

Solid-State Culture를 이용하여 조제한 노루궁뎅이버섯 균사체-뽕잎발효물의 면역 및 항염증 활성

- 연구노트 -

김 훈^{1,2} · 정재현¹ · 신지영² · 김동구² · 유광원^{1*}

¹충주대학교 식품공학과

²(주)코시스바이오 기업부설연구소

Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Activity of Mulberry (*Morus alba*) Leaves Fermented with *Hericium erinaceum* Mycelium by Solid-State Culture

Hoon Kim^{1,2}, Jae-Hyun Jeong¹, Ji-Young Shin², Dong-Goo Kim², and Kwang-Won Yu^{1*}

¹Dept. of Food Science and Technology, Chungju National University, Chungbuk 368-701, Korea

²R & D Center, Cosis Bio Corporation Limited, Chungbuk 365-863, Korea

Abstract

After mulberry (*Morus alba*) leaves were fermented with *Hericium erinaceum* mycelium by solid-state culture to enhance physiological activity, fermented mulberry leaves (MA-HE) was extracted by hot-water (MA-HE-HW) and ethanol (MA-HE-E). MA-HE-HW showed enhanced mitogenic and intestinal immune system modulating activities (1.41 and 1.52 fold of saline control, respectively) compared to hot-water extracts of non-fermented mulberry leaves (MA-HW) and *H. erinaceum* mycelium (HE-HW) at 100 µg/mL. Meanwhile, when we tested the inhibitory effects of extracts on nitric oxide (NO), tumor necrosis factor (TNF)-α, and interleukin (IL)-1β and IL-6 production, MA-HE-E significantly inhibited these pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 cells (45.1, 41.3, 70.2, and 55.7% inhibition of LPS control at 1,000 µg/mL). In addition, MA-HE-HW and MA-HE-E did not show any cytotoxicity on RAW 264.7 cells at 1,000 µg/mL whereas HE-E and MA-E indicated cytotoxicity (80.1 and 30.7% cell viability of saline control). These results suggest that mulberry leaves fermented with *H. erinaceum* by solid-state culture might have enhanced immunomodulatory and anti-inflammatory effects compared to non-fermented mulberry leaves, resulting in ingredients biotransformed for fermentation with *H. erinaceum* mycelium.

Key words: *Hericium erinaceum*, mulberry leaves, solid-state culture, immunomodulation, anti-inflammation

서 론

뽕잎(mulberry leaves)은 뽕나무과(Moraceae)의 뽕나무속(*Morus*)에 속하는 열대에서 온대지방까지 널리 분포하고 있는 식물(*Morus alba*)의 잎으로 오래 전부터 식용 혹은 약용으로 널리 이용되어왔다. 뽕잎에는 alanine, aspartic acid, glutamic acid, serine과 tyrosine 등의 함량이 높아서 숙취해소 및 순환계 질환을 예방해 주며, γ-aminobutyric acid (GABA)와 rutin 성분에 의한 노인성 치매와 동맥경화를 막아주는 작용도 알려져 있다(1,2). 또한 뽕잎에는 flavonoids, steroids, triterpenes, 비타민 등과 다량의 무기질 성분이 존재하여 녹차와 비교할 때 Ca, Fe 및 K이 1.4~6배 높은 것으로 보고되고 있다(3,4). 뽕잎의 생리활성에 관한 연구로는 혈압상승 억제효과, 식욕 및 포만감을 조절하여 체중을 감소시키는 효과, 뽕잎발효차의 항암 및 항산화 효과, 뽕잎추출

물에 의한 염증 억제효과, 항 당뇨 및 항 고지혈증효과(5-10) 등이 보고되었으며, Ahn 등(11)은 뽕잎추출액을 첨가한 발효유의 이화학적 및 관능적 특성을 분석하여 뽕잎추출액의 가공식품 적합성도 검토하였다. 그러나 지금까지의 연구는 뽕잎의 영양학적 특성 및 뽕잎추출물에 관한 생리활성 내용이 대부분이었고 뽕잎을 고등균류인 버섯균사체로 발효시켜 생리활성을 증강시키거나 이로부터 활성성분을 분리한 연구는 거의 없는 실정이다.

