

균사체를 이용한 수삼 고체발효물의 화학적 조성 및 면역 활성

박창규¹ · 김 훈¹ · 도 기¹ · 유광원¹ · 정현상² · 이현용³ · 정재현^{1*}

¹충주대학교 식품생명공학부

²충북대학교 식품공학과

³강원대학교 생물소재공학전공

Chemical Composition and Immunostimulating Activity of the Fermented Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) with Mushroom Mycelium by Solid Culture

Chang-Kyu Park¹, Hoon Kim¹, Qi Tu¹, Kwang-Won Yu¹, Heon-Sang Jeong²,
Hyeon-Yong Lee³, and Jae-Hyun Jeong^{1*}

¹Division of Food and Biotechnology, Chungju National University, Chungbuk 368-701, Korea

²Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

³Dept. of Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Gangwondo 200-701, Korea

Abstract

For the utilization of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) in the functional drink, we prepared the fermented Korean ginseng with mushroom mycelia (*Ganoderma lucidum*; WG-GL, *Hericium erinaceum*; WG-HE and *Phellinus linteus*; WG-PL) by solid culture. A proximate analysis showed that the fermented Korean ginseng contained significantly more crude fat (4.66~12.02%) than Korean ginseng (WG, 1.61%) whereas crude protein content of WG (13.64%) was higher value than those of the ferments (7.60~12.57%). When we also evaluated effects of the fermented Korean ginseng on the mitogenic activity, hot-water extract from WG-PL was significantly higher than those of WG or mycelia only fermentation (GL, HE and PL) as analyzed by IL-2 production (1.64-fold of the saline control) and proliferation of splenocytes (1.47-fold). In addition, the lysosomal phosphatase activity (WG-HE; 1.32-fold) and NO/TNF- α production (WG-HE; 2.27-fold of the saline control at 50 μ g/mL, WG-PL; 3.56-fold, respectively) from macrophage in the presence of the fermented Korean ginseng were higher than those of WG or mycelia fermentation. These results indicate that hot-water extracts from the fermented Korean ginseng with mushroom mycelia by solid culture contain chemical ingredients different from the Korean ginseng, and that it might provide beneficial immunostimulating activity.

Key words: mushroom mycelium, Korean ginseng, fermentation, chemical composition, immunostimulating activity

서 론

오늘날 경제성장과 더불어 문화수준의 향상 및 생활환경 변화 등으로 인간의 수명이 크게 증가하여 국민의 노령화가 가속화되고 있으며, 생활수준 향상에 따른 국민의 건강한 생활이 요구되고 있어 이에 대한 국가적인 대책이 필요한 실정이다. 또한 경제·사회발전이 가속화됨에 따라 감염성 질환이 감소하는 반면에 선진국형 성인병의 비중은 높아지고 있어, 생명공학분야에 더 많은 관심과 투자가 이루어지고 있다. 그 중에서도 미생물을 이용하는 기술은 미래의 생명공학산업분야에서 중추적인 역할을 담당할 것으로 판단되며 특히, 미생물의 천연소재 발효물로부터 새로운 생리활성물질을 탐색하는 연구에 많은 관심이 집중되고 있다. 천연물질소재중에서도 인삼에는 각종 약리효과를 나타내는 물질을 다량 함유하고 있어서 약 4천여 년 전부터 민간의약의 중요

한 의약소재로 사용되어 왔으며(1), 오늘날에는 기능성식품소재로 다양하게 이용되고 있다(2). “신농본초경”이나 “본초강목” 등의 고서에서 인삼은 건강증진과 질병의 치유목적으로 단일 또는 복합제제로 사용되는 생약이라 하였으며, 인삼은 인체와의 친화성이 있어서 인체에 완만한 작용을 나타낸다고 하였다. 인삼의 약리작용에 대한 연구는 많이 발표되었는데, 인삼에는 사포닌, 알칼로이드, 페놀성분, 유기산, 아미노산, 펩타이드, 다당류, 비타민 등 많은 성분들이 함유되어 있는 사실이 밝혀졌고(3-5), 이 가운데에서도 사포닌은 신경계 흥분 및 진정작용과 각종 스트레스에 대한 방어 작용 등 여러 가지 약리효과가 있음이 입증되었다(6).

한편, 버섯은 지구상에 수 만종이나 존재하는 귀중한 생물자원으로, 예로부터 한방 및 민간생약으로써 강장, 진정, 혈압강화, 강심, 이뇨, 간염 등의 약효는 물론 암 등 난치병에도 효과가 있음이 알려져 왔다(7). 최근에 들어오면서 버섯의

*Corresponding author. E-mail: jhjeong@cjnu.ac.kr
Phone: 82-43-820-5248, Fax: 82-43-820-5272

자실체 추출물이나 균사체 배양물이 체질개선이나 각종 질병예방 및 치료에 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있어서, 의약품 및 건강식품으로서 용도가 크게 증가하고 있는 추세이다(8-10). 특히, 버섯류는 항균·항바이러스작용, 콜레스테롤 저하작용, 혈압 강화작용, 항혈전작용, 인터페론 유도작용, 면역증강작용, 항종양작용 등의 다양한 효과를 가지고 있어서(11-13), 이들 생리활성 물질의 탐색과 개발 및 이용에 대한 산업적 관심은 매우 고조된 상태이다. 현재 Schizophyllan, Lentinan, PS-K(또는 Krestin)는 버섯으로부터 추출한 성분으로 이미 면역증강제로 시판되고 있으며, *Agaricus blazei*, *Phellinus linteus*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceum*, *Cordyceps sinensis* 등의 버섯류는 기능성식품 소재 또는 부가가치가 높은 천연 생리활성을 갖고 있어 현재 활발한 연구가 진행되고 있다(14-16).

