

## 영지버섯(*Ganoderma lucidum* Krast) 추출물의 항산화 및 항돌연변이 효과

†오 세 인 · 이 미 숙\*

서일대학 식품영양과, \*한남대학교 식품영양학과

### Antioxidative and Antimutagenic Effects of *Ganoderma lucidum* Krast Extracts

†Se-In Oh and Mee-Sook Lee\*

Dept. of Food and Nutrition, Seoil College, Seoul 131-702, Korea

\*Dept. of Food and Nutrition, Hannam University, Taejon 306-791, Korea

#### Abstract

The antioxidative effect, antimutagenic capacity and inhibitory effect of cancer cell proliferation in ethanol extracts of *Ganoderma lucidum* were studied for suggestion of prevention and dietetic treatment of chronic diseases and development of antioxidative, antimutagenic and anticancer functional food by employing biological and biochemical assay. The IC<sub>50</sub> of MDA with BSA conjugation reaction, lipid peroxidation and scavenging effect on DPPH radical in ethanol extracts of *Ganoderma lucidum* showed 1026.21 mg/mL, 0.152 mg/mL and 0.412 mg/mL, respectively. So, the most effective antioxidative capacity in ethanol extracts of *Ganoderma lucidum* was the lipid peroxidation, among the method used this study. The indirect and direct antimutagenic effects of ethanol extracts of *Ganoderma lucidum* were examined by Ames test using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. The inhibition rates on indirect mutagenicity mediated by 2-Anthramine showed 100% in the *Salmonella typhimurium* TA98 and 98.74% in the *Salmonella typhimurium* TA100 and the direct mutagenicity mediated by sodium azide in *Salmonella typhimurium* TA100 was 82.96%. But, the inhibitory effect on indirect mutagenicity mediated by 2-Nitrofluorene in *Salmonella typhimurium* TA98 was low(7.81%). The inhibitory effect of *Ganoderma lucidum* ethanol extracts on cell proliferation in HeLa and MCF-7 by MTT test were 74.36% in HeLa and 73.90% in MCF-7 at the 0.50 mg/assay concentration and IC<sub>50</sub> were 0.163 mg/mL and 0.196 mg/mL respectively. From this result, it is suggested that *Ganoderma lucidum* is believed to have a possible antioxidative, antimutagenic and anticancer capacities.

Key words : MDA & BSA conjugation reaction, lipid peroxidation, DPPH radical scavenging effect, antimutagenicity

#### 서 론

최근 생활의 수준의 향상과 더불어 건강과 well being에 대한 관심이 급속히 높아져 가고 있으며 특히,

40대 중반에서부터 찾아오는 성인병의 예방과 치료에 대한 관심이 증가하고 있다. 이에 비만, 심순환계 질환, 암 등의 만성 성인병의 예방 및 치료를 위한 최신 의학의 연구와 더불어 천연물질 중 생리활성 조절물

본 연구는 2003년도 서일대학 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

† Corresponding author : Se-In Oh, Department of Food & Nutrition, Seoil College, #49-3 Myoenmok-8-Dong, Chungrang-Gu, Seoul, 131-702, Korea.

Tel : +82-2-490-7510, Fax : +82-2-490-7507, E-mail : ohssein@seoil.ac.kr

질 및 기능성 성분을 찾는 연구, 생체 내 항산화 효과, 항돌연변이 및 항암효능에 관한 연구가 국내외에서 활발하게 이루어지고 있으며 이를 건강의 유지와 증진을 위해 활용하고자 하는 연구가 진행되고 있다<sup>1~8)</sup>. 그 중에서도 버섯류에 대한 생리활성물질의 검색연구가 많이 보고되고 있다<sup>9~13)</sup>.

버섯류는 진균류에 속하는 담자균과 자낭균 중 자실체를 형성하는 고등균류로서 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질 및 비타민 등의 영양소를 골고루 함유하고 있을 뿐더러 독특한 맛과 향기를 지니고 있어 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 왔으며 자연식품, 저칼로리식품 및 무공해식품으로도 진가가 인정되는 식품이다. 특히 버섯의 항암작용, 면역증강 효과, 항산화 효과, 항돌연변이 효과, 혈당 강하, 콜레스테롤 저하, 뇌졸중, 신장병 등의 여러 가지 생리활성 기능을 나타내기 때문에<sup>9~13)</sup> 암이나 성인병에 대한 예방 및 개선효과가 기대되는 좋은 소재라 할 수 있고 최근에는 건강식품 및 의약품 소재로 널리 이용되고 있다. 만년버섯 또는 불로초라고도 불리는 구멍장이 버섯과 영지속에 속하는 영지버섯은 예부터 한방에서 건위, 건뇌, 강장, 강심, 이뇨, 해독, 항균, 면역, 진해, 진통, 신경쇠약, 불면증, 급만성 간염, 위궤양, 혈압강하 등에 효과가 있는 약용버섯으로서 이용되어 왔으나 최근 드링크제를 비롯한 식품으로서의 이용이 증대되고 있다.

최근 생체 내 각 조직에서 활성산소의 반응물질이 증가되어 암, 당뇨, 간경화증, 심혈관계질환 등의 여러 가지 질병이나 노화를 가져오는 것으로 보고되고 있다<sup>14)</sup>. 암화 과정의 개시단계에서 발생하는 세포 돌연변이는 DNA의 산화적 손상에 의해 초래되며, 그 원인 물질 중 하나가 산소를 소비하는 정상적인 세포 대사과정에서도 다량 생성되는 free radical이다<sup>14)</sup>. 즉 친전자성을 띤 free radical들은 세포 내 DNA의 친핵성 부위와 결합함으로써 세포변이를 일으키게 된다. 따라서 대사과정 중 free radical 생성은 세포의 암화에 밀접하게 연관되어 관여하는 것으로 보인다<sup>15)</sup>. 버섯류의 항산화 활성은 버섯류 추출물의 polyphenol 함량에 따라 free radical 제거활성, reducing power, Fe<sup>2+</sup> 이온의 chelating effect 등이 농도 의존적으로 증가하며<sup>9~11)</sup> 버섯류로부터 추출한 단백 다당체에 대한 free radical 제거활성도 보고되었다<sup>12,13)</sup>.