한편, 대표적인 약용버섯 중 하나인 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*)은 가을철 활엽수의 고목이나 생목에서 주로 발생하며 일본, 동남아시아, 유럽, 북아메리카 등에 분포되어 있다. 노루궁뎅이버섯의 자실체 생산은 광선, 온도, 습도의 제어를 필요로 하며 유효성분의 추출수율이 낮아 식용이외의 산업화는 미비한 실정(12)으로 최근 자실체보다는 배양이 용이하고 추출수율이 우수한 자실체 발생이전 단

*Corresponding author. E-mail: kwyu@cjnu.ac.kr
Phone: 82-43-820-5333, Fax: 82-43-820-5850

개인 균사체의 액체배양에 의한 항산화활성, 항암활성과 면역증강 활성 등의 생리활성에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다(13-15). 따라서 노루궁뎅이 균사체가 뿌이를 영양원으로 생육할 수 있다면, 균류의 생물학적 변환능력(biotransformation)에 의한 뿌이의 유용성분 증진과 이로 인한 활성에서의 시너지 효과를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 균사체가 배양된 뿌이발효물의 식품소재화를 통하여 뿌이과 균사체의 유용성분을 모두 섭취할 수 있다는 장점을 제공할 수 있는 것으로 생각한다.

본 연구에서는 이러한 목적을 달성하기 위하여 약용 및 식용으로 이용되어 왔고, 건강식품으로 널리 알려진 뿌이에 다양한 생리활성 효능을 가지고 있는 유용균사체 고등균류인 노루궁뎅이버섯 균사체를 solid-state culture 방법으로 배양하여 뿌이발효물을 조제한 후 면역 및 항염증 활성의 증진효과를 관찰함으로써 기능성소재로 이용하기 위한 기초자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

Solid-state culture를 이용한 노루궁뎅이버섯 균사체-뿌이발효물의 조제

노루궁뎅이버섯(*H. erinaceum*, HE) 균사체는 충북농업기술원(Chungbuk, Korea)으로부터 분양받아 potato dextrose agar(PDA, Difco, Detroit, MI, USA) 사면배지에서 25°C, 10일간 배양한 후 4°C에 보존하면서 4주마다 계대배양하여 사용하였다. 또한, 노루궁뎅이 균사체 종균은 10종의 일반배지 중 균사체 생육이 가장 왕성한 mushroom complete medium(MCM) 액체배지에 대하여 유원 HT(Gyeongbuk, Korea)에서 구입한 뿌이(*M. alba* leaves, MA)의 열수추출물(65°Bx)이 5%(v/v) 농도가 되도록 첨가하고 진탕배양기(SI-4100R, Jeio Tech., Daejeon, Korea)에서 25°C로 배양하였다. 한편, solid-state culture를 이용한 노루궁뎅이 균사체의 뿌이발효물(노루궁뎅이버섯 균사체-뿌이발효물, MA-HE)은 뿌이를 수세한 후 실온에서 3-4일간 건조시켜 수분함량을 조절하고 조직을 연화시킨 다음, 121°C에서 20분간 고압멸균하고 노루궁뎅이 균사체 종균을 10%(v/v) 접종하여 25°C에서 30일간 배양(multi room incubator, Vision Scientific, Gyeonggi-do, Korea)한 후 동결건조 하여 조제하였다.