따라서 생리활성 작용이 탁월한 버섯 균사체가 약리작용이 뛰어난 인삼을 영양원으로 이용하여 생육할 수 있다면, 균류가 지니고 있는 생물학적 변환능력(biotransformation)에 의해 인삼이 지니고 있는 약리 활성성분과 균류 생리활성 성분의 시너지 효과를 기대할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 약용 및 식용으로 이용되어 왔고, 건강식품으로 널리 알려진 수삼에 다양한 생리활성 효능을 가지고 있는 유용균사체 고등균류를 고체발효법을 이용하여 제조한 후 발효물의 화학적 조성의 특성과 함께 각종 면역 활성 등의 생리활성을 측정하여 새로운 수삼가공품의 기능성소재로 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 수삼

본 연구에 사용한 영지버섯(*G. lucidum*), 노루궁뎅이버섯(*H. erinaceum*)과 상황버섯(*P. linteus*) 등의 유용균사체 균주는 충청북도 농업기술원으로부터 분양을 받아 상황버섯과 영지버섯은 30°C, 노루궁뎅이버섯은 25°C에서 일정기간 동안(20~30일) 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 또한 본 연구에서 천연배지로 사용한 수삼은 충북 증평지역에서 2007년도에 수확한 4~5년근 수삼을 증평 영농조합인삼연구회를 통하여 구입하여 부패 및 품질저하를 방지하기 위하여 -5°C의 냉장실에 보관하면서 사용하였다.

유용균사체의 수삼 고체발효물 배양조건

수삼배지에서의 유용균사체 생육(고체발효)을 검토하기 위하여 먼저, 균사체만의 배지종류에 따른 액체배양을 검토한 결과, mushroom complete medium(MCM) 배지에서 가장 우수한 건조균체중량을 확인할 수 있었다. 따라서 MCM을 기본배지로 하고 3% 수삼 엑기스(고형분 65%)를 첨가한 액체배지에서 3종의 버섯 균사체를 수차례 계대배양 하여 영지버섯, 노루궁뎅이버섯 및 상황버섯 등 3종의 종균을 조

제하였다. 이와 같이 조제된 종균을 이용하여 수삼 고체발효물 제조의 최적화를 위한 생육조건을 검토하였다. 수삼을 수세한 다음 실온에서 3~4일간 건조시켜 수분함량을 조절하고 조직을 연화시킨 후 121°C에서 20분 멸균시킨 5년근 수삼배지에 3종의 종균을 10% 접종하고 30°C에서 20일간 배양한 결과, 영양분이 첨가되지 않은 수삼배지에서의 균사체의 생육은 거의 관찰되지 않았다. 그러나 현미분말 10%를 첨가하여 수삼과 함께 혼합한 후 멸균한, 영양분이 첨가된 수삼배지에서는 동일조건에서 배양한 3종의 종균을 접종하고 30°C에서 20~30일간의 배양으로 모든 균사체의 생육이 우수한 수삼 고체발효물을 조제할 수 있었다.

유용균사체 수삼 고체발효물의 일반성분 분석

수삼 고체발효물에 대한 일반성분은 AOAC법(17)에 준하여 정량하였는데, 수분함량은 적외선 수분측정기(FD 240; Kett Electric Lab., Tokyo, Japan)를 사용한 상압가열건조법으로 조회분은 550°C 직접회화법으로 분석하였다. 조단백질은 Kjeldahl 분해장치로 시료를 분해한 후 질소자동분석기(behr S-3; behr Labor-Technik, Düsseldorf, Germany)로, 조지방은 Soxhlet 지방추출기(C-WBS-1; Chang Shin Co., Incheon, Korea)로 추출하여 측정하였으며 탄소화물은 상기에서 구한 일반성분 총합을 100에서 감하여 계산하였다.

유용균사체 수삼 고체발효물의 열수추출물 조제

수삼을 천연배지로 배양된 유용균사체 고체발효물은 동결건조를 통하여 회수한 후 고체발효물의 열수추출물을 조제하기 위하여 각 발효물에 소량의 증류수를 첨가하고 homogenizer(Ultra-turrax T-50; Janke & Kunkel GmbH & Co., KG-IKA-Labortechnik, Staufen, Germany)로 5,000 rpm에서 10분간 분쇄한 후 발효물 중량의 20배 증류수를 가하여 3회 열수추출 하였다. 이후 추출액은 원심분리(7,600 ×g)를 통하여 상등액을 회수하고 농축기로 여과 후 동결건조 하여 3종의 유용균사체를 이용한 수삼 고체발효물의 열수추출물로 조제하였다.

마이토젠 활성 및 IL-2 생성능

6주령의 Balb/c 마우스(Nara Biotech., Kyonggi-do, Korea)를 경구 탈추시킨 후 멸균적으로 비장을 적출하고 비장세포(splenocyte)를 회수하여 2×10⁵/mL의 농도로 조정된 후 96-well plate 각 well에 180 μL씩 분주하였다. 그 후 여러 농도로 조정된 시료를 20 μL 첨가하고 3일간 배양함으로써 정상세포에 미치는 시료의 활성을 조사하였다. 수삼의 균사체 고체발효물 등의 시료에 대한 비장세포의 마이토젠 활성은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide] assay법으로 수행하였다(18). 한편, 비장세포가 생산한 사이토카인 중 림프구 활성화에 중요하게 관여하는 interleukin-2(IL-2)를 multiple antibody sandwich ELISA법(enzyme-linked immunosorbent assay)(19)으로

측정하였다. 정제된 anti-mouse IL-2 monoclonal antibody (mAb, clone JES6-1A12, PharMingen, San Diego, CA, USA)를 bicarbonate buffer(pH 8.5)를 이용하여 well에 분주하고 미부착된 Ab는 0.05% Tween 20 함유 phosphate-buffered saline(PBST)으로 washing하여 제거하였다. 시료와의 비장세포 배양액 100 µL와 함께 biotinylated anti-mouse IL-2 mAb(in PBS-10% FBS, JES6-5H4, PharMingen)를 Ab가 부착된 well에 100 µL씩 넣고 PBST로 6회 세척한 후 alkaline phosphatase-labelled streptavidin(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 각각의 well에 첨가하였다. 다음으로 150 µL의 chromogenic 기질용액(1 mg *p*-nitrophenyl disodium salt in 1 mL 10% diethanolamine buffer at pH 9.8)과 함께 배양한 후 microplate reader(3550-UV; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마크로파지 활성 및 NO와 cytokine 생성능 측정

