

## 장수상황버섯 균사체를 이용한 한약재의 고체발효 및 메탄올 추출물의 트롬빈 저해 활성과 항산화 활성

신용규<sup>1,2</sup> · 장한수<sup>3</sup> · 김종식<sup>4</sup> · 류희영<sup>5</sup> · 김종국<sup>1</sup> · 권인숙<sup>5</sup> · 손호용<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 미생물학과, <sup>2</sup>(주) 바이온 생물공학연구소, <sup>3</sup>경북바이오산업연구원  
<sup>4</sup>안동대학교 생명과학과, <sup>5</sup>안동대학교 식품영양학과

**Solid Fermentation of Medicinal Herb Using *Phellinus baumii* Mycelium and Anti-thrombin and Anti-oxidation Activity of its Methanol Extract.** Shin, Yong Kyu<sup>1,2</sup>, Han-Su Jang<sup>3</sup>, Jong-Sik Kim<sup>4</sup>, Hee-Young Ryu<sup>5</sup>, Jong-Kuk Kim<sup>1</sup>, In-Sook Kwun<sup>5</sup>, and Ho-Yong Sohn<sup>5,\*</sup>. <sup>1</sup>Dept. of Microbiology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, <sup>2</sup>Research Institute of Biotechnology, Bion Co., Ltd., Andong 760-380, Korea, <sup>3</sup>Gyeongbuk Institute for Bioindustry, Andong 760-380, Korea, <sup>4</sup>Dept. of Biological Science, and <sup>5</sup>Dept. of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea – To produce bioactivity-strengthen medicinal herbs, the 36 medicinal herbs which have antioxidation or blood circulation activity, were solid fermented using *Phellinus baumii* mycelium. Most of medicinal herbs, except *Chrysanthemum indicum* (flower), *Zizyphus jujuba* Miller (fructus), *Aconitum koreanum* R. Raymond (root), *Magnolia denudata* (flower), and *Polygonatum sibiricum* Redt (root bark), showed good fermentation at 25°C for 20 days under 90% of relative humidity. The poor fermentations of the herbs could be explained by lack of nutrient, structural rigidity, and the content of antifungal substance. After fermentation, the average water content of herbs were increased to 67.21±11.43% from 30.84±15.67%, but the average pH and average methanol extraction ratio were slightly decreased to 11.16±7.06% and 4.83±0.73 from 13.91±12.22% and 5.06±0.87, respectively. The analysis of thrombin inhibition and DPPH scavenging activity of the methanol extracts of herbs showed that thrombin inhibition activities of the fermented *Drynaria fortunei* Kunze, *Melia azedarach* var. *japonica*, *Prunus persica* and *Orostachys japonicus*, and DPPH scavenging activities of the fermented *Polygonatum tenuifolia*, *Scrophularia buergeriana*, *Angelica dahurica*, *Drynaria fortunei* Kunze, *Cyperus rotundus*, and *Boschniakia rossica* were increased as compared with those activities of non-fermented its cognate herbs. Our results suggest that the production of bioactivity-strengthen medicinal herbs is possible by solid fermentation of *Phellinus baumii* mycelium, as fermented *Drynaria fortunei* Kunze showed increased antioxidant and thrombin inhibitory activities than those of non-fermented herbs.

**Key words :** Anti-oxidation activity, anti-thrombin activity, medicinal herb, *Phellinus baumii* mycelium, solid fermentation

### 서 론

상황버섯은 진흙버섯속에 속하는 백색 부후균으로 뽕나무 줄기 등에 자생하며, 갓표면을 제외하고는 모두 황색을 나타내어 상황이라 부른다. 상황버섯은 전 세계적으로 220여 종이 알려져 있으나, 국내에는 *Phellinus linteus*, *P. baumii*, *P. gilvus*, *P. ignarius* 등의 7종이 있으며 그 중에서도 국내에서는 *P. baumii*와 *P. linteus*가 일반적으로 재배, 유통되고 있다[1]. 실제 *P. baumii*와 *P. linteus*는 분류상의 어려움도 있으나[8], 이들 상황버섯의 자실체는 면역체계를 강화하고

[21], 급성 알러지 반응을 저해하며[26], 혈압강화, 항혈전, 항돌연변이 활성 및 암, 심장병 등의 성인병 예방과 개선효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[4, 5, 7, 10, 11, 22, 23]. 또한 식품으로 경구 투여시 독성이 나타나지 않으며[2], *Bifidobacterium* 증식에 따른 장내 유해미생물 효소 저해 및 a-glucosidase 저해효과가 보고되어 있다[6]. 현재까지, 상황버섯으로부터 다양한 생리활성물질들의 분리 연구가 지속적으로 진행되고 있으며[16, 29], 추출방법에 따른 상황버섯 추출물의 효능변화 및 평가가 검토되고 있다[10]. 최근에는, 상황버섯의 자실체 이외에 균사체에서도, 상황버섯 자실체와 유사한 혈액 항응고 활성[7], 항산화 효과[19], 항암작용[11], 위궤양 완화효과[14] 및 항염증작용[9], alzheimer 질환 치료를 위한  $\beta$ -secretase 저해활성[20] 등의 다양한 생리활성이 보고되면서 상황버섯의 균사체 배양에 많은 연구가 집중되

\*Corresponding author

Tel: 82-54-820-5491, Fax: 82-54-820-5491

E-mail: hysohn@andong.ac.kr

고 있다.

한편, 최근 버섯의 재배를 위해 인삼박[18] 및 감귤박을 이용하거나[12, 13], 녹차 추출물에서 소나무잔나비버섯 배양[3], 미늘을 이용한 영지 균사체 배양[17] 및 전분 함유 폐액에서 상황버섯 균사체 배양[15] 등의 다양한 천연물 및 폐기물을 이용하고자 하는 연구가 보고되고 있으며, 이는 생산된 버섯 및 균사체의 기능성 및 관능성의 증대는 물론, 농산물 폐기물 처리에 따른 환경적 부담을 줄이려는 이중의 목적을 가지고 있다.