따라서 본 연구에서는 영지버섯 추출물의 생리적 기능에 대한 활성을 탐색하기 위하여 영지버섯(*Ganoderma lucidum* Krast)의 항산화 효과와 항돌연변이 효과 및 암세포 성장억제효과가 어느 정도인지 측정해

보고자 한다. 즉, 영지버섯 에탄올 추출물의 MDA에 대한 단백질의 보호효과와 lipid peroxidation 저해효과, DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radical 소거효과를 측정하여 단백질의 산화 및 유지류의 자동산화 반응에 대한 항산화 효과를 알아보았다. 또한 Ames test를 이용하여 영지버섯 에탄올 추출물의 직접 및 간접 돌연변이 유발 억제능을 탐색하였으며, MTT (methyl thiazolyl tetrazolium) assay로 자궁경부암세포(HeLa)와 유방암세포(MCF-7)의 증식저해 정도를 측정하여 영지버섯 에탄올 추출물의 항암효과를 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

영지버섯(*Ganoderma lucidum* Krast)을 구입하여 수세한 다음 동결건조하고, 분쇄한 후 밀봉·냉동보관(-20℃)하여 시료로 사용하였다.

### 2. 에탄올 추출물의 제조

영지버섯의 에탄올 추출물은 건조시료 일정량(5g)에 20배의 에탄올을 가하여 실온에서 24시간 동안 추출한 후 여과하는 과정을 2회 반복하였다. 여과액을 회전 진공증발기(EYELA, Rotary vacuum evaporator N-N series)로 농축한 후 최소량의 0.1M PBS(sodium phosphate buffer, pH 7.4)에 녹여 MDA와 BSA(Sigma, Bovine serum albumin) conjugation 반응을 위한 시료로 사용하였고, DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여 지질과 산화억제활성, DPPH 라디칼 소거활성, Ames test를 위한 시료로 사용하였고, 70% 에탄올에 녹여 MTT assay 시료로 사용하였다.

### 3. 항산화효과 측정

1) MDA & BSA Conjugation 반응 억제효과 측정 Park<sup>16)</sup>의 방법에 따라 Bovine serum albumin(BSA, 2 mg/mL), Malondialdehyde(MDA, 20 mM), 영지버섯 추출물, 0.1M PBS를 혼합하여 37℃에서 24시간 반응시켰다. 이때 BSA 단백질정량은 Bradford법을 사용하였고 MDA는 Gomez-Sanchez<sup>17)</sup>의 방법에 따라 제조하였다. 반응시킨 시료 500 μL를 Centricon(Amicon, Centricon YM-10)에 넣고 1,400×g에서 2시간 동안 원심분리하여(Beckman, Model J2-21 centrifuge) MDA와 BSA의 결합물을 분리한 후, 증류수 700 μL를 넣고 1,400×g에서 2시간 동안 원심분리하여 여분의 염 등을 세척하였다. 세척은 동일한 방법으로 3회 실시하였다.

세척한 시료를 분리하여 12% SDS-PAGE(SDS polyacryl amide gel electrophoresis)를 120V에서 3시간 동안 실시한 후, gel을 Coomassie 염색하여 Densitometer (Vilber Lourmat, BIO-1D Image Analysis)로 정량한 다음, 저해율(inhibition rate, %)을 산출하였다.

## 2) 지질과산화 억제효과 측정

Saija 등<sup>18)</sup>과 Haase 등<sup>19)</sup>의 방법에 따라  $Fe^{2+}$ 에 의해 유도된 linoleic acid의 과산화에 대한 억제활성을 TBA(Thiobarbituric acid, Sigma)로 발색시켜 측정하였다. 10 mL의 10 mM linoleic acid 용액에 시료 20  $\mu$ L를 가하고 37°C shaking incubator에서 1시간 동안 shaking 시킨 후, 0.05 M iron sulfate( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 20  $\mu$ L를 첨가한 다음 다시 37°C에서 2시간 동안 shaking하여 과산화 반응을 유발시켰다. 처리된 linoleic acid 용액 800  $\mu$ L를 4°C에서 10 min 동안 tempering시키고, 400  $\mu$ L의 TBA를 첨가한 다음 잘 혼합한 후 boiling water bath에서 15 min 동안 처리한 후 흐르는 물에 냉각시켰다. 냉각된 용액에 n-butanol 1,120  $\mu$ L를 가하고 잘 섞은 다음 250×g로 20 min 동안 원심분리하여(Hanil, Union 5 KR) n-butanol 층을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정(Molecular Devices, SpectraMAX 340 pc)하였다.  $Fe^{2+}$ 에 의해 유도된 linoleic acid의 과산화에 대한 억제활성을 TBA로 발색시킨 것을 100%로 가정하였을 때, 영지버섯 에탄올 추출물을 첨가하여 50%로 감소시킬 수 있는 농도를  $IC_{50}$ 으로 나타내었고, inhibition rate(%)를 산출하였다.