마크로파지 활성도는 마크로파지의 lysosomal phosphatase의 활성측정을 이용하여 실시하였다. 6주령 웅성 BKW 마우스(Nara Biotech.)의 복강에 1 mL의 thioglycollate medium을 주입한 뒤 48~72시간 후에 RPMI-1640 medium으로 마크로파지를 복강으로부터 회수하였다. 회수된 마크로파지를 RPMI-1640 medium으로 세척 후 세포수가 1×10^6 cells/mL RPMI-1640이 되도록 RPMI-1640 medium에 재분산시켰다. 이 분산액을 96-well plate의 각 well에 200 µL씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하여 마크로파지 세포가 각각의 well plate의 기벽에 부착하여 monolayer를 형성시켰다(20). 두 시간 후, non-adherent cell들은 세척하여 제거하고 10% fetal bovine serum(FBS)을 함유한 RPMI-1640 medium을 각 well에 180 µL씩 분주하고 시료 20 µL을 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 재배양하여 마크로파지를 활성화시켰다. 활성화된 마크로파지의 monolayer에 0.1% triton X-100(25 µL)을 가하여 마크로파지의 세포막을 용해시키고 분비되는 lysosome의 phosphatase에 기질로서 100 mM *p*-nitrophenyl phosphate(150 µL) 및 0.1 M citrate buffer(50 µL)와 같이 넣어주었다. 1시간 동안 산성상태에서 반응시킨 후 0.2 M borate buffer를 가하여 반응을 정지시켜 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 phosphatase의 활성을 측정하였다(21).

한편, 시료와 마크로파지 배양상등액으로부터 마크로파지의 NO 생성능은 안정한 산화형인 nitrite를 Griess reagent[1% sulfanamide and 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in 2.5% H₃PO₄]로 측정하여 실험하였다(22). 즉, 배양상등액 100 µL와 Griess reagent 100 µL를 각 well에 첨가한 후 10분간 상온에서 가볍게 교반하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며 배양상등액의 nitrite 농도는 sodium nitrite 표준곡선과의 비교를 통하여 결정하였

다. 또한, 마크로파지가 생산한 TNF-α는 위의 방법에서 언급한 sandwich ELISA법에 의해 측정하였다. Cytokine의 항체는 coating buffer에 희석하여 flat-bottomed 96-well microplate에 coating한 후 4°C에서 12시간 방치하였다. Coating이 완료된 microplate는 PBST를 이용하여 3차례 세척하고, assay diluent(PBS with 10% FBS or 2% skin milk) 200 µL를 가하여 1시간 동안 방치하여 항체가 붙지 않은 well 표면을 blocking하였다. Blocking 완료 후 각 well은 washing buffer를 이용하여 재차 3회 세척하고, 각 well에 연속 희석한 표준물질(recombinant mouse cytokine)과 면역세포배양액을 각각 50 µL씩 분주하였다. 이를 실온에서 2시간 동안 방치한 다음 washing buffer로 세척하고 detection antibody(in assay diluent) 100 µL를 처리하여 실온에서 1시간 방치한 후 재차 세척하였다. Enzyme reagent (avidin-horseradish peroxidase conjugate) 100 µL를 처리하여 실온에서 30분간 결합시킨 후 substrate solution[tetramethylbenzidine(TMB) and hydrogen peroxide] 100 µL를 가하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 50 µL의 stop solution(1 M H₃PO₄ or 2 N NH₂SO₄)을 처리하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험결과들은 4개 군에 대한 실험을 통하여 평균치±SD (standard deviation)로 나타내었고 Student's *t*-test를 이용, $p < 0.05$ 와 $p < 0.01$ 수준에서 대조군과 시료간의 유의성을 검정함으로써 대조군에 대한 수삼 고체발효물 시료의 활성 유무와 시료간의 활성차이를 나타내었다.

결과 및 고찰

수삼배지에서의 유용군사체 고체발효물의 열수추출물 조제 수삼배지에서의 유용군사체(영지버섯, *G. lucidum*, GL; 노루궁뎅이버섯, *H. erinaceum*, HE; 상황버섯, *P. linteus*, PL) 고체발효물을 얻기 위하여, 먼저 MCM 기본배지에 수삼 엑기스 3%를 첨가한 액체배지를 통하여 3종의 종균을 배양하였다. 이와 같이 배양된 종균 10%를, 군사체 영양원으로 현미분말 10%를 보강하고 멸균한 5년근 수삼배지에 접종하여 30°C에서 20~30일간 고체배양 하여 3종의 버섯군사체 수삼 고체발효물로 조제하였다(Fig. 1). 한편, 생리활성을 검토하기 위하여 수삼(Korean ginseng, WG)과 군사체만의 발효물 및 수삼 고체발효물, 즉 영지버섯 수삼 고체발효물(WG-GL), 노루궁뎅이버섯 수삼 고체발효물(WG-HE) 및 상황버섯 수삼 고체발효물(WG-PL)은 decoction 방법을 통하여 열수추출물로 조제하였다. 그 결과, WG-GL의 수율은 41.3%, WG-HE는 39.7%이었고 WG-PL은 45.0%로 큰 차이를 보이지는 않았다. 그러나 수삼(WG)의 16.3%에 비해 추출수율이 높은 것으로 나타났는데 이는 군사체의 발효과