본 연구에서는 한약재 및 한방 폐기물을 이용하여 장수상황버섯(*P. baumii*) 균사체의 고체발효를 통한 기능성 강화 한약재 생산을 목적으로 하였으며, 먼저 항산화 활성 또는 혈류 개선활성이 우수하다고 알려진 36종의 한약재를 멸균한 후, 장수상황버섯 균사체를 각각 접종, 배양하여 고체발효 가능성을 검토하였으며, 이후 한약재 및 장수상황버섯 균사체 고체 발효 한약재의 메탄올 추출물을 각각 조제하여 항산화 활성 및 항혈전 활성의 변화를 평가하였다. 이러한 연구는 다양한 버섯균사체의 한약재 고체발효를 통한 신규의 유용물질 생산의 기초자료로 활용될 것이다.

## 재료 및 방법

### 사용균주, 배지, 종균 및 한약재

본 실험에 사용한 균주는 *Phellinus baumii*(품종명: 장수상황버섯) 균주로, (주)바이온에서 Potato dextrose agar (Difco Co., USA) 배지에서 25°C에서 20일 배양하여 사용하였고, 1개월 간격으로 계대배양하였다. 한약재는 2007년 대구 한약재 시장에서 구입하여 사용하였으며, 사용 전 흐르는 물에 30초간 수세하여 불순물을 제거한 후, 탈수하여 사용하였다. 한약재에 접종할 종균준비를 위해 500 mL 플라스크에 200 mL Potato dextrose broth(Difco Co., USA) 배지를 분주하고 121°C에서 20분간 가압 멸균한 후, 20일 배양된 장수상황버섯 균사체 고체평판(1 cm × 1 cm, 3개)을 접종하였다. 이후, 회전형 진탕배양기(Daihan Labtech Co. Korea, 25±1°C, 130 rpm)에서 10일간 배양하여 이를 액체종균으로 사용하였다.

### 한약재의 전처리, 추출물 조제 및 장수상황버섯 균사체 추출물의 조제

준비된 36종의 한약재 100 g을 각각 1 L 플라스크에 넣고, 이를 121°C에서 20분간 고압멸균한 후 상온에서 냉각하였다. 멸균된 한약재는 10배 부피의 메탄올을 첨가하여 상온에서 24시간 동안 각각 3회 반복 추출하였으며, 추출액은 Whatman No. 2 filter paper로 filtration 후 감압하에서 농축하여 분말로 조제하였다. 한편 PDB 배지에서 25±1°C, 130 rpm으로 10일간 배양한 장수상황버섯 균사체는, 원심집균한 후, 멸균수로 2회 수세 후, 2일간 동결건조하여 -70°C에서

보존하여 사용하였으며, 조제된 장수상황버섯 균사체 10 g을 10배 부피의 메탄올을 첨가하여 동일한 방법으로 추출물을 조제하였다.

### 장수상황버섯 균사체를 이용한 한약재의 고체발효 및 발효 한약재의 추출

36종의 한약재 100 g을 각각 850 mL polypropylene bottle (Namsan Eng Co. Korea)에 넣고 121°C에서 20분간 고압멸균한 후 상온에서 냉각하였다. 조제된 장수상황버섯 액체종균 20씩을 멸균된 한약재 100 g에 무균적으로 접종하였으며, 접종 이후에는 멸균마개를 고정시켜 오염을 방지하고, 발효는 25°C, 상대습도 90%의 배양기에서 20일 동안 진행하였다. 균사체 배양 정도는 육안으로 판단하였으며, 한약재에 성장되는 균사체의 양에 따라 ++(생장 우수), +(생장 양호), 및 -(생장 불량)로 나타내었다. 20일 동안 발효시킨 각각의 한약재는 10배 부피의 메탄올을 첨가하여 상온에서 24시간 동안 추출하였으며, 이를 3회 반복 후 추출액을 감압하에서 농축하여 분말로 조제하였다.

### 36종 한약재 및 장수상황버섯 발효 한약재 추출물들의 인간 트롬빈 저해 활성 평가

조제된 추출물들은 각각 DMSO에 100 mg/mL 농도로 녹인 후, 항혈전 활성 평가를 위해 인간 트롬빈 저해활성을 측정하였다. 트롬빈 저해 활성은 Amelung coagulometer KC-1A(Japan)를 이용하여 혈액 응고시간(thrombin time)을 측정하여 평가하였으며, 37°C에서 0.5 U 트롬빈(Sigma Co., USA) 50 µL와 20 mM CaCl<sub>2</sub> 50 µL, 다양한 농도의 시료 10 µL를 coagulometer의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100 µL를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였다. 대조구로는 아스피린(Sigma Co., USA)을, 용매 대조구로는 DMSO를 사용하였으며, DMSO의 경우 33초의 응고시간을 나타내었다. 트롬빈 저해에 따른 항혈전 활성은 3회 이상 반복한 응고시간 측정 실험의 평균값으로 나타내었으며, [추출물 시료 첨가시 평균 응고시간/용매 대조구인 DMSO 첨가시 응고시간] × 100으로 표시하였다[23-25, 27, 28].