노루궁뎅이버섯 균사체-뿌이발효물의 열수 및 에탄올추출물 조제

Solid-state culture를 이용하여 조제한 MA-HE의 면역 및 항염증 활성은 열수와 에탄올추출물을 조제하여 확인하였다. 먼저, 열수추출물은 MA-HE에 20배의 증류수를 첨가하고 homogenizer(Ultra-turrax T-50, Janke & Kunkel GmbH & Co., KG-IKA-Labortechnik, Staufen, Germany)로 5,000 rpm에서 10분간 분쇄한 후 열수추출하였으며, 여과

(No. 2, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 잔사와 추출액을 분리하고 잔사는 다시 반복추출 하였다. 2회 열수추출하여 얻은 추출액은 모두 합쳐 원심분리(7,600×g, 4°C, 30분)로 불용성 침전물을 제거하고 농축 및 동결건조 하여 노루궁뎅이버섯 균사체-뿌이발효물의 열수추출물(MA-HE-HW)로 조제하였다. 한편, 에탄올추출물은 MA-HE에 5배의 95% 에탄올을 첨가한 후 stirring mantle(MS-ES, Misung S&I, Daejeon, Korea)에서 2,000 rpm, 70°C의 온도로 2시간 동안 환류시켜 추출한 후 여과하여 잔사와 추출액으로 분리하였다. 잔사는 다시 반복추출 하였으며 5회 환류추출 하여 얻은 추출액은 모두 합쳐 원심분리, 농축 및 동결건조를 거쳐 에탄올추출물(MA-HE-E)로 조제하였다. 또한, 발효시키지 않은 대조군 뿌이(MA) 및 액체배양으로 얻은 노루궁뎅이 균사체 종균(HE)도 동일한 방법으로 처리하여 비발효 뿌이 및 노루궁뎅이 균사체의 열수(MA-HW와 HE-HW) 및 에탄올추출물(MA-E와 HE-E)로 조제한 후 노루궁뎅이버섯 균사체-뿌이발효물의 용매추출물(MA-HE-HW와 -E)과 활성을 비교하기 위한 시료대조군으로서 사용하였다.

실험동물과 세포배양

면역활성 측정을 위한 실험동물은 생후 6주령의 자성 C3H/He 및 BALB/c 마우스를 (주)샘타코(Gyeonggi-do, Korea)에서 구입한 후 사육조에 넣고 정수된 물과 실험동물용 펠렛사료(Samyang Co., Incheon, Korea)를 자유공급 하였다. 동물세포 배양을 위한 RPMI-1640 배지와 Hank's balanced salt solution(HBSS), penicillin, streptomycin, fetal bovine serum(FBS)은 모두 GenDEPOT(Barker, TX, USA)로부터 구입하였으며, fungizone과 amphotericin B는 Gibco-BRL Co.(Grand Island, NY, USA)에서 입수하였다. 또한, 세포생존률 및 면역활성 활성을 측정하기 위한 cell counting kit(CCK)-8은 Dojindo Laboratories(Kumamoto, Japan)로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 한편, 항염증실험에 사용된 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포주는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받았다. RAW 264.7 세포주는 10% FBS와 100 U/mL의 penicillin, 100 µg/mL의 streptomycin 및 125 ng/mL의 fungizone과 amphotericin B를 함유한 DMEM(GenDEPOT) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기(Vision Scientific)에서 2~3일간격으로 계대하면서 배양하였다. 또한, 항염증실험에서 염증유도를 위한 lipopolysaccharide(LPS from *Escherichia coli*)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, tumor necrosis factor(TNF)-α, interleukin(IL)-1β 및 IL-6를 정량하기 위한 ELISA kit는 BD Bioscience(San Diego, CA, USA)에서 입수하여 실험에 사용하였다.