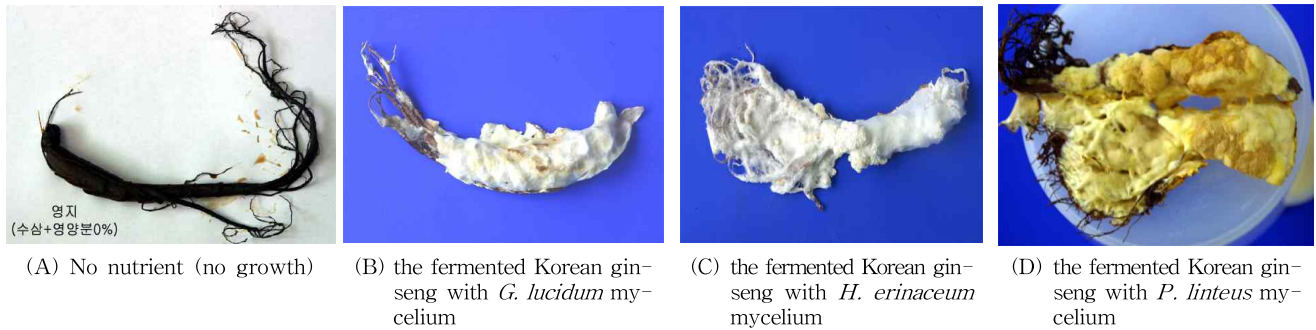


Fig. 1. Mycelia growth of the fermented Korean ginseng with *G. lucidum*, *H. erinaceum*, and *P. linteus*.

정을 통하여 수삼의 조직 또는 고분자 구성분이 붕괴되거나 분해되어 동일한 열수추출 조건하에서 추출율이 높게 나타난 것으로 추정된다.

유용균사체 수삼 고체발효물의 화학적 조성

수삼(WG), 3종의 유용균사체(GL, HE, PL) 및 유용균사체 수삼 고체발효물(WG-GL, WG-HE, WG-PL) 등 7종에 대하여 일반성분을 분석한 결과는 Table 1에 나타내었다. 수분의 함량은 각각의 시료를 동결건조한 후에 측정하였으므로 모든 시료가 3.5~3.7% 정도로 낮은 수분함량을 나타내었다. 조지방은 영지버섯의 수삼 고체발효물(WG-GL)이 12.02%로 가장 높았으며, 노루궁뎅이버섯의 수삼 고체발효물(WG-HE)이 8.79%, 영지버섯 균사체(GL) 6.41% 및 상황버섯의 수삼 고체발효물(WG-PL)이 4.66%로 비교적 높게 나타났다. 그러나 수삼(WG, 1.61%), 상황버섯 균사체(PL, 1.24%) 및 노루궁뎅이버섯 균사체(HE, 0.18%)는 비교적 낮게 나타나(Table 1), 수삼 또는 버섯균사체 자체보다는 수삼을 균사체로 발효시킨 고체발효물에서 높은 조지방의 함량을 보여주었다. 특히, 영지버섯의 경우 균사체 자체도 높은 함량을 가지고 있었으나 수삼의 영지버섯 고체발효물에서는 더욱 많은 조지방 함량을 보인다는 점 등이 버섯 균사체의 고체발효를 통한 생물학적 전환으로 균사체와 수삼 구성분의 변화가 유발되고 있음을 확인할 수 있었다. 한편, 조단백질은 HE가 26.51%로 가장 높게 나타났으며, 노루궁뎅이

버섯 균사체의 수삼발효물인 WG-HE가 7.60%로 가장 낮게 나타났고 그 이외의 시료들은 9.22~15.78%를 함유하는 것으로 나타났다. 조지방과는 달리 고체발효물이 균사체 또는 수삼보다 낮은 함량을 보임으로써 단백질이 발효과정을 통해 분해되고 있음을 알 수 있었다(Table 1). 조회분은 WG-GL 고체발효물이 13.38%로 가장 높게 나타났으며, 고체발효물에서 비교적 높게 나타난 반면, 균사체 및 수삼은 3.46~5.18%로 비교적 낮게 나타났다. 탄수화물은 WG가 80.22%, WG-PL 77.83%, PL 77.82%, GL 74.57% 및 WG-HE가 73.74%로 비교적 높게 나타난 반면에 WG-GL이 61.03%로 가장 낮게 나타났다(Table 1). 이러한 결과는 시료의 환원당 함량의 측정결과에서도 유사하게 나타나 WG-GL이 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 환원당을 함유하고 있음을 보여주어 WG, WG-PL 및 WG-HE의 450, 440과 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 1.56~1.75배 정도 많은 환원당을 함유하고 있는 것으로 확인되었다(data not shown). 일반적으로 균사체 또는 수삼의 탄수화물은 주로 다당류로서 환원당 함량이 낮으나 영지버섯 수삼 고체발효물의 경우에는 발효과정 중 탄수화물이 더 활발히 분해되어 짧은 당쇄의 탄수화물 또는 환원당이 많이 생성됨으로써 이러한 결과가 도출된 것으로 추정된다.

유용균사체 수삼 고체발효물 열수추출물의 면역 활성

영지버섯, 노루궁뎅이버섯 및 상황버섯 균사체 종균을, 현미분말이 보강된 수삼에 접종하여 배양한 영지버섯의 수삼

Table 1. Chemical composition of the fermented Korean ginseng with *G. lucidum*, *H. erinaceum*, and *P. linteus* by solid culture

Sample ¹⁾	Component content (%)				
	Moisture	Crude fat	Crude protein	Crude ash	Crude carbohydrate
WG	3.5	1.61±0.05 ²⁾	13.64±0.05	4.59±0.33	80.22±0.22
GL	3.7	6.41±0.11	13.82±0.04	5.18±0.38	74.57±0.21
HE	3.6	0.18±0.01	26.51±0.10	3.46±0.24	69.86±0.19
PL	3.7	1.24±0.04	15.78±0.07	5.16±0.35	77.82±0.22
WG-GL	3.6	12.02±0.23*	12.57±0.05*	13.38±0.88*	61.03±0.17
WG-HE	3.5	8.79±0.13*	7.60±0.01*	9.86±0.45*	73.74±0.20
WG-PL	3.5	4.66±0.10*	9.22±0.03*	8.27±0.45*	77.83±0.22

¹⁾WG: Korean ginseng, GL/HE/PL: *Ganoderma lucidum*/*Hericium erinaceum*/*Phellius linteus* mycelium, WG-GL/WG-HE/WG-PL: the fermented Korean ginseng with *G. lucidum*/*H. erinaceum*/*P. linteus* mycelium by solid culture.