### 36종 한약재 및 장수상황버섯 발효 한약재 추출물들의 항산화 활성 평가

추출물들의 항산화 활성은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical에 전자를 공여하여 자유기를 소거하는 활성을 측정하여 평가하였다[23, 24, 27]. 먼저, 다양한 농도로 희석한 시료 20 µL에 99.5% 에탄올에 용해시킨 2 × 10<sup>-4</sup> M DPPH 용액 380 µL를 넣고 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 516 nm에서 microplate reader(Asys Hitech, Expert96, Asys Co., Austria)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 butylhydroxytoluene, vitamin C 및

vitamin E(Sigma Co., USA)를 사용하였다. DPPH free radical 소거능은 시료첨가구와 비첨가구의 백분율로 표시하였으며, 시료 용매로 사용된 DMSO는 활성이 없었으며, IC<sub>50</sub>는 50% 소거능을 나타내는 농도로 계산하였다.

DPPH scavenging activity (%)

$$= \{1 - (\text{Sample O.D.})/(\text{Control O.D.})\} \times 100$$

#### 기타 분석

시료의 pH 측정의 경우, 각각의 한약재 및 장수상황버섯 균사체 발효 한약재 2 g에 10 mL의 멸균수를 첨가하여 4°C에서 24시간 추출 후, 상온에서 1시간 방치 후 pH meter로

측정하였으며, 수분함량은 각 시료 10 g을 85°C 건조기에서 12시간 건조하여 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 36종 한약재 및 장수상황버섯 발효 한약재의 추출효율, 수분함량 및 pH

실험에 사용한 한약재의 식물 부위와 수분함량, 물 추출물의 pH 및 메탄올 추출효율은 Table 1에 나타내었다. 이 중에서 감국, 천궁, 도엽, 도인, 두충, 백과, 백부자, 석곡, 신이, 육종용, 자초화, 진피 및 패모는 한방에서 혈류개선 작용이 알려져 있으며, 감국, 구기자, 천궁, 도인, 백과, 백부자, 백

**Table 1. Extraction yields and water contents of 36 medicinal herbs used in this study and pH of their water extracts.**

Korean name	Scientific name	Used part	Extraction yield (%)	Water content (%)	pH
Gam-kuk	<i>Chrysanthemum indicum</i>	flower	26.09	63.85	4.7
Gol-sae-bo	<i>Drynaria fortunei</i> Kunze	root, stem	7.81	30.46	4.78
Gal-luin	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	seed	0.41	15.66	4.9
Goo-ki-ja	<i>Lycium chinense</i> Mill.	fructus	18.11	26.15	4.96
Chun-gung	<i>Cnidium officinale</i> Makino	root	10.08	27.83	5.81
Dae-chu	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	fructus	18.71	10.19	4.92
Do-yeup	<i>Prunus persica</i> (Linne) Batsch	leaf	27.88	62.16	4.67
Do-in	<i>Prunus persica</i>	seed	1.58	11.62	5.53
Do-chung	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	stem bark	11.46	35.10	4.54
Baek-gwa	<i>Ginkgo biloba</i> L.	seed	3.09	13.80	6.79
Baek-yeum	<i>Ampelopsis japonica</i> Makino	root	8.06	43.07	4.85
Baek-buja	<i>Aconitum koreanum</i> R. Raymond	root	15.21	23.69	6.36
Baek-sun-pi	<i>Dictamnus dasycarpus</i>	root bark	9.02	35.84	4.05
Bak-ji	<i>Angelica dahurica</i>	root	35.70	31.91	6.1
Baek-hap	<i>Lilium tigrinum</i>	flower	18.38	30.43	3.73
Sa-sam	<i>Adenophora triphylla</i> var. <i>Japonica</i>	root	41.94	57.89	4.81
Sa-in	<i>Amomum villosum</i>	seed	3.86	28.71	5.09
San-yak	<i>Dioscorea batatas</i>	root	3.30	27.13	5.43
Sam-chil	<i>Panax notoginseng</i>	root	4.66	22.81	4.98
Seok-gok	<i>Dendrobium moniliforme</i>	root bark	6.39	44.51	4.16
Sie-chae	<i>Diospyros kaki</i> Thunb. var. <i>domestica</i> Mak	calyx	8.17	27.00	4.88
Sinie	<i>Magnolia denudata</i> Desrousseaux	flower	6.52	35.55	6.64
Wa-song	<i>Orostachys japonicus</i>	whole	4.22	62.87	7.54
Won-ji	<i>Polygala tenuifolia</i>	root	30.83	29.14	5.33
Yuk-Jong-yong	<i>Boschniakia rossica</i>	whole	27.06	17.48	5.26
Ja-cho-hwa	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	flower	41.17	25.39	6.48
Jin-pi	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> HANCE	stem bark	38.04	51.15	4.2
Chun-ryun-ja	<i>Melia azedarach</i> var. <i>japonica</i>	fructus	17.24	38.66	3.84
Chun-hwa-bun	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	bark	1.98	21.36	4.74
To-sa-ja	<i>Cuscuta japonica</i> Choisy	seed	11.79	59.41	4.91
Pae-mo	<i>Fritillaria thunbergii</i> Miquel	stem	1.14	16.75	3.82
Hang-in	<i>Prunus armeniaca</i> L.	seed	5.48	17.84	5.91
Hwang-bu-ja	<i>Cyperus rotundus</i>	root bark	4.22	20.74	5.18
Hyun-sam	<i>Scrophularia buergeriana</i>	root	16.88	19.09	4.94
Hwang-jeong	<i>Polygonatum sibiricum</i> Redt.	root bark	14.13	13.40	4.94
Kyun-woo-ja	<i>Pharbitis nil</i> Choisy	seed	0.34	11.73	6.21