## 3) DPPH 라디칼 소거 활성

Chen 등<sup>20)</sup>의 방법에 따라 DMSO 10  $\mu$ L(대조구)와 DMSO에 녹여 농도별로 희석한 시료 10  $\mu$ L에 200  $\mu$ M DPPH/ethanol 190  $\mu$ L를 가한 후, 37°C에서 30 min 동안 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(Molecular Devices, SpectraMAX 340pc). 대조구에 대해 시료를 넣었을 때의 흡광도의 감소 정도를 측정하였다. 대조구의 흡광도를 100%로 하였을 때 영지버섯 에탄올 추출물을 첨가하여 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 시료의 농도를  $IC_{50}$ 으로 나타내고, inhibition rate(%)를 산출하였다.

## 4. 항돌연변이능 측정

*Salmonella typhimurium* TA98, TA100 균주를 이용하여 항돌연변이능을 측정하였다. 정기적으로 이들 균주의 histidine 요구성, deep rough(*rfa*)돌연변이, *uvrB* 돌연변이와 R factor 등의 유전형질을 확인하였다. 이

들 균주는 nutrient broth(Difco)에 접종, 배양하여 현탁액 1 mL당 DMSO 90  $\mu$ L를 가하여 냉동보관용 tube에 채워 액체질소(Thermolyne, Bio Cane<sup>TM</sup> 20)에 보관하면서 사용하였다. Master plate에 배양한 균주를 nutrient broth에 접종하여 37°C에서 14~16시간 동안 진탕배양(Vison Scientific Co., KMC-8480S)한 후  $1 \sim 2 \times 10^9$  cells/mL의 밀도가 되도록 하여 실험에 사용하였다.

돌연변이 유발물질로는 간접 또는 직접돌연변이 물질을 사용하였는데 간접돌연변이 물질로는 환경성 돌연변이 물질인 2-AA(Anthramine, Sigma)를 사용하였고, 직접돌연변이 물질로는 2-NF(2-Nitrofluorene, Aldrich)와 sodium azide phosphate(Sigma)를 사용하였다. 2-AA와 2-NF는 DMSO에 녹여 사용하였고, sodium azide phosphate는 증류수에 녹여 사용하였다. 각 돌연변이 유발물질은 2-AA의 경우 TA98과 TA100에서 2.5  $\mu$ g/plate, 2-NF는 TA98에서 4  $\mu$ g/plate, sodium azide phosphate는 TA100에서 2  $\mu$ g/plate의 농도로 사용하였다.

항돌연변이 유발실험을 위한 배지 및 시약의 조제는 Maron과 Ames의 방법<sup>21)</sup>에 따라 행하였으며 Matsu-shima 등의 방법<sup>22)</sup>에 따라 실험하였다. 모든 실험은 ice bath상에서 행하였고 중복 실험하였다. 대사활성 물질이 필요한 간접돌연변이 물질을 사용할 때는 S9 mix(Moltox, 11-01L RAT LIVER LS-9)를 첨가하였다. DMSO에 녹인 시료 90  $\mu$ L와 배양한 실험균주 0.1 mL, 돌연변이 유발물질 10  $\mu$ L, 직접돌연변이원에는 0.5 mL의 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를, 간접돌연변이원에는 0.5 mL의 S9 mix를 멸균된 시험관에 첨가한 후 가볍게 vortex하여 37°C shaking water bath(Vison Co., KMC-1205SW1)에서 30분 동안 예비 배양하였다. 0.5 mM histidine/biotin 용액을 100 mL당 10 mL 첨가한 45°C 정도의 Top agar를 2 mL씩 각 시험관에 붓고 3초간 vortex한 후 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 한 후 굳게 하였다. 그 다음 plates를 뒤집어 37°C incubator(Vison scientific Co., VS-1203P3)에서 48시간 배양한 후 각각의 복귀돌연변이주(revertant colonies)를 계수하였고 돌연변이 억제율(inhibition rate, %)을 구하였다.

## 5. 암세포 증식 억제능 측정

인체 자궁경부암세포인 HeLa(uterus adenocarcinoma, 10002), 유방암 세포인 MCF-7(breast adenocarcinoma, 30022)을 분양받아 각각 5% fetal bovine serum(FBS)와 항생제가 포함된 DMEM 배양액과 RPMI-1640 배양액에서 배양하였다. 영지버섯추출물의 암세포 증식 억제능은 MIT assay<sup>23)</sup>로 실험하였다. 즉, 암세포를  $1 \times 10^4$

cells/well 농도로 48 well plate에 분주 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양 후 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지 190 μL와 영지버섯추출물 10 μL를 첨가하여 다시 72시간 배양하였다. 배양완료 후 배지를 제거하고 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액 30 μL를 분주한 후 동일한 배양조건에서 4시간을 배양 후 MTT시약이 포함된 배지를 제거하고, 각 well에 DMSO 300 μL를 가한 후 ELISA reader(Molecular Devices, Spectra MAX 340pc)로 517 nm에서 흡광도를 측정하여 억제율(inhibition rate, %)을 구하였다.

**6. 통계처리**

실험의 결과는 SAS 프로그램을 이용하여 처리하였다. 각 실험군마다 데이터의 평균과 표준 오차를 산출하였고, 각 실험군의 평균치간의 차이의 유의성은 ANOVA 실시 후 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

**결과 및 고찰**

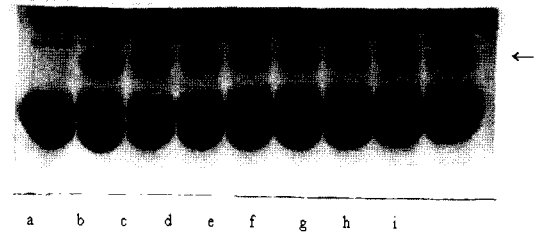
**1. 항산화효과**

**1) MDA & BSA Conjugation 억제효과**

두 개의 aldehyde기를 가진 MDA는 단백질 내부의 아미노산 잔기들 사이뿐만 아니라 외부 단백질분자의 잔기 사이에서도 교차결합을 일으킬 수 있다<sup>16)</sup>. 영지버섯 에탄올 추출물을 농도별로 첨가하여 MDA-BSA의 교차결합(cross-linking) 형성을 차단하여 단백질을 보호하는 정도를 비교한 전기영동 실험 결과는 Fig. 1과 같고, 이를 대조군의 저해율로 표시한 결과는 Table 1과 같다. 시료의 농도가 10 mg/mL이었을 때 저해율은 20.50%였고, 시료의 농도가 그의 10배인 100 mg/mL이었을 때 저해율은 32.53%로 영지버섯 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 저해율이 높아져 농도 의존적인 효과가 있었고 IC<sub>50</sub>은 1026 mg/mL였다.