²⁾Values are the means±SD of three determinations, and *p<0.01; significant difference between WG and WG-GL/WG-HE/WG-PL, respectively.

고체발효물, 노루궁뎅이버섯 수삼 고체발효물 및 상황버섯 수삼 고체발효물로부터 열수추출물을 조제하고 이들의 면역 활성을 검토하였다. 수삼 고체발효물의 시료대조군으로서 수삼의 열수추출물(WG)과 함께 영지버섯, 노루궁뎅이버섯과 상황버섯 균사체만을 회수하여 이들을 열수추출물로 조제(GL, HE와 PL)한 후 사용하였다. 먼저, 마이토젠 자극에 의한 비장세포의 증식을 통한 림프구 활성 측정결과에서는 시료대조군인 수삼 열수추출물(WG)이 saline control의 1.33배, 균사체 열수추출물인 HE가 1.28배 및 PL이 1.11배의 마이토젠 활성을 보여주었다. 유용균사체의 수삼 고체발효물에서는 상황버섯 균사체(WG-PL)에서 saline control의 1.47배로 유의적으로 가장 높은 활성을 나타내었고 노루궁뎅이 고체발효물은 1.25배의 활성을, 영지버섯의 경우에는 균사체와 고체발효물 모두에서 대조군과 유사한 낮은 활성을 나타내었다(Fig. 2). 일반적으로 많은 면역 활성 물질은 기본적으로 마이토젠 활성을 가지고 있기 때문에 기능성식품으로의 실제적인 적용이 유용하므로(23) 수삼을 기질로 하여 배양된 상황버섯 균사체 고체발효물의 열수추출물 또한 기능성식품으로의 소재적용이 가능함을 확인할 수 있었다.

한편, BKW 마우스 복강에 thioglycollate medium을 주사하여 마크로파지를 회수한 후 lysosome의 phosphatase 활성을 측정한 마크로파지 활성에서는 수삼을 기질로 한 WG-GL 및 WG-PL의 발효물 뿐만 아니라 대조군인 3종 유용균사체와 수삼의 열수추출물 등 거의 모든 시료에서 유의적으로 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 발효물 중에서 WG-HE의 경우에는 LPS보다는 낮지만 수삼 또는 균사체 열수추출물보다는 유의적으로 우수한 활성(1.32배)을 나타

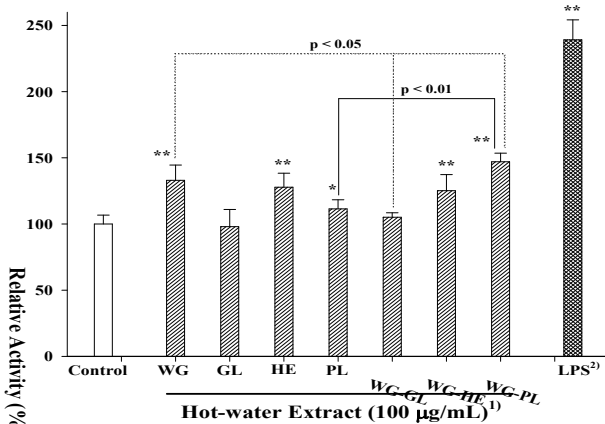


Fig. 2. Effect of hot-water extracts from the fermented Korean ginseng with *G. lucidum*, *H. erinaceum*, and *P. linteus* on mitogenic activity. ¹⁾WG: hot-water extract from Korean ginseng, GL/HE/PL: hot-water extracts from *G. lucidum*, *H. erinaceum* and *P. linteus* mycelium, WG-GL/WG-HE/WG-PL: hot-water extracts from the fermented Korean ginseng with *G. lucidum*, *H. erinaceum* and *P. linteus* mycelium. ²⁾LPS: lipopolysaccharide (10 µg/mL, positive control). Values are mean ± SD (n=4). *p<0.05 and **p<0.01; significant difference between the saline control and hot-water extract.

내었다(Fig. 3). 마크로파지는 NO(24) 및 IFN-γ (25)에 의한 증가된 effector 물질에 의해 감염과 암에 대한 방어체계에서 중요한 역할을 담당하고 있는 대표적인 면역세포이다. 따라서 수삼 고체발효물의 마크로파지 활성이 수삼 및 균사체 추출물과 유의적으로 큰 차이를 보이지는 않았으나(Fig. 3), 복강대식세포의 NO 생성능을 살펴보기로 하였다. 그 결과, 수삼 고체발효물 중 WG-HE와 WG-PL의 경우에는 10 µg/mL의 농도에서도 수삼 열수추출물(saline control의 1.04배)보다 NO 생성능이 증가되었음을 확인할 수 있었다(1.33~1.41배, Table 2). 또한, 일반적으로 복강 대식세포는 IFN-γ와 LPS 등의 자극으로 NO의 생성이 증가되나(26), 50 µg/mL의 고체발효물 시료농도에서는 LPS 자극에 의한 군보다도 NO 생성능이 증가할 뿐만 아니라 WG(대조군의 1.55배)와 비교하여 유의적으로 더욱 큰 차이(WG-HE: 2.27배, WG-PL: 2.18배)를 보이고 있음을 나타내었다(Table 2). 이러한 결과는 수삼의 균사체 고체발효물이 마크로파지 활성화에 따른 NO 생성의 증가에 관여하여 감염미생물 또는 암

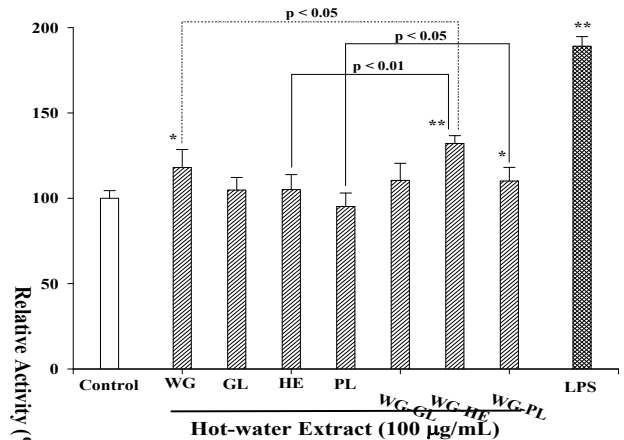


Fig. 3. Effect of hot-water extracts from the fermented Korean ginseng with *G. lucidum*, *H. erinaceum*, and *P. linteus* on macrophage stimulating activity.