합은 항산화 활성이 우수한 것으로 알려져 있다. 특히 감국, 천궁, 도인, 백과, 백부자의 경우 항산화 활성 및 혈류 개선 활성을 동시에 나타내며, 감국, 구기자, 천궁, 대추, 두충, 백과, 백합, 사삼, 사인, 산약, 삼칠, 원지, 자초화, 토사자, 및 황정은 상황버섯과 마찬가지로 식품재료로도 이용 가능하다 (식품의약품안전청 식품원재료 데이터베이스). 수분함량은 10.19%(대추)~63.85%(감국), 메탄올 추출효율은 0.34%(견우자)~41.94%(사삼), pH는 3.73(백합)~7.54(와송)로 그 차이가 매우 심하였다. 일반적으로 종자 부위의 경우 가장 낮은 수분함량과 추출효율을 나타내었으며, 뿌리, 과실, 꽃의 순으

로 수분함량과 추출효율이 증대되었다. 반면 pH와 식물부위 별 상관관계는 인정되지 않았다. 장수상황버섯 균사체를 이용한 발효 한약재의 수분함량, 물 추출물의 pH 및 메탄올 추출효율은 Table 2에 나타내었다. 20일간의 배양 기간동안 전반적으로 양호한 균사체 성장을 나타내었으나, 감국, 대추, 백부자, 신이 및 황정에서는 장수상황버섯 균사체 성장이 매우 미미하여 고체발효가 제대로 진행되지 않았다. 이는 이들 한약재의 낮은 영양성분, 구조적 견고성 및 항진균 활성 등 다양한 요인과 관련이 있을 것으로 판단된다. 한편, 발효 한약재의 수분함량은 42.90%(백과)~86.87%(백선피),

**Table 2. Extraction yields and water contents of 36 medicinal herbs fermented by inoculation of *Phellinus baumii* mycelium and pH of their water extracts.** The solid fermentation was carried out at 25°C for 20 days under 90% of relative humidity.

Korean name	Scientific name	Mycelial growth	Extraction yield (%)	Water content (%)	pH
Gam-kuk	<i>Chrysanthemum indicum</i>	- <sup>1</sup>	NF <sup>4</sup>	NF	NF
Gol-sae-bo	<i>Drynaria fortunei</i> Kunze	++ <sup>3</sup>	7.61	77.15	4.75
Gal-luin	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	+ <sup>2</sup>	8.85	62.84	3.36
Goo-ki-ja	<i>Lycium chinense</i> Mill.	++	29.03	66.76	5.41
Chun-gung	<i>Cnidium officinale</i> Makino	++	9.18	67.83	4.89
Dae-chu	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	-	NF	NF	NF
Do-yeup	<i>Prunus persica</i> (Linne) Batsch	++	13.00	77.25	5.79
Do-in	<i>Prunus persica</i>	+	17.24	52.10	6.34
Do-chung	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	++	7.10	68.42	4.59
Baek-gwa	<i>Ginkgo biloba</i> L.	+	16.70	42.90	4.86
Baek-yeum	<i>Ampelopsis japonica</i> Makino	++	3.73	78.68	4.61
Baek-buja	<i>Aconitum koreanum</i> R. Raymond	-	NF	NF	NF
Baek-sun-pi	<i>Dictamnus dasycarpus</i>	++	3.41	73.00	4.6
Bak-ji	<i>Angelica dahurica</i>	++	13.91	86.87	6.27
Baek-hap	<i>Lilium tigrinum</i>	++	7.35	80.91	3.88
Sa-sam	<i>Adenophora triphylla</i> var. <i>Japonica</i>	++	11.70	83.75	4.64
Sa-in	<i>Amomum villosum</i>	+	7.44	52.22	3.95
San-yak	<i>Dioscorea batatas</i>	++	15.88	58.70	5.25
Sam-chil	<i>Panax notoginseng</i>	++	15.34	55.49	4.57
Seok-gok	<i>Dendrobium moniliforme</i>	++	2.90	71.81	4.27
Sie-chaе	<i>Diospyros kaki</i> Thunb. var. <i>domestica</i> q Mak	++	2.49	66.12	4.93
Sinie	<i>Magnolia denudata</i> Desrousseaux	-	NF	NF	NF
Wa-song	<i>Orostachys japonicus</i>	++	2.17	77.67	4.61
Won-ji	<i>Polygala tenuifolia</i>	++	16.07	64.33	4.52
Yuk-Jong-yong	<i>Boschniakia rossica</i>	++	11.37	73.00	5.77
Ja-cho-hwa	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	++	10.76	78.33	4.82
Jin-pi	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> HANCE	++	22.16	59.00	4.23
Chun-ryun-ja	<i>Melia azedarach</i> var. <i>japonica</i>	++	2.32	57.00	4.48
Chun-hwa-bun	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	++	17.18	67.33	4.74
To-sa-ja	<i>Cuscuta japonica</i> Choisy	+	10.77	81.40	4.36
Pae-mo	<i>Fritillaria thunbergii</i> Miquel	++	6.25	66.33	4.39
Hang-in	<i>Prunus armeniaca</i> L.	++	25.15	46.51	6.42
Hwang-bu-ja	<i>Cyperus rotundus</i>	++	3.51	57.62	3.87
Hyun-sam	<i>Scrophularia buergeriana</i>	++	20.01	77.08	5.24
Hwang-jeong	<i>Polygonatum sibiricum</i> Redt.	-	NF	NF	NF
Kyun-woo-ja	<i>Pharbitis nil</i> Choisy	+	5.40	55.33	5.42

<sup>1</sup>-: poor growth, <sup>2</sup>+: moderate growth, <sup>3</sup>++: good growth, <sup>4</sup>NF: No fermentation