**2) 지질과산화 억제효과**

Fe<sup>2+</sup>에 의해 유도된 linoleic acid의 자동산화에 대한 영지버섯 추출물의 농도별 저해율(inhibition rate, %)을 살펴보면(Table 2) 시료 농도 0.01 mg/mL시 16.89%, 0.1 mg/mL시 50.86%의 저해율을 보였으며, 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 지질과산화 저해율이 증가하였다. Fe<sup>2+</sup>에 의해 유도된 linoleic acid의 과산화에 대한 억제활성을 TBA로 발색시킨 것을 100%로 가정하였을 때, 영지버섯 에탄올 추출물을 첨가하여 50%



**Fig 1. Inhibitory effects of *Ganoderma lucidum* extracts on conjugated MDA with BSA in 12% SDS-PAGE.**

- a: BSA(100 μL)+PBS(900 μL).
- b: BSA(100 μL)+MDA(100 μL)+PBS(800 μL).
- c: BSA(100 μL)+MDA(100 μL)+sample(2.5 μL)+PBS(797.5 μL).
- d: BSA(100 μL)+MDA(100 μL)+sample(5 μL)+PBS(795 μL).
- e: BSA(100 μL)+MDA(100 μL)+sample(10 μL)+PBS(790 μL).
- f: BSA(100 μL)+MDA(100 μL)+sample(20 μL)+PBS(780 μL).
- g: BSA(100 μL)+MDA(100 μL)+sample(40 μL)+PBS(760 μL).
- h: BSA(100 μL)+MDA(100 μL)+sample(80 μL)+PBS(720 μL).
- i: BSA(100 μL)+MDA(100 μL)+sample(100 μL)+PBS(700 μL).

**Table 1. Inhibition rate of ethanol extracts of *Ganoderma lucidum* on the conjugated MDA with BSA**

Conc. (mg/mL)	Inhibition rate (%)
2.5	3.63 ± 0.26 <sup>1)a</sup>
5.0	8.97 ± 1.96 <sup>a</sup>
10.0	20.50 ± 3.36 <sup>b</sup>
20.0	22.20 ± 3.29 <sup>bc</sup>
40.0	26.33 ± 3.37 <sup>bcd</sup>
80.0	29.90 ± 2.40 <sup>cd</sup>
100.0	32.53 ± 2.86 <sup>d</sup>
IC <sub>50</sub> <sup>3)</sup> (mg/mL)	1026.21

<sup>1)</sup> Values are mean ± SE.  
<sup>2)</sup> Values followed by different letters are significantly different at p<0.0001.  
<sup>3)</sup> Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve.

로 지질과산화를 감소시킬 수 있는 농도(IC<sub>50</sub>)는 0.152 mg/mL이었다.

**3) DPPH 라디칼 소거 효과**

영지버섯 에탄올 추출물의 항산화능을 DPPH에 대한 전자공여능(electron donating ability) 즉, DPPH 라디칼 소거능으로 측정된 결과(Table 3) 영지버섯 에탄올

**Table 2. Antioxidative effects of ethanol extracts of *Ganoderma lucidum* on lipid peroxidation**

Conc. (mg/mL)	Inhibition rate (%)
0.001	6.27±1.20 <sup>1)a</sup>
0.003	11.30±0.76 <sup>b</sup>
0.010	16.89±0.72 <sup>c</sup>
0.030	32.82±1.51 <sup>d</sup>
0.100	50.86±1.06 <sup>e</sup>
IC <sub>50</sub> <sup>3)</sup> (mg/mL)	0.152

<sup>1)</sup> Values are mean±SE.

<sup>2)</sup> Values followed by different letters are significantly different at p<0.0001.

<sup>3)</sup> Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve.

**Table 3. Scavenging effects of DPPH radical by ethanol extracts of *Ganoderma lucidum***

Conc. (mg/mL)	Inhibition rate (%)
0.01	3.90±2.12 <sup>1)a</sup>
0.03	6.53±2.32 <sup>ab</sup>
0.10	12.51±2.25 <sup>b</sup>
0.30	29.82±2.60 <sup>c</sup>
1.00	67.20±1.00 <sup>d</sup>
2.50	92.52±2.23 <sup>e</sup>
IC <sub>50</sub> <sup>3)</sup> (mg/mL)	0.412

<sup>1)</sup> Values are mean±SE.

<sup>2)</sup> Values followed by different letters are significantly different at p<0.0001.

<sup>3)</sup> Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve.