Table 2. Effect of hot-water extracts from the fermented Korean ginseng with *G. lucidum*, *H. erinaceum*, and *P. linteus* on nitric oxide and TNF-α production from peritoneal macrophages

Sample ¹⁾	Nitrite (µM)	TNF-α (pg/mL)	
Control	2.81 ± 0.02	154.2 ± 15.9	
LPS (1 µg/mL)	4.41 ± 0.02*	917.7 ± 71.6*	
Sample	10 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL
WG	2.93 ± 0.02*	4.37 ± 0.03*	285.4 ± 28.5*
GL	2.75 ± 0.12	3.45 ± 0.03*	210.3 ± 18.6*
HE	2.72 ± 0.02*	4.28 ± 0.13*	291.2 ± 25.4*
PL	2.86 ± 0.02*	3.51 ± 0.02*	364.9 ± 53.7*
WG-GL	3.12 ± 0.02*	3.85 ± 0.89	479.3 ± 59.9*
WG-HE	3.95 ± 0.02*	6.38 ± 0.03*	489.2 ± 43.7*
WG-PL	3.74 ± 0.02*	6.12 ± 0.03*	549.0 ± 45.8*

¹⁾Values are the means ± SD, and *p<0.01; significant difference between saline control and hot-water extract.

세포에 대한 방어 작용을 강화할 수 있음을 보여주는 결과로 생각한다.

이러한 고체발효물의 면역 활성화 결과로부터 마이토젠 활성에서는 시료대조군인 수삼 또는 균사체 열수추출물보다 수삼의 균사체 고체발효물, 특히 수삼의 상황버섯 고체발효물이 유의적으로 높은 활성을 보임을 알 수 있었다. 또한, 마크로파지 활성화와 NO 생성능의 경우에서도 수삼의 노루궁뎅이 고체발효물이 수삼 또는 균사체 대조군보다 유의적으로 높은 활성을 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 고체발효물의 면역 활성화 결과는 기능성식품 소재로서의 이용가능성을 더욱 높여주었는데 이와 같은 활성화에 미치는 영향을 구체적으로 규명하기 위하여 비장세포와 대식세포의 배양액에 생산되어진 다양한 cytokine류 등을 다음과 같이 분석하였다.

유용균사체 수삼 고체발효물 열수추출물의 사이토카인 생성능

비장세포는 면역복합세포로서 면역세포 중에서도 세포성 면역에 관여하는 T 세포, 마크로파지 및 체액성 면역에 관여하는 B 세포로 구성되어 있고 면역 활성화 물질에 자극을 받으면 여러 가지 cytokine들을 분비한다. Cytokine은 백혈구가 분비하는 생리활성물질로서 T 세포 또는 마크로파지와 같은 백혈구 간에 신호를 주고받는 신호단백질이며 종류에 따라 T 세포 또는 마크로파지의 활성화, 증식유도 및 분화를 촉진하기도 한다(27). 특히 백혈구에서 분비되는 cytokine은 백혈구 세포사이를 증가하는 생리활성물질로서 interleukin (IL)이라고 명명하였으며 면역계가 질병과 감염에 맞서 싸우도록 자극하는 단백질의 한 형태이다. 여러 종류의 백혈구에서 interleukin이 발견되었는데 물리적-화학적 성상이 확인된 것으로는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5와 IL-6 등이 대표적이다. 이러한 interleukin들은 함께 작용하여 백혈구가 질병에 대항하도록 연속적으로 반응하는데, 상처부위에 세균이 침입하면 마크로파지의 백혈구가 세균을 인식하고 interleukin을 방출하여 T 세포를 활성화하고 T 세포는 세균을 파괴하며 interleukin과 다른 유사한 화학물질을 방출하여 면역계의 여러 세포를 활성화시켜서 세균을 공격하게 되는 것이다(28). 따라서 수삼을 기질로 배양한 각종 버섯의 고체발효물이 면역계에 주요한 세포인 비장세포의 활성화에 미치는 영향을 검토하여 WG-PL이 수삼 대조군 추출물보다 우수한 활성을 가지고 있음을 확인(Fig. 2)하였으므로 이에 대한 비장세포 활성화의 근거를 제시하고자 비장세포가 생산하는 cytokine류 중 IL-2를 검토하고자 하였다. IL-2는 T 세포 성장인자로서 CD 4-T 세포에 의해 생산되어 autocrine factor로 작용하며 NK cell에 작용하여 성장을 촉진하고 살해능력을 강화하여 lymphokine activated killer(LAK)로의 분화를 촉진하며 B 세포의 성장을 촉진하기도 한다(29). Fig. 4는 시료에 대한 비장세포의 IL-2 생산에 미

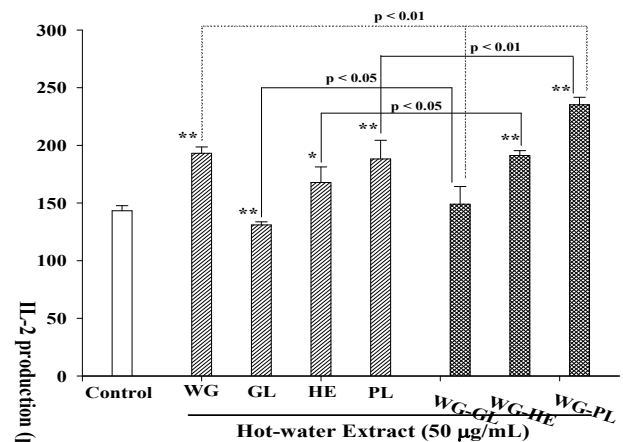


Fig. 4. Effect of hot-water extracts from the fermented Korean ginseng with *G. lucidum*, *H. erinaceum*, and *P. linteus* on IL-2 production from splenocytes.