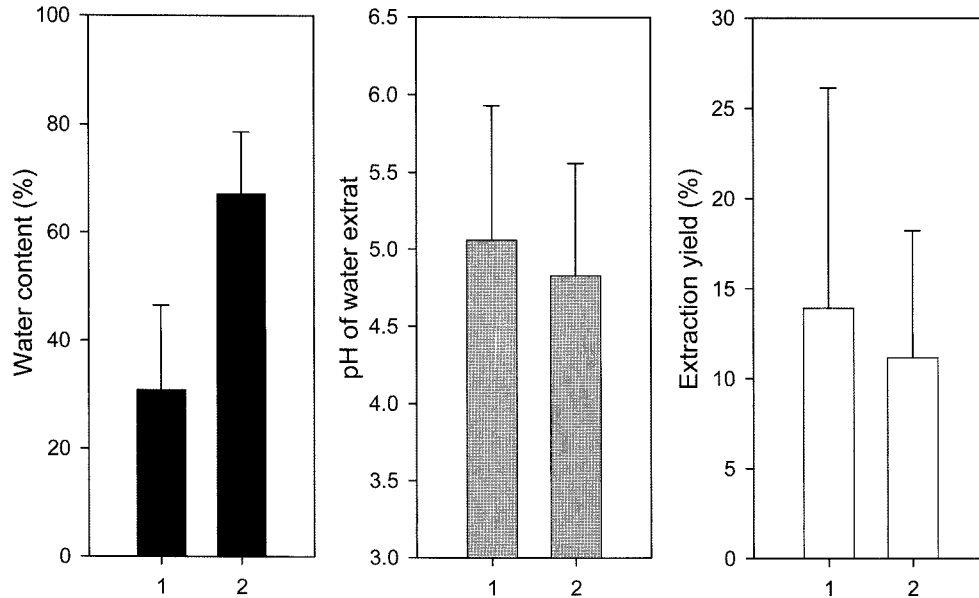


Fig. 1. Changes of average water content, average extraction yield and average pH of 36 medicinal herbs after 20 days solid fermentation using *Phellinus baumii* mycelium. 1: before fermentation, 2: after fermentation.

메탄올 추출효율은 2.17%(견우자)~29.03%(구기자), pH는 3.36(팔루인)~6.42(행인)로 나타나, 발효전과 비교하였을 때 평균 수분함량은  $30.84 \pm 15.67\%$ 에서  $67.21 \pm 11.43\%$ 로 2.2배 정도 증대되었으며, 평균 메탄올 추출효율과 평균 pH는  $13.91 \pm 12.22\%$  및  $5.06 \pm 0.87$ 에서 각각  $11.16 \pm 7.06\%$  및  $4.83 \pm 0.73$ 으로 다소 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1). 이는 20일 동안의 발효기간 중 상대습도를 90%로 유지하고, 장수상황버섯 균사체의 우수한 생육에 따라 나타난 현상으로 이해된다.

### 36종 한약재 및 장수상황버섯 균사체 발효 한약재의 인간 트롬빈 저해활성 및 항산화 활성

한약재와 장수상황버섯 균사체 발효 한약재의 메탄올 추출물을 이용하여 인간 트롬빈 저해활성과 항산화 활성을 평가하였다(Table 3). 먼저 1 mg/mL 시료농도에서 트롬빈 저해활성의 경우, 장수상황버섯 균사체에서는 119% 활성으로 미미하였으며, 항혈전제로 이용되고 있는 아스피린의 경우 310%의 활성을 나타내었다[24, 27, 28]. 비발효 한약재에서는 패모(1700%), 백련(858%), 견우자(770%), 천궁(414%)에서 우수한 활성이 나타났으며, 감국, 대추, 백부자, 신이, 황정을 제외한 31종의 발효 한약재에서는 패모(1700%)에서만 활성이 인정되었다(Table 3). 한편 장수상황버섯 균사체 발효에 의해, 대부분의 한약재는 항트롬빈 활성이 감소하거나 변화가 없었으나, 골쇄보, 천련자, 도염, 외송의 경우에는 활성이 각각 31.38, 23.63, 22.57, 13.85% 증가되어 장수상황버섯 균사체 발효에 따른 긍정적 활성증대를 확인하였다(Fig. 2a). 항산화 활성 평가의 경우, 0.2 mg/mL 시료농도에서 장수상황버섯 균사체의 경우 9.3%의 DPPH 소거능을 나타내

어 미약한 활성은 나타내었고, 수용성 항산화제인 vitamin C의 경우 83.7%의 DPPH 소거능을 나타내었다. 비발효 한약재의 경우에는 시체(67.2%), 천화분(65.8%), 백련(64.9%), 토사자(61.9%), 석곡(60.4%), 및 육종용(46.5%)에서 우수한 항산화능을 나타내었으며, 31종의 장수상황버섯 균사체 발효 한약재의 경우, 육종용(67.2%), 향부자(65.8%), 백지(64.9%), 현삼(61.9%), 원지(60.4%), 골쇄보(58.2%), 천화분(46.5%)에서 항산화 활성이 우수하였다(Table 3). 한편 장수상황버섯 균사체 발효에 의해 한약재의 항산화 활성의 상실도 나타났으나, 원지, 현삼, 백지, 향부자, 골쇄보 및 육종용에서는 발효전에 비해 각각 58.9, 49.8, 48.1, 32.8, 24.1, 20.7% 증가된 DPPH 소거능을 나타내었다(Fig. 2b). 항산화 활성이 우수한 한약재 및 발효 한약재의 DPPH 소거능의 IC<sub>50</sub>는 Table 4에 나타내었으며, 전반적으로 90~180 µg/mL의 IC<sub>50</sub>를 나타내어 실제적인 항산화 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다. 한편 한약재 발효에 따른 pH 변화, 균사체 생육도, 메탄올 추출효율의 변화와 항산화, 항혈전 활성과는 상관관계가 나타나지 않아, 발효후 활성을 미리 예측하기는 어렵다고 추측된다(결과 미제시). 이러한 결과는 장수상황버섯 균사체를 이용한 한약재의 고체발효를 통해, 특정 기능성의 강화 원재료를 생산할 수 있으며, 골쇄보의 경우와 같이 항혈전 활성 및 항산화 활성을 동시에 증대된 한약재 생산도 가능하리라 판단된다. 향후 고체발효 한약재의 다양한 생리 활성 검증, 활성증대 기작 규명과 활성물질의 질적, 양적 변화에 대한 연구가 필요하며, 이에 대한 연구가 현재 진행 중이다.