추출물의 DPPH 라디칼 소거율은 시료농도 0.1 mg/mL시 12.51%, 0.3 mg/mL시 29.82%, 1.0 mg/mL시 67.20%, 2.5 mg/mL시 92.52%의 라디칼 제거능을 나타내었다. 영지버섯 에탄올 추출물의 처리농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가함을 알 수 있었다. 송 등<sup>24)</sup>이 보고한 짙레영지버섯 추출물의 DPPH 라디칼 제거활성은 0.1 mg/mL에서는 28.1%, 0.5 mg/mL에서는 62.5%, 1.0 mg/mL 처리 시 91.3%로 본 연구보다 높은 DPPH 제거 활성을 나타냈으나 농도의

존적인 경향은 같았다. 또한 DPPH를 첨가하여 안정한 라디칼을 발생시키는 농도를 100%로 하였을 때, 영지버섯 에탄올 추출물을 첨가하여 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)는 0.412 mg/mL였다. 이와 같은 라디칼 제거 활성은 Kang 등<sup>25)</sup>이 보고한 버섯 자실체 추출물 내에 존재하는 flavonoids 및 기타 phenol 성 물질에 의한 작용으로 산화성 생물활성 자유라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 효과가 영지버섯에도 존재함을 확인할 수 있었다.

영지버섯 에탄올 추출물의 항산화 효과를 탐색하기 위해 MDA와 BSA conjugation 반응, 지질 과산화 억제 활성, DPPH 라디칼 소거 활성을 측정 한 결과, 영지버섯 에탄올 추출물은 각각의 측정법에 대해 항산화 효과가 있었으나 측정법에 따라 항산화효과의 정도는 차이가 있었다. IC<sub>50</sub>은 MDA와 BSA conjugation 억제 반응에서 1026 mg/mL로 가장 농도가 높았으며 다음은 DPPH 라디칼 소거 활성으로 0.412 mg/mL였으며 가장 낮은 농도의 IC<sub>50</sub>은 지질과산화 억제 활성으로 0.152 mg/mL였다. 따라서 영지버섯 에탄올 추출물은 지질과산화 억제활성이 상대적으로 가장 우수함을 알 수 있었고 그 다음은 DPPH 라디칼 소거활성이었으며 단백질 산화를 억제하는 효과는 가장 적었음을 알 수 있었다.

## 2. 항돌연변이능

Ames test로 영지버섯 에탄올 추출물의 직접작용 항돌연변이능을 측정하기 위하여 직접돌연변이 물질인 2-Nitrofluorene(4 µg/plate)를 돌연변이주인 *Salmonella typhimurium* TA98에, Sodium azide(2 µg/plate)를 사용하여 염기쌍 치환 변이주인 *Salmonella typhimurium* TA100으로 실험한 결과는 Table 4와 Fig. 2와 같다. *Salmonella typhimurium* TA98에서 직접작용 돌연변이능에 대한 저해 효과는 영지버섯 에탄올 추출물 농도 0.28~2.25 mg/plate까지 항돌연변이능이 없었으며, 4.50 mg/plate 농도에서 7.81%의 낮은 항돌연변이 작용을 보여주었다. *Salmonella typhimurium* TA100인 경우는 0.28 mg/plate 농도에서 5.98%, 0.56 mg/plate 농도에서 28.02%, 0.73 mg/plate 농도에서 59.67%, 4.50 mg/plate 농도에서 82.96%의 항돌연변이능을 보여주어 영지버섯 에탄올 추출물 농도가 증가할수록 항돌연변이능도 증가함을 알 수 있었다.

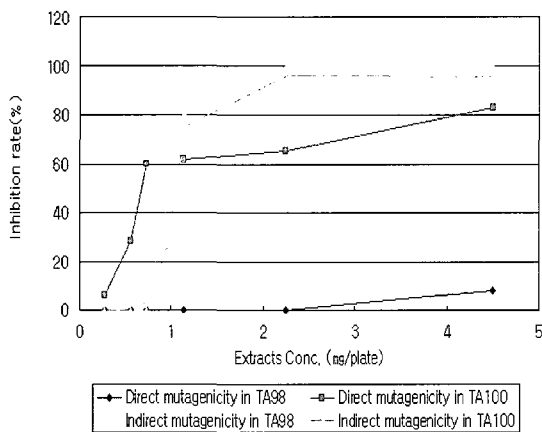
환경성 돌연변이 물질인 2-Anthramine(2.5 µg/plate)을 사용하여 *Salmonella typhimurium* TA98과 *Salmonella typhimurium* TA100으로 영지버섯 에탄올 추출물의 간접작용 항돌연변이능을 측정 한 결과는 Table 5와 Fig.

**Table 4. Effects of ethanol extracts from *Ganoderma lucidum* on direct mutagenicity mediated by 2-nitrofluorene in *Salmonella typhimurium* TA98 and sodium azide in *Salmonella typhimurium* TA100**

Extracts conc. (mg/plate)	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98		<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	
	Revertants/plate	Inhibition rate(%)	Revertants/plate	Inhibition rate(%)
0.28	1323 ± 15 <sup>1)</sup>	0 <sup>a</sup>	2217 ± 12	5.98 ± 2.34 <sup>a</sup>
0.56	1120 ± 13	0 <sup>a</sup>	1743 ± 227	28.02 ± 10.89 <sup>b</sup>
0.73	.	.	1063 ± 43	59.67 ± 2.70 <sup>c</sup>
1.13	856 ± 14	0 <sup>a</sup>	1025 ± 41	61.59 ± 1.99 <sup>c</sup>
2.25	797 ± 19	0 <sup>a</sup>	956 ± 160	64.98 ± 7.07 <sup>c</sup>
4.50	699 ± 12	7.81 ± 3.32 <sup>b</sup>	571 ± 122	82.96 ± 5.48 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup> Values are mean ± SE.

<sup>2)</sup> Values followed by different letters are significantly different at p<0.0001.