치는 효과를 조사한 결과로서 수삼의 상황버섯 고체발효물, WG-PL의 IL-2 생산능이 가장 높았으며(50 µg/mL, 대조군의 1.64배), 다음으로는 수삼과 WG-HE의 생산능이 높게 나타나 마이토젠 활성화와 일치하는 경향을 확인할 수 있었다. 즉, 수삼의 상황버섯 고체발효물, WG-PL이 T 세포를 활성화한 후 T 세포로부터 활성화 cytokine으로 알려진 IL-2 생산을 촉진하게 되고 IL-2가 다시 비장세포의 증식을 촉진하는 것으로 생각된다.

한편, cytokine은 염증과 전반적인 면역반응에 중요한 초기 매개체이며 만성염증과 다른 질환을 만들 수 있는 병리적 조건을 촉진하는데 중요한 역할을 한다. 특히, 중앙괴사인자 알파(tumor necrosis factor, TNF- α)는 암세포의 출혈괴사를 유도하는데 암세포를 죽일 수 있는 주요한 cytokine 중의 하나로서 활성화된 마크로파지와 상피세포에 의해서 주로 생산된다(30). TNF- α 는 암세포를 죽일 뿐만 아니라 정상세포에도 작용하여 식세포의 세균 살해 작용, T 세포의 활성화, B 세포의 항체생산을 위한 보조인자로서의 작용 및 생체방어기구가 정상적으로 작용하고 있는 증거라고도 할 수 있는 발열도 TNF- α 가 뇌의 발열증추를 자극함으로써 나타나고 상처가 났을 때 치료를 위한 염증반응도 일으킨다. 따라서 TNF- α 가 몸 안에서 순조롭게 만들어지면 몸 컨디션도 좋고 병에 걸리는 일도 없이 건강을 유지하게 된다. 기본적으로 cytokine은 생명유지에 필수적인 물질이며 cytokine의 이상은 염증이나 알레르기, 또는 암을 초래한다. 수삼을 기질로 배양한 버섯균사체 수삼 고체발효물의 열수추출물(WG-GL, WG-HE, WG-PL)이 시료농도 50 µg/mL에서 시료대조군인 버섯균사체 열수추출물(GL, HE, PL) 또는 수삼 열수추출물(WG)보다 마크로파지 세포로부터 더 많은 TNF- α 를 분비했으며, 특히 WG-PL의 경우에는 saline control의 3.56배나 높은 TNF- α 의 생성능을 나타내었다(Table 2).

지금까지의 다양한 면역 활성화 검토로부터 수삼에 대한 균사체의 발효(생물학적 변환기술)가 생리활성이 함유된 수삼

또는 균사체의 면역 활성화에 시너지효과를 유발하여 기능성 소재로서의 개발가능성이 높음을 확인할 수 있었다. 향후 균사체 수삼 고체발효물의 면역 활성 유효성분을 다량으로 회수하여 수삼/균사체 등에 함유된 유효성분과 비교하고 면역 활성의 증강에 기여하는 고체발효물 활성물질을 규명하고자 한다. 또한, 산업적으로 적용할 수 있는 최적의 발효공정을 개발하여 기능성소재로서 다양한 식품개발에 이용될 수 있는 기반을 마련하고자 한다.

요 약

기능성음료 등에 수삼을 적극적으로 활용하기 위하여 영지버섯(*Ganoderma lucidum*), 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*) 및 상황버섯(*Phellinus linteus*)의 균사체를 이용한 균사체의 수삼 고체발효물을 조제하였다. 일반성분 분석결과, 고체발효물(4.66~12.02%)은 수삼(1.6%)보다 많은 조지방을 함유하고 있었고 조단백질의 경우에는 이와 반대로 고체발효물에서 수삼보다 함량이 적었다. 본 연구에서는 이와 같이 조제한 수삼의 균사체 고체발효물에 대하여 마이토젠 활성을 검토한 결과, WG-PL 열수추출물의 마이토젠 활성은 수삼 또는 3종류의 균사체만의 발효물(GL, HE, PL)로부터 조제된 열수추출물보다 IL-2 생산능(saline control)의 1.64배)과 비장세포 증식활성(1.47배)에서 유의적으로 더 높은 활성을 보였다. 또한 수삼 고체발효물과의 반응에서 마크로파지 lysosomal phosphatase 활성(WG-HE; 1.32배)과 NO 및 TNF- α 생산능(WG-HE: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 시료 농도에서 2.27배, WG-PL: 3.56배)이 WG 또는 균사체보다 유의적으로 우수한 활성을 나타내었다. 이러한 결과로부터 수삼의 유용균사체 고체발효물의 열수추출물은 고체발효에 의해 수삼과는 다른 화학적 조성을 포함하고 있음을 알 수 있었으며 이러한 조성이 면역 활성화에 유용하게 기여하는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20080401-034-033-008-02-00)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Huang KC. 1998. A brief history of Chinese medicine. In *The Pharmacology of Chinese Herbs*. CRC Press, Florida, USA. p 11-23.
2. Park CK, Kwak YS, Hwang MS, Kim SC, Do JH. 2007. Trends and prospect of ginseng products in market health functional food. *Food Science and Industry* 40: 30-45.
3. Park CK, Jeon BS, Yang JW. 2003. The chemical components of Korean ginseng. *Food Industry and Nutrition* 8: 10-23.