**Table 3. Changes of thrombin inhibition activity and DPPH scavenging activity in the methanol extract of 36 medicinal herbs after 20 days solid fermentation using *Phellinus baumii* mycelium.**

Scientific name	Thrombin inhibition (%)		DPPH scavenging activity (%)	
	before fermentation	after fermentation	before fermentation	after fermentation
<i>Chrysanthemum indicum</i>	102.67	NF <sup>1</sup>	58.2	NF
<i>Drynaria fortunei</i> Kunze	107.00	138.38	34.1	58.2
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	104.00	77.82	19.5	34.1
<i>Lycium chinense</i> Mill.	102.00	98.59	23.8	19.5
<i>Cnidium officinale</i> Makino	414.50	109.86	17.2	23.8
<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	92.00	NF	11.7	NF
<i>Prunus persica</i> (Linne) Batsch	100.67	123.24	20.4	17.2
<i>Prunus persica</i>	109.00	95.42	1.2	11.7
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	109.33	114.08	13.2	20.4
<i>Ginkgo biloba</i> L.	102.33	101.76	13.1	1.2
<i>Ampelopsis japonica</i> Makino	858.00	101.76	64.9	13.2
<i>Aconitum koreanum</i> R. Raymond	84.33	NF	7.2	NF
<i>Dictamnus dasycarpus</i>	161.33	111.62	16.8	13.1
<i>Angelica dahurica</i>	102.00	107.04	16.8	64.9
<i>Lilium tigrinum</i>	115.00	97.18	7.1	7.2
<i>Adenophora triphylla</i> var. <i>Japonica</i>	104.33	93.66	11.7	16.8
<i>Amomum villosum</i>	109.67	111.27	32.3	16.8
<i>Dioscorea batatas</i>	154.67	109.51	34.2	7.1
<i>Panax notoginseng</i>	103.00	101.06	0.3	11.7
<i>Dendrobium moniliforme</i>	104.67	92.96	60.4	32.3
<i>Diospyros kaki</i> Thunb. var. <i>domestica</i> Mak	101.00	97.66	67.2	34.2
<i>Magnolia denudata</i> Desrousseaux	113.33	NF	20.2	NF
<i>Orostachys japonicus</i>	92.00	105.86	28.5	0.3
<i>Polygala tenuifolia</i>	94.67	94.14	1.4	60.4
<i>Boschniakia rossica</i>	113.85	105.47	46.5	67.2
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	106.67	100.00	5.2	20.2
<i>Fraxinus rhynchophylla</i> HANCE	105.13	101.17	16.3	28.5
<i>Melia azedarach</i> var. <i>japonica</i>	87.69	111.33	14.4	1.4
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	148.21	102.34	65.8	46.5
<i>Cuscuta japonica</i> Choisy	125.13	108.98	61.9	5.2
<i>Fritillaria thunbergii</i> Miquel	1700.00	1700.00	25.9	16.3
<i>Prunus armeniaca</i> L.	118.97	124.61	9.3	14.4
<i>Cyperus rotundus</i>	112.31	109.77	33.0	65.8
<i>Scrophularia buergeriana</i>	117.95	78.91	12.0	61.9
<i>Polygonatum sibiricum</i> Redt.	107.18	NF	12.5	NF
<i>Pharbitis nil</i> Choisy	770.83	102.67	30.5	25.9
<i>Phellinus baumii</i> Mycelium	119.14	ND <sup>2</sup>	9.3	ND
<i>aspirin</i>	310.10	ND	ND	ND
<i>vitamin C</i>	ND	ND	83.7	ND

The final concentrations used in thrombin inhibition assay and DPPH scavenging activity assay were 1 mg/ml, and 0.2 mg/ml, respectively.

<sup>1</sup>NF: No fermentation. <sup>2</sup>ND: not determined.

## 요 약

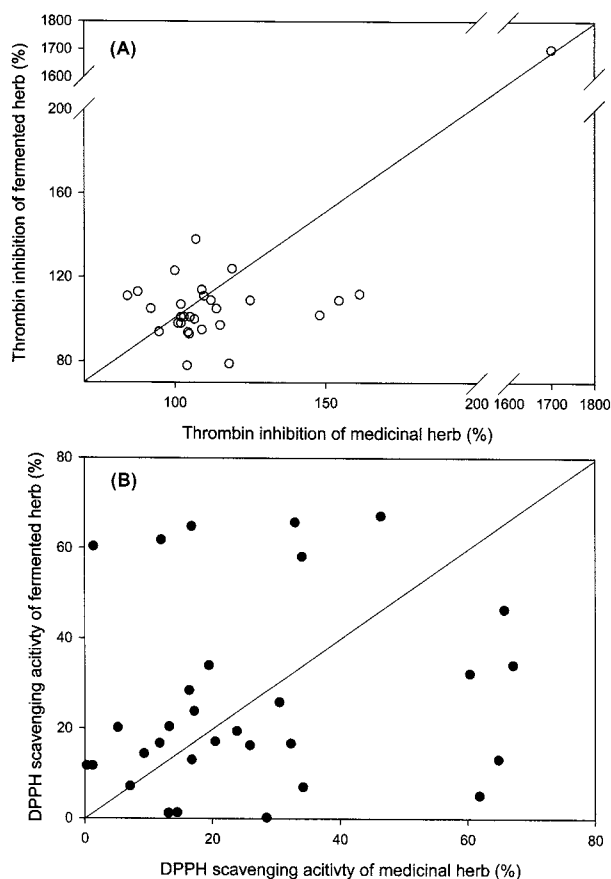
장수상황버섯(*Phellinus baumii*) 균사체를 이용한 한약재의 고체발효를 통한 기능성 강화 한약재 생산을 목적으로, 향산화 활성 또는 혈류 개선활성이 우수하다고 알려진 36종

