lee J., Kim K., Lee K.W., Shim S. and Jun W. (2009) Stimulatory effects of ferulic acid on endurance exercise capacity in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 1392-1397.
 65. Zhang Y.Z., Yu L.J., Wan J.M. and Jin W.W. (2007) Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. (maca) on immunological function of mice. *Nat. Prod. Res. Dev.* **19(2)**: 274-276.
 66. Cicero A.F.G., Piacente S., Plaza A., Sala E., Arletti R. and Pizza C. (2002) Hexanic maca extract improves rat sexual performance more effectively than methanolic and chloroformic maca extracts. *Andrologia* **34(3)**: 177-179.
 67. Zheng B.L., He K., Kim C.H., Rogers L., Shao Y., Huang Z.Y., Lu Y., Yan S.J., Qien L.C. and Zheng Q.Y. (2000) Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology* **55(4)**: 598-602.
 68. Shin S., Park D., Jeon J.H., Joo S.S., Kim Y.B. and Kang H.G. (2008) Gelatinized and fermented powders of *Lepidium meyenii* (maca) improve physical stamina and epididymal sperm counts in male mice. *J. Emb. Trans.* **23**: 283-289.
 69. Ronceros G., Ramos W., Garmendia F., Arroyo J. and Gutierrez J. (2005) Eficacia de la maca fresca (*Lepidium meyenii* walp) en el incremento del rendimiento fisico de deportistas en altura. *An. Fac. Med.* **66(4)**: 269-273.

70. Sandoval M., Okuhama N.N., Angeles F.M., Melchor V.V., Condezo L.A., Lao J. and Miller M.J.S. (2002) Antioxidant activity of the cruciferous vegetable maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chem.* **79**: 207-213.
71. Yu L.J., Zhang Y.Z., Jin W.W., Ji Z.Y. and Xiong W.T. (2006) Anti - senility effect of ethanol extract in rhizome of *Lepidium meyenii* in mice. *Chin. Tradit. Herbal Drugs* **37(1)**: 81-83.
72. Kim S.H., Ahn N.Y., Hing C.H. and Kim K.J. (2011) The effect of acute and prolonged endurance swim exercise on antioxidant and mitochondrial enzymes in rat skeletal muscle. *Exerc. Sci.* **20(4)**: 359-366.
73. Ganzera M., Zhao J., Muhammad I. and Khan I.A. (2002) Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyenii* (maca) by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* **50(7)**: 988-991.
74. 식품의약품안전청. (2007) “일반시험법” . 제10장. 수록처: 식품공전. 서울: 한국식품공업협회.
75. Parcerisa J., Richardson D.G., Refecas M., Codony R. and Boatella J. (1998) Fatty acid, tocopherol and sterol content of some hazelnut varieties (*Corylus acellana* L.) harvested in Oregon (USA). *J. Chromatogr. A* **805**: 259-268.
76. Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R.M. (1998) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**: 152-178.

77. Matsumoto K., Ishihara K., Tanaka K., Inoue K. and Fushiki T. (1996) An adjustable-current swimming pool for the evaluation of endurance capacity of mice. *J. Applied Physiol.* **81**: 1843-1849.
78. Chun Y. and Yin Z.D. (1998) Glycogen assay for diagnosis of female genital chlamydia trachomatis infection. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1081-1082.
79. Choi E.H., Park J.H., Kim M.K. and Chun H.S. (2010) Alleviation of doxorubicin-induced toxicities by anthocyanin-rich bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract in rats and mice. *Biofactors* **36**: 319-327.
80. Shaik I.H. and Mehvar R. (2006) Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: application to the rat liver and bile samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**: 105-113.
81. Johansson L.H. and Borg L.A. (1998) A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal. Biochem.* **174**: 331-336.
82. Nabdi A. and Chatterjee I.B. (1988) Assay of superoxide dismutase activity in animal tissue. *J. Biosci.* **13**: 305-315.
83. Lee S.J. and Chun B.S. (2002) Extraction of volatile essential oil from citrus junos peel by supercritical carbon dioxide. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17(2)**: 148-152.
84. Lim S. and Jwa M.K. (2003) Optimization in extraction conditions of carotenoids from *citrus unshiu* press cake by supercritical carbon dioxide. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **35(6)**: 1104-1109.