**Fig. 2. Effects of ethanol extracts from *Ganoderma lucidum* on indirect mutagenicity mediated by 2-anthramine in *Salmonella typhimurium* TA98 and *Salmonella typhimurium* TA100 with S9mix and direct mutagenicity mediated by 2-nitrofluorene in *Salmonella typhimurium* TA98 and sodium azide in *Salmonella typhimurium* TA100.**

2와 같다. 간접작용 돌연변이능에 대한 저해 효과는 *Salmonella typhimurium* TA98에서 0.28~0.73 mg/plate 영지버섯 에탄올 추출물 농도에서는 효과가 없었으나 0.96 mg/plate에서 43.25%, 1.13 mg/plate에서 80.71% 2.25 mg/plate에서 99.87%의 돌연변이 저해효과가 있었다. *Salmonella typhimurium* TA100에서는 영지버섯 에탄올 추출물의 농도가 0.96 mg/plate일 때 25.51%, 1.13 mg/plate일 때 74.40%, 2.25 mg/plate일 때 95.97%를 저해하였다.

영지버섯류의 항돌연변이능 측정 결과, 영지버섯류 에탄올 추출물이 간접작용 돌연변이원에 관여한 전구 물질을 최종 돌연변이물질로 전환되는 것을 방지하는데는 영지버섯 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 효과적이나 활성화된 돌연변이 물질에 직접 결합하여 돌연변이성을 제거하는 작용은 적으리라 추측된다. 특히, 직접돌연변이 물질인 2-Nitrofluorene를 처리한 *Salmonella typhimurium* TA98의 항돌연변이 효과는 본

**Table 5. Effects of ethanol extracts from *Ganoderma lucidum* on indirect mutagenicity mediated by 2-anthramine in *Salmonella typhimurium* TA98 and *Salmonella typhimurium* TA100 with S9mix**

Extracts conc. (mg/plate)	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98		<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	
	Revertants/plate	Inhibition rate(%)	Revertants/plate	Inhibition rate(%)
0.28	2813 ± 50 <sup>1)</sup>	0 <sup>a</sup>	2849 ± 29	0 <sup>a</sup>
0.56	2877 ± 43	0 <sup>a</sup>	3025 ± 24	0 <sup>a</sup>
0.73	2487 ± 73	0 <sup>a</sup>	2084 ± 20	3.50 ± 2.15 <sup>a</sup>
0.96	1172 ± 101	43.25 ± 5.04 <sup>b</sup>	1647 ± 23	25.51 ± 1.61 <sup>b</sup>
1.13	419 ± 35	80.71 ± 2.15 <sup>c</sup>	691 ± 45	74.40 ± 1.99 <sup>c</sup>
2.25	37 ± 2	99.87 ± 0.10 <sup>d</sup>	266 ± 17	95.97 ± 0.80 <sup>d</sup>
4.50	36 ± 4	99.78 ± 0.14 <sup>d</sup>	256 ± 19	95.54 ± 1.21 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup> Values are mean ± SE.

<sup>2)</sup> Values followed by different letters are significantly different at p<0.0001.

실험조건에서는 거의 없는 것으로 사료된다.

### 3. 암세포증식 억제효과

인체 자궁경부암 세포인 HeLa와 유방암 세포인 MCF-7에 영지버섯 에탄올 추출물을 농도별로 첨가하여 암세포 증식억제 정도를 알아본 결과는 Table 6 및 Fig. 3과 같다. HeLa 세포의 경우 영지버섯 에탄올 추출물 농도가 0.05 mg/mL이었을 경우 HeLa 세포수는 18.20%, 0.15 mg/mL이었을 경우 51.71%, 0.50 mg/mL이었을 경우 74.36% 저해되었으며 그 이상의 농도에

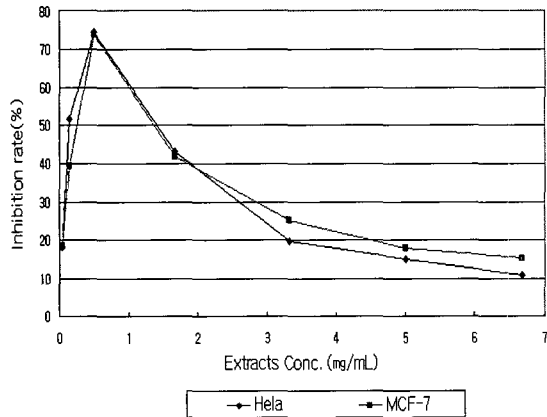


Fig. 3. Inhibitory effect of *Ganoderma lucidum* extracts on cell proliferation in HeLa and MCF-7.

Table 6. Inhibitory effect of *Ganoderma lucidum* extracts on cell proliferation in HeLa and MCF-7

Extracts conc. (mg/mL)	HeLa	MCF-7
	Inhibition rate(%)	
0.05	18.20±2.55 <sup>1),b</sup>	18.40±2.44 <sup>a</sup>
0.15	51.71±3.15 <sup>d</sup>	39.14±2.50 <sup>c</sup>
0.50	74.36±1.25 <sup>e</sup>	73.90±2.86 <sup>d</sup>
1.67	43.13±3.28 <sup>c</sup>	41.65±1.30 <sup>c</sup>
3.33	19.66±1.35 <sup>b</sup>	25.09±2.22 <sup>b</sup>
5.00	14.89±1.35 <sup>bc</sup>	17.91±1.41 <sup>a</sup>
6.67	10.70±0.83 <sup>a</sup>	15.02±1.13 <sup>a</sup>
IC <sub>50</sub> <sup>3)</sup> (mg/mL)	0.163	0.196

<sup>1)</sup> Values are mean±SE.

<sup>2)</sup> Values followed by different letters are significantly different at  $p < 0.0001$ .

<sup>3)</sup> Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve.