비장세포의 마이토젠 활성

BALB/c 마우스(6주령, female)를 경추탈구 시킨 후 멸균

적으로 비장을 적출하여 마쇄하고 0.2% NaCl과 금속망(200 mesh)을 이용하여 적혈구와 이물질을 제거시킨 후 비장세포(splenocyte)를 회수하였다. 회수한 비장세포는 10% FBS와 100 U/mL의 penicillin, 100 µg/mL의 streptomycin 및 125 ng/mL의 fungizone과 amphotericin B를 함유한 RPMI-1640 배지로 2~3회 세척하고 세포수를 5×10^6 cells/mL로 조정하여 비장세포 현탁액을 조제하였다. 비장세포 현탁액은 96-well plate(SPL life science, Gyeonggi-do, Korea)의 각 well에 90 µL씩 분주하고 적당한 농도로 희석한 시료 10 µL를 첨가하여 46시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 시료의 마이트젠 활성은 CCK-8 kit 용액을 10 µL 첨가하여 4시간 배양한 후 450 nm에서 흡광도(Sunrise, TECAN, Grödingen, Austria)를 측정하여 saline 대조군의 비장세포 증식도에 대한 상대활성(%)으로 나타내었다. CCK-8은 고감도의 수용성 tetrazolium염을 이용하는 cell viability assay kit로서 세포의 dehydrogenase에 의해 환원되어 수용성 formazan을 형성하여 450 nm에서 측정하므로 formazan을 회수하여 유기용매에 용해시킬 필요가 없어 간단하고 감도가 높으며 안정성이 양호하여 세포생존률 및 세포 증식실험에 많이 이용되고 있다(16).

Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성

C3H/He 마우스 복부를 절개하여 소장벽 위에 존재하는 Peyer's patch를 조심스럽게 적출한 후 HBSS 용액이 담긴 peter dish에 옮겨 마쇄하고 0.2% NaCl과 금속망을 이용하여 적혈구와 이물질을 제거한 후 Peyer's patch 세포현탁액을 조제하였다. 세포현탁액은 10% FBS를 함유한 RPMI-1640 배지로 세척하여 2×10^6 cells/mL의 세포농도로 조정된 후 96-well plate에 180 µL씩 분주하고 적당한 농도로 희석한 시료를 20 µL씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 골수세포 증식활성에 사용하였다. 한편, 골수세포는 동일종 마우스의 대퇴부 뼈로부터 회수하여 여과, 세척하고 2.5×10^5 cells/mL의 세포농도로 조정된 후 96-well plate에 100 µL씩 분주하였다. 분주된 골수세포에 위에서 언급한 Peyer's patch 세포와 시료의 반응으로부터 회수한 상등액과 10% FBS 함유 RPMI-1640 배지를 각각 50 µL씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일간 배양하였다(17). 시료의 Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성은 6일간 배양된 배양액에 CCK-8 kit 용액 20 µL를 첨가하고 4시간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 saline 대조군의 골수세포 증식도에 대한 상대활성(%)으로 나타내었다.

염증성 사이토카인 및 nitric oxide(NO) 억제능 측정

노루궁뎅이버섯 균사체-뿔잎발효물의 열수 및 에탄올추출물에 대한 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β 및 IL-6)과 NO 억제능을 측정하기 위해서 RAW 264.7 세포를 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지에서 $1 \sim 5 \times 10^6$ cells/mL로

조정하여 96-well plate에 200 µL씩 분주한 뒤 5% CO₂ 배양기에서 배양시켜 세포를 부착시켰다. 12시간 뒤 배양액을 모두 제거하고 새로운 10% FBS 함유 RPMI-1640 배지 160 µL와 농도별로 희석된 시료 20 µL를 함께 첨가한 다음, 30분 후에 LPS를 처리하고 다시 6시간(TNF-α), 48시간(NO와 IL-1β) 및 24시간(IL-6) 동안 각각 배양하였다. LPS로 유도된 염증성 사이토카인 및 NO의 측정은 세포배양 상등액을 50~100 µL 취하여 BD Bioscience사의 사용방법 및 Griess reagent 반응법(18)을 이용하여 측정하고 LPS 처리군의 생성능에 대한 억제율(%)로 나타내었다. 한편, 각 시료의 사이토카인 및 NO 억제능을 측정하기 위해서는 시료의 RAW 264.7 세포에 대한 독성확인이 선행되어야 하기 때문에, RAW 264.7 세포에 대한 시료의 독성여부를 CCK-8을 사용하여 측정하고 saline 대조군에 대한 세포생존률(%)로 나타내었다.