의 한약재를 멸균 후, 장수상황버섯 균사체를 접종하여 고체발효 가능성을 검토하였다. 25°C, 상대습도 90% 배양기에서 20일간 발효시킨 결과, 감국, 대추, 백부자, 신이 및 황정을 제외한 31종에서 양호한 발효가 진행되었으며, 발효 가능여부는 한약재 식물체의 사용부위의 구조적 견고성, 영양

**Table 4. DPPH scavenging activity of the selected medicinal herbs (IC<sub>50</sub>) and their solid fermented medicinal herbs using *Phellinus baumii* mycelium.**

Chemicals/Extracts	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	
	before fermentation	After fermentation
BHT	18.07	-
Vitamin C	15.8	-
Vitamin E	32.6	-
<i>Chrysanthemum indicum</i>	168.6	-
<i>Drynaria fortunei</i> Kunze	-	177.5
<i>Ampelopsis japonica</i> Makino	97.2	-
<i>Angelica dahurica</i>	-	162.4
<i>Dendrobium moniliforme</i>	90.8	-
<i>Diospyros kaki</i> Thunb. var. <i>domestica</i> Mak	91.3	-
<i>Polygala tenuifolia</i>	-	177.5
<i>Boschniakia rossica</i>	-	172.2
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	127.5	-
<i>Cuscuta japonica</i> Choisy	140.0	-
<i>Cyperus rotundus</i>	-	173.3
<i>Scrophularia buergeriana</i>	-	179.5

-: Not determined



**Fig. 2. Comparison of (A) thrombin inhibition activity and (B) DPPH scavenging activity between the selected medicinal herbs and their solid fermented medicinal herbs using *Phellinus baumii* mycelium.**

조건 및 항진균 활성 등과 연관되리라 판단된다. 한약재의 고체발효 이후, 발효전과 비교하였을 때 평균 수분함량은  $30.84 \pm 15.67\%$ 에서  $67.21 \pm 11.43\%$ 로 2.2배 증대되었으며, 평균 메탄올 추출효율과 평균 pH는  $13.91 \pm 12.22\%$  및  $5.06 \pm 0.87$ 에서 각각  $11.16 \pm 7.06\%$  및  $4.83 \pm 0.73$ 으로 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 각각의 메탄올 추출물을 이용한 항혈전 활성 및 항산화 활성을 측정된 결과, 골쇄보, 천련자, 도엽, 외송의 경우에는 트롬빈 저해 활성이 각각 발효전에 비하여 31.38, 23.63, 22.57, 13.85% 증가되었으며, 원지, 현삼, 백지, 향부자, 골쇄보 및 육종용에서는 DPPH 소거능이 발효전에 비해 각각 58.9, 49.8, 48.1, 32.8, 24.1, 20.7% 증가되어 장수상황버섯 균사체 발효 한약재의 긍정적 생리활성 증가를 확인하였다. 본 연구결과는 상황버섯 균사체를 이용한 한약재의 고체발효를 통해, 특정 기능성의 강화 원재료를 생산할 수 있으며, 골쇄보의 경우와 같이 항혈전 활성 및 항산화 활성이 동시에 증대된 한약재 생산이 가능함을 제시하고 있다.

## REFERENCES

- Bae, J. S., G. H. Jang, M. H. Lee, G. S. Jeong, U. S. Jo, S. G. Choe, Y. H. Kim, and S. C. Park. 2003. Comparison on the morphology, general composition, elemental composition and mineral contents of *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* and *Phellinus gilvus*. *Kor. J. Vet. Res.* **43**: 423-428.
- Han, Y. S., S. Y. Park, B. K. Choi, and S. Y. Choung. 2001. Acute oral toxicity studies of extract of sanghwang mushroom (*Phellinus linteus*). *J. Appl. Pharmacol.* **9**: 46-50.
- Jang, K. H., K. O. Shin, and S. D. Kim. 2005. Free amino acid and polysaccharide content of submerged mycelial culture of *Fomitopsis pinicola*. *Kor. J. Food Preserv.* **12**: 379-386.
- Ji, J. H. M. N. Kim, C. K. Chung, and S. S. Ham. Anti-mutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**: 331-337.
- Kang, I. J., M. E. Jung, S. S. Ham, S. M. Nam, S. J. Kim, and C. K. Chung. 2001. Biochemical and histological effects of *Phellinus linteus* methanol extract on liver lipid metabolism of rats fed CC1<sub>4</sub> and high fat. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**: 331-337.
- Kim, D. H., H. J. Choi, E. A. Bae, M. J. Han, and S. Y. Park. 1998. Effect of artificially cultured *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacteria enzymes and rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase. *J. Fd. Hyg. Safety.* **13**: 20-23.
- Kim, J. S., M. H. Kwon, O. J. Lim, H. J. Seong, and H. C. Yang. 1998. Blood anticoagulation active substance from *Phellinus linteus* mycelia. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* (Spring symposium), 224.
- Kim, M. O., G. Y. Kim, B. H. Nam, C. Y. Jin, K. W. Lee, J. M. Park, S. J. Lee, and J. D. Lee. 2005. Development of species-specific primers for rapid detection of *Phellinus*