85. Jung K., Lim I.H. and Han D. (2004) Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice. *J. Ethnopharmacol.* **93**: 75-81.
86. Zheng X., Long W., Liu G., Zhang. X. and Yang. X. (2012) Effect of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides ssp. sinensis*) leaf extract on the swimming endurance and exhaustive exercise-induced oxidative stress of rats. *J. Sci. Food Agric.* **92**: 736-742.
87. Zheng B.L., He K., Hwang Z.Y., Lu Y., Yan S.J., Kim C.H. and Zheng Q.Y. (2002) "Effect of aqueous extract from *Lepidium meyenii* on mouse behavior in forced swimming test" . Chap 18. In *Quality management of nutraceuticals*. Washington DC: Am. Chem. Soc.
88. Wilber C.G. (1959) Some factors which are correlated with swimming capacity in guinea pigs. *J. Applied physiol.* **14**: 199-203.
89. Kanter M.M. (1994) Free radicals, exercise, and antioxidant supplementation. *Int. J. Sport Nutr.* **4**: 205-220.
90. Liu J., Yeo H.C., Overvik-Douki E., Hagen T., Doniger S.J., Chyu D.W., Brooks G.A. and Ames B.N. (2000) Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl. Physiol.* **89**: 21-28.
91. Cao Y., Hu Y., Liu P., Zhao H. X., Zhou X. J. and Wei Y. M. (2012) Effects of a chinese traditional formular kai xin san (kxs) on chronic fatigue syndrome mice induced by forced wheel running. *J. Ethnopharmacol.* **139**: 19-25.
92. Reagan-Shaw S., Nihal M. and Ahmad N. (2007) Does translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* **22**: 659-661.

93. Lee K.J., Dabrowski K., Sandoval M. and Miller M.J.S. (2005)
Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal, their
antioxidant activities and effects on growth, feed utilization, and
survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles.
Aquaculture **244**: 293-301.

영문 요약

Optimization of Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) Extraction Process by Supercritical Extraction and Endurance Effects of Maca Extract

Jung Il Kang

Graduate Program in

Biomaterials Science and Engineering

The Graduate School

Yonsei University

Maca (*Lepidium meyenii* Walp.), a member of the Brassicaceae family, is grown on the highland in Peru. Maca has the various second metabolites and has been studied about fertility related effects. Most of the research focused on maca powder and solvent extracts. However there was not the study about extract containing high amounts of macamides, the unique ingredients in maca.

In this study, the maca lipidic extracts were collected from supercritical carbon dioxide (scCO₂) and two of macamides were identified as *N*-benzylhexadecanamide and *N*-benzyl-5-oxo-6*E*,8*E*-octadecadienamide by MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. Design of experiment including full

factorial and response surface methodology (RSM) was used to optimize the supercritical extraction process. The optimal condition for the maximum of yield and recovery of macamides was 38.6°C and 100 bar.

The effects of scCO₂ maca extracts containing macamides on swimming endurance capacity as an indicator of fatigue were investigated in weight-loaded forced swimming rats. The swimming times to exhaustion of rats supplemented for 3 weeks with 30 and 100 mg/kg of scCO₂ maca extracts increased by 25% and 41%, respectively. Supplementation with 100 mg/kg of maca extracts reduced serum lactate dehydrogenase (LDH) activity and muscle lipid peroxidation, and increased muscle citrate syntase (CS) and hepatic and muscle total glutathione compared with those values in controls. The levels of energy sources and serum lactate remained unchanged despite of the longer swimming time in the supplemented rats than those in controls.

These results suggest that supplementation with scCO₂ maca extracts containing macamides improved swimming endurance capacity and this effect can be explained by attenuation of exercise-induced oxidative stress.

Key words: maca, macamides, supercritical fluid extraction, RSM, endurance capacity, weight-loaded forced swimming test, antioxidant