서는 영지버섯 에탄올 추출물 농도가 증가할수록 오히려 암세포 증식억제효과가 감소하였다. 송 등의 연구에 의하면<sup>24)</sup> 자궁암 세포주인 HeLa의 경우 찹쌀 영지버섯 추출물 5 mg/mL 이하의 농도에서는 억제율이 16% 이하로 낮았으나 50 mg/mL에서는 45%로 증가하였으며 100 mg/mL의 농도처리 시에는 오히려 증식억제율이 감소하였다. 본 연구와 세포 증식 억제효과의 증감 경향은 유사하나 본 연구에서 더 낮은 농도에서 더 높은 증식억제율을 보였다. 이는 송 등의 연구에서<sup>24)</sup> 사용한 시료가 농축하지 않는 시료를 사용하였기 때문이라고 사료된다. 영지버섯 에탄올 추출물을 첨가하여 자궁경부 암세포 증식을 50%로 감소시킬 수 있는 농도(IC<sub>50</sub>)는 0.163 mg/mL이었다.

유방암 세포인 MCF-7의 경우 0.05~0.5 mg/mL 영지버섯 에탄올 추출물 농도가 증가할수록 세포 증식억제 효과가 증가하였고 0.5 mg/mL이었을 경우 유방암 세포수는 73.90% 저해되었으며 그 이상의 농도에서 HeLa 세포에서와 마찬가지로 세포 증식억제 효과가 감소하였다. 영지버섯 에탄올 추출물을 첨가하여 50%로 유방암 암세포 증식을 감소시킬 수 있는 농도(IC<sub>50</sub>)는 0.196 mg/mL이었다. 영지버섯 에탄올 추출물을 0.50 mg/mL로 처리하면 인체 자궁경부암세포인 HeLa와 유방암 세포인 MCF-7에서 모두 70% 이상의 세포증식 억제 효과가 있었음을 알 수 있었다.

영지버섯의 새로운 약효성분의 개발에 관한 연구<sup>26)</sup>에서 간암세포 SK-Hep-1에 대한 MIT assay 결과 0.1 mg/mL의 농도에서 중성분확인 클로로포름층이 세포 증식 억제 효과가 90.4%로 가장 높다고 보고되었다. 또한 영지버섯을 마우스에 식이로 투여하였을 때 벤조피렌으로 유발된 폐선종 발생율이 억제되었으며<sup>28,29)</sup> 영지버섯의 분자량 40,000 이상의 다당체 분획이 sarcoma 180 암세포를 이식한 마우스에서 항종양 효과가 있었으며<sup>27,30)</sup> diethyl nitrosamine 투여에 의해 유도되는 간의 GST-P positive foci를 관찰함으로써 영지버섯 수용성 추출물의 투여가 간의 발암 전 병변진행을 억제한다고 보고되었다<sup>30)</sup>.

## 요약 및 결론

예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용하는 영지버섯 추출물의 생리적 기능에 대한 활성을 탐색하기 위하여 영지버섯(*Ganoderma lucidum* Krast)의 에탄올 추출물의 MDA에 대한 단백질의 보호 효과, linoleic acid를 이용한 지질 과산화 억제, DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하여 항산화 효과를 측정하였고 Ames test를

통한 돌연변이 유발 억제능을 탐색하였으며 인체 자궁경부암 세포인 HeLa와 유방암 세포인 MCF-7에 영지버섯 에탄올 추출물을 첨가하고 첨가 수준에 따라 암세포 증식 억제 정도를 알아본 결과는 다음과 같다.

1. MDA에 대한 단백질 보호효과를 알아본 결과 영지버섯 추출물은 MDA의 교차결합 형성을 31.68% 저해하였고 처리농도가 증가할수록 저해율은 증가하였고, Fe<sup>2+</sup>에 의해 유도된 지질의 과산화에 대한 저해율은 50.86%였으며 농도가 증가할수록 지질 과산화 저해율은 증가하였다. 또한 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 92.52%의 높은 저해율을 보였으며 농도 증가에 따라 저해율은 증가하였다. 따라서 각 측정법에 따라 항산화효과에 차이가 있었는데 IC<sub>50</sub> 값으로 항산화능의 상대적 비교를 하였을 때 영지버섯 추출물은 지질 과산화 억제능이 가장 강하였으며, 그 다음은 DPPH 라디칼 소거활성이었고 MDA와 BSA의 교차결합 억제능은 가장 낮았다.
2. Ames test를 이용하여 돌연변이 유발 억제능을 알아본 결과 영지버섯 추출물은 직접작용 돌연변이능에 대한 저해작용은 *Salmonella typimurium* TA98에서 100.00%, *Salmonella typimurium* TA100에서 98.74%를 저해하여 탁월하였으나 간접작용 돌연변이능에 대한 저해 효과는 비교적 적었으며 특히, 직접돌연변이 물질인 2-Nitrofluorene를 처리한 경우 *Salmonella typimurium* TA98에서 항돌연변이 효과는 거의 없는 것으로 사료된다.
3. MIT assay로 암세포 증식억제효과를 살펴본 결과 인체 자궁경부암 세포인 HeLa 세포수와 유방암 세포인 MCF-7인 경우 모두에서 영지버섯 에탄올 추출물 농도가 0.50 mg/assay까지 농도가 증가할수록 암세포 증식억제 효과가 증가하였으며 그 이상의 농도에서는 농도가 증가할수록 암세포 증식효과가 감소하였다. 영지버섯 에탄올 추출물 농도가 0.50 mg/assay이었을 경우 HeLa 세포에서는 74.36%, MCF-7는 73.90% 저해되었으며 IC<sub>50</sub>는 각각 0.163, 0.196 mg/mL이었다.

본 연구의 결과로 영지버섯은 항산화성, 항돌연변이성, 항암성이 있음을 알 수 있었고 이를 토대로 영지버섯을 상용함으로써 광범위하게는 만성 성인병의 예방 및 치료에 효과가 있으리라 사료된다. 또한 본 연구의 결과는 영지버섯을 기능성 식품으로 개발할 수 있는 기초자료로 활용될 수 있으리라 본다.