- linteus* and *P. baumii*. *Mycobiology*, **33**: 104-108.
9. Kim S. H., Y. S. Song, S. K. Kim, B. C. Kim, C. J. Lim and E. H. Park. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. *J. Ethnopharmacol.* **93**: 141-146.
  10. Kwoen, D. J., S. J. Youn, J. G. Cho, U. K. Choi, and S. C. Kang. 2006. Antioxidant activities and biological properties of *Phellinus linteus* extracts according to different extraction methods. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**: 91-96.
  11. Kwon, S. H., C. N. Kim, C. Y. Kim, S. T. Kwon, K. M. Park, and S. Hwangbo. 2003. Antitumor activities of protein bound polysaccharide extracted from mycelia of mushroom. *Kor. J. Food Nutr.* **16**: 15-21.
  12. Lee, C. H., M. H. Yang, S. R. park, and Y. J. Kang. 2007. Major components of mushroom mycelia cultivated with citrus juice processing wastes. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **39**: 128-132.
  13. Lee, C. H., M. H. Yang, S. R. park, and Y. J. Kang. 2007. Solvent extracted volatile components of mushroom mycelia cultivated with citrus juice processing wastes. *Kor. J. Food Preserv.* **14**: 351-355.
  14. Lee, J. H. S. J. Lee, Y. H. Choi, K. T. Chung, Y. K. Jeong, and B. T. Choi. 2006. Effects of mycelial culture of *Phellinus linteus* on ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Phytother. Res.* **20**: 396-402.
  15. Lee. S. Y., H. K. Bae, N. K. Kim, and S. H. Hwang. 2006. Optimization in bioconversion of starch processing waste to *Phellinus linteus* mycelia using response surface analysis. *J. Kor. Soc. Env. Eng.* (Autumn symposium). 562-565.
  16. Lyu, H. N., J. S. Yoo, M. C. Song, D. Y. Lee, D. H. Kim, Y. D. Rho, I. H. Kim, and N. I. Baek. 2007. Development of biologically active compounds from edible plant source XVIII. Isolation of derivatives ergosterol from the fruit body of *Phellinus linteus*. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**: 57-62.
  17. Mun, H. C., H. S. Lee, J. H. Park, D. H. Kim, S. Y. Lee, N. S. Seong, J. G. Bang, H. G. Jeong, and H. Y. Lee. 2004. Enhancement of immune activities of *Ganoderma lucidum* mycelium cultured with garlic enriched medium. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **12**: 24-30.
  18. Park, E. M., S. J. Kim, E. J. Ye, M. J. Bae, and K. C. Jo. 2005. Effect of mycelia extracts of mushroom-cultured ginseng by-product on proliferation in cancer cell lines. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 323-329.
  19. Park. J. H., S. K. Chung, K. B. Lee, Y. C. Yoo, S. K. Kim, G. S. Kim, and K. S. Song. 2004. An antioxidant hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 615-618.
  20. Park, J. H., S. Y. Jeon, H. J. Lee, S. I. Kim, and K. S. Song. 2004. A  $\beta$ -secretase (BACE1) inhibitor hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. *Planta Med.* **70**: 143-146.
  21. Pyo, M. Y., S. M. Hyun, and K. S. Yang. 2001. Effects of *Phellinus linteus* extracts on the humoral immune response in normal and cyclophosphamide-treated mice. *J. Appl. Pharmacol.* **9**: 194-200.
  22. Rhee, Y. K., M. J. Han, S. Y. Park, and D. H. Kim. 2000. In vitro and in vivo antitumor activity of the fruit body of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**: 477-480.
  23. Ryu, H. Y., E. J. Kum, K. H. Bae, Y. K. Kim, I. S. Kwun, and H. Y. Sohn. 2007. Evaluation for the antimicrobial, antioxidant, and antithrombosis activity of korean traditional liquors. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 238-244.
  24. Ryu, H. Y., K. H. Bae, E. J. Kum, S. J. Park, B. H. Lee, and H. Y. Sohn. 2007. Evaluation for the antimicrobial, antioxidant and antithrombosis activity of natural spices for fresh-cut yam. *J. Life Sci.* **17**: 652-657.
  25. Ryu, H. Y., Y. K. Kim, I. S. Kwun, C. S. Kwon, I. N. Jin, and H. Y. Sohn. 2007. Thrombin inhibitory activity of fructus extract of *Crataegus pinnatifida* Bunge. *J. Life Sci.* **17**: 535-539.
  26. Shin, T. Y., H. Y. Shin, S. H. Kim, D. K. Kim. B. S. Chae, C. H. Oh, M. G. Cho, S. H. Oh, J. H. Kim, T. K. Lee, J. S. Park, and S. Y. Kim. 2006. *Phellinus baumii* inhibits immediate-type allergic reactions. *Nat. Product Sci.* **12**: 232-236.
  27. Sohn, H. Y., C. S. Kwon, K. H. Son, G. S. Kwon, Y. S. Kwon, H. Y. Ryu, and E. J. Kum. 2005. Antithrombosis and antioxidant activity of methanol extract from different brands of rice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 593-598.
  28. Sohn, H. Y., C. S. Kwon, K. H. Son, G. S. Kwon, H. Y. Ryu, and E. J. Kum. 2006. Antithrombin and thrombosis prevention activity of buckwheat seed, *Fagopyrum esculentum* Moench. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**: 132-138.
  29. Song. K. S., S. M. Cho, K. S. Ko, M. W. Han, and I. D. Yoo. 1994. Secondary metabolites from the mycelial culture broth of *Phellinus linteus*. *Agri. Chem. Biotechnol.* **37**: 100-104.

(Received July 8, 2008/Accepted Aug. 13, 2008)