4. Ko SR, Choi KJ, Kim HK, Han KW. 1996. Comparison of proximate composition, mineral nutrients, amino acid and free sugar contents of several *Panax* species. *Korean J Ginseng Sci* 20: 36-41.
5. Choi HJ, Han HS, Park JH, Son JH, Bae JH, Seung TS, Choi C. 2003. Antioxidative, phospholipase A2 inhibiting, and anticancer effect of polyphenol rich fractions from *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46: 251-256.
6. Kaku T, Miyata T, Urano T, Sako I, Kinoshita A. 1975. Chemico-pharmacological studies on saponins of *Panax ginseng* C.A. Meyer. II. Pharmacological part. *Arzneimittelforschung* 25: 539-547.
7. Kwon SH, Kim CN, Kim CY, Kwon ST, Park KM, Hwangbo S. 2003. Antitumor activities of protein-bound polysaccharide extracted from mycelia of mushroom. *Korean J Food & Nutr* 16: 15-21.
8. Chang ZQ, Oh BC, Lee SP, Rhee MH, Park SC. 2008. Comparative immunomodulating activities of polysaccharides isolated from *Phellinus* spp. on cell-mediated immunity. *Phytother Res* 22: 1396-1399.
9. Yim MH, Shin JW, Son JY, Oh SM, Han SH, Cho JH, Cho CK, Yoo HS, Lee YW, Son CG. 2007. Soluble components of *Hericium erinaceum* induce NK cell activation via production of interleukin-12 in mice splenocytes. *Acta Pharmacol Sin* 28: 901-907.
10. Yu KW, Shin KS, Choi YM, Suh HJ. 2004. Macrophage stimulating activity of exo-biopolymer from submerged culture of *Lentinus edodes* with rice bran. *J Microbiol Biotechnol* 14: 658-664.
11. Percario S, Odorizzi VF, Souza DRS, Pinhel MAS, Gennari JL, Gennari MS, Godoy MF. 2008. Edible mushroom *Agaricus sylvaticus* can prevent the onset of atheroma plaques in hypercholesterolemic rabbits. *Cell Mol Biol* 54: OL1055-1061.
12. Lee JS, Park BC, Ko YJ, Choi MK, Choi HG, Yong CS, Lee JS, Kim JA. 2008. *Griboia frondosa* (maitake mushroom) water extract inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis through inhibition of reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *J Med Food* 11: 643-651.
13. Yoon TJ, Yu KW, Shin KS, Suh HJ. 2008. Innate immunity stimulation of exo-polymers prepared from *Cordyceps sinensis* by submerged culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 80: 1087-1093.
14. Sullivan R, Smith JE, Rowan NJ. 2006. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine. *Perspect Biol Med* 49: 159-170.
15. Zhu T, Kim SH, Chen CY. 2008. A medicinal mushrooms: *Phellinus linteus*. *Curr Med Chem* 15: 1330-1335.
16. Mahajna J, Dotan N, Zaidman BZ, Petrova RD, Wasser SP. 2009. Pharmacological values of medicinal mushrooms for prostate cancer therapy: the case of *Ganoderma lucidum*. *Nutr Cancer* 61: 16-26.
17. AOAC. 2006. *Official Methods of Analysis*. 18th ed. Association of Official Analytical Chemistry, Washington DC, USA. 925.10, 922.06, 991.20.
18. Sugawara I, Ishizaka S, Tsuji T, Nishiyama T. 1984. MTT assay: rapid colorimetric assay applicable to cellular proliferation and cytotoxicity assay. *Igakuno Ayumi* 128: 733-735.
19. Andoh, A, Fujiyama Y, Kitoh K, Niwakawa M, Hodohara K, Bamba T, Hosoda S. 1993. Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) enhances complement component C3 production by human monocytes/macrophages. *Int J*

- Hematol* 57: 53-59.
20. Conrad RE. 1981. Induction and collection of peritoneal exudates macrophages. In *Manual of Macrophage Methodology*. Herscovitz BH, Holden HT, Bellanti JA, Ghaffar A, eds. Marcel Dekker Incorporation, New York, USA. p 5-11.
 21. Suzuki I, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M, Yadomae T. 1990. Effect of orally administered β -glucan on macrophage function in mice. *Int J Immunopharmacol* 12: 675-684.
 22. Prakash H, Ali A, Bala M, Goel HC. 2005. Anti-inflammatory effects of *Podophyllum hexandrum* (RP-1) against lipopolysaccharides induced inflammation in mice. *J Pharm Pharm Sci* 8: 107-114.
 23. Zheng S, Li C, Ng TB, Wang HX. 2007. A lectin with mitogenic activity from the edible wild mushroom *Boletus edulis*. *Process Biochem* 42: 1620-1624.
 24. Nathan CF, Hibbs JB Jr. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3: 65-70.
 25. Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu US, Heckert RA, Tani H, Sasai K, Baba E, Lillehoj EP. 2005. Differential responses of macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. *Vet Immunol Immunopathol* 107: 327-335.
 26. Suzuki M, Takatsuki F, Maeda YY, Hamuro J, Chihara G. 1994. Antitumor and immunological activity of lentinan in comparison with LPS. *Int J Immunopharmacol* 16: 463-468.
 27. Ioannidou E. 2006. Therapeutic modulation of growth factors and cytokines in regenerative medicine. *Curr Pharm Des* 12: 2397-2408.
 28. Wood PR, Seow HF. 1996. T cell cytokines and disease prevention. *Vet Immunol Immunopathol* 54: 33-44.
 29. von Rohr A, Thatcher N. 1992. Clinical applications of interleukin-2. *Prog Growth Factor Res* 4: 229-246.
 30. Duerksen-Hughes PJ, Day DB, Laster SM, Zachariades NA, Aquino L, Gooding LR. 1992. Both tumor necrosis factor and nitric oxide participate in lysis of simian virus 40-transformed cells by activated macrophages. *J Immunol* 149: 2114-2122.

(2009년 6월 30일 접수; 2009년 8월 20일 채택)