## 참고문헌

1. Farag, RS, Badei, AZMA and Baroty, GSAE. Influence of thyme and clove essential oils in cotton seed oil oxidation. *JAACS* 66:800-804. 1989
2. Lrson, RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27:969-978. 1988
3. Colditz, GA, Branch, LG, Lipnick, RJ, Willett, WC, Rosner, B, Posner, BM and Hennekens, CH. Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer deaths in an elderly population. *Am. J. Clin. Nutr.* 41:32-36. 1985
4. Kim, JO, Kim, YS, Lee, JH, Kim, MN, Rhee, SH, Moon, SH and Park, KY. Antimutagenic effect of the major volatile compounds identified from Mugwort (*Artemisia asiatica* Nakai) leaves. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21(3):308-313. 1992
5. Tada, M, Matsumoto, R, Yamaguchi, H and Chiba, K. Novel antioxidants isolated from *Perilla frutescens* Britton var. *crisp*(Thunb.). *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(8):1093-1095. 1996
6. Park, KY, Lee, KI and Rhee, SH. Inhibitory effect of green-yellow vegetables on the mutagenicity in *Salmonella* assay system and on the growth of AZ-521 human gastric cancer cells. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21:149-153. 1992
7. Lee, KI, Rhee, SK, Park, KY and Kim, JO. Antimutagenic compound identified from perilla leaf. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21(3):302-307. 1992
8. Park, JG, Hyun, JW, Lim, KH, Shin, JE, Won, YJ, Yi, YD, Shin, KH, Chnag, IM and Woo, WS. Antineoplastic effects from traditional medicinal plants. *Korean J. Pharmacol.* 24:223-230. 1993
9. Cheung, LM, Cheung, PCK and Ooi, VEC. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.* 80:1-7. 2003
10. Mau, JL, Lin, HC and Song, SF. Antioxidant properties of several speciality mushroom. *Food Res. Int.* 35:519-526. 2002.
11. Yang, JH, Lin, HC and Mau, JL. Antioxidant properties of several commercial mushroom. *Food Chem.* 77:229-2357. 2002
12. Lie, F, Ooi, VEC and Chang, ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide ext-



- racts. *Life Sci.* 60:763-771. 1997
13. Lee, BC, Bae, JT, Pyo, HB, Choe, TB, Kim, SW, Hwang, HJ and Yun, JW. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enz. Microb. Technol.* 6274:1-8. 2003
  14. Comporti, M. Lipid, peroxidation: An overview. In: Free Radicals: From Basic Science to Medicine: Molecular and cell biology updates (Poli G, Albano E & Dianzani MU, eds.), pp. 65-79. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. 1993
  15. Meneghini, R, Martins, EAL and Calderaro, M. DNA damage by reactive oxygen species: The role of metal. In: Free Radicals: From Basic Science to Medicine: Molecular and cell biology updates (Poli G, Albano E & Dianzani MU, eds.), pp. 102-112. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. 1993
  16. Park, YH. Effect of polyamine on modification of biomodics by aldehyde. PhD in Medicine Thesis. Seoul National University, 2000
  17. Gomez-Sanchez, A, Hermons, I and Mayo, I. Cleavage and oligomerization of malondialdehyde under physiological conditions. *Tetrahedron Letters* 28: 4077-4080. 1990
  18. Saija, A, Scalese, M, Lanza, M, Marzullo, D, Bonina F and Castelli, F. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology & Medicine* 19(4): 481-486. 1995
  19. Haase, G and Dunkley, WL. Ascorbic acid and copper in linoleate oxidation. I. Measurement of oxidation by ultraviolet spectrophotometry and the thiobarbituric acid test. *Journal of Lipid Research* 10: 555-560. 1969
  20. Chen, HM, Muramoto, K, Yamauchi, F, Fujimoto, K and Nokihara, K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agricultural & Food Chem.* 46:49-53. 1998
  21. Maron, DM and Ames, BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113:173-215. 1983
  22. Mutsushima, T, Sugimura, T, Nagao, M, Yahagi, T, Shirai, A and Sawamura, M. Factors modulating mutagenicity in microbial test, In "Short-term test, systems for detecting carcinogens". Norphth KH and Garner RC (eds.), Springer, Berling, p. 273. 1980
  23. Denizot, F and Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89:271-277. 1966
  24. Song, JH, Lee, HS, Hwang, JK, Chung, TY, Hong, SR and Park, KM. Physiological activities of *Phellinus ribis* Extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35(4):690-695. 2003
  25. Kang, YH, Park, YK and Lee, GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28:232-239. 1996
  26. Bok, JW, Lee, SK, and Kim, BK. Studies of development of new pharmacologically active components of *Ganoderma lucidum*. *J. Korean Biochem.* 27:149-153. 1994
  27. Miyasaki, T and Nishijima, M. Studies on fungal polysaccharides. XVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 29:3611. 1981
  28. Yun, TK and Kim, SH. Inhibition of development of benzo(a) pyrene-induced mouse pulmonary adenoma by several natural products in medium-term bioassay system. *J. Korean Cancer Res. Assoc.* 20:133. 1988
  29. Yun, TK and Lee, YS. Effects of *Ganoderma lucidum* on mouse pulmonary adenoma induced by benzo(a) pyrene. *J. Korean Cancer Assoc.* 25(4):531-538. 1993
  30. Kim, JS and Lee, YS. Effects of *Ganoderma lucidum* extract on the development of rat liver preneoplastic lesions. *Korean J. Toxicol.* 5:135. 1989

---

(2005년 1월 13일 접수; 2005년 2월 7일 채택)