통계처리

실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 실험결과의 평균과 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하고 평균치±SD로 나타내었으며 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 각 측정값간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

결과 및 고찰

노루궁뎅이버섯 균사체-뿔잎발효물 용매추출물의 면역활성

면역활성이 증진된 새로운 기능성소재를 개발하기 위하여 solid-state culture를 이용한 노루궁뎅이버섯 균사체-뿔잎발효물(MA-HE)을 조제하였다. 시료대조군인 비발효 뿔잎 및 액체배양으로 회수한 노루궁뎅이버섯 균사체와 면역활성을 비교하기 위하여 MA-HE의 열수추출물(MA-HE-HW, 발효물에 대한 수율 23.03%) 및 에탄올추출물(MA-HE-E, 수율 6.34%)을 조제하였으며, 비발효 뿔잎의 열수추출물(MA-HW, 수율 23.81%)과 에탄올추출물(MA-E, 수율 11.77%) 및 균사체의 열수추출물(HE-HW, 수율 51.52%)과 에탄올추출물(HE-E, 수율 33.48%)도 동일한 방법으로 조제하였다. 먼저, 비장세포를 이용한 마이트젠 활성의 경우에는 시료농도 100 µg/mL에서 시료대조군인 MA-HW(saline 대조군의 1.16배)보다 노루궁뎅이버섯 균사체-뿔잎발효물 열수추출물인 MA-HE-HW(1.41배)가 유의적으로 높은 활성을 나타내었으며 HE-HW(1.30배)에 비해서도 활성이 증가되었음을 확인하였다(Table 1). 그러나 에탄올추출물의 경우에는 MA-HE-E가 1.25배로서 시료대조군인 MA-E 또는 HE-E 등과 유의적인 차이를 나타내지 않았을 뿐만 아니라 열수추출물인 MA-HE-HW보다 유의적으로 낮은 활성을 나타내었다(Table 1). 한편, 소장에 분포되어 있는 Peyer's patch는 국소면역과 순환계 면역을 연결하는 대표적인 장관

Table 1. Immunomodulating activity of solvent extracts from fermented mulberry (*Morus alba*) leaves with *Hericium erinaceum* mycelium by solid-state fermentation

Sample ¹⁾ (100 µg/mL)	Relative activity (%)	
	Mitogenic activity	Intestinal immune system modulating activity
Control	100.0±2.8 ^{a2)}	100.0±8.8 ^a
HE-HW	130.3±4.3 ^{cd}	119.8±6.0 ^b
MA-HW	116.5±5.0 ^{bc}	133.8±6.6 ^c
MA-HE-HW	141.3±3.6 ^d	152.3±3.4 ^d
HE-E	111.2±13.7 ^{ab}	119.1±6.8 ^b
MA-E	119.2±12.0 ^{bc}	135.7±2.6 ^c
MA-HE-E	124.8±7.1 ^{bc}	132.3±6.4 ^c

¹⁾Control: only saline without extract, HE-HW/E: hot-water or EtOH extract from *H. erinaceum*, MA-HW/E: hot-water or EtOH extract from non-fermented mulberry leaves, MA-HE-HW/E: fermented mulberry leaves with *H. erinaceum*.

²⁾Results are expressed as mean±SD of quadruplicate samples, and different superscript is significantly different ($p<0.05$) in each activity.

면역기관으로서 면역활성에 중요한 의의를 갖는 것으로 알려져 있다(19,20). 따라서 구강으로 섭취된 면역활성 유도물질의 경우에 Peyer's patch에 존재하는 M cell의 phagocytosis 작용으로 면역세포를 활성화시킬 수 있고 활성화된 면역세포는 전신을 순환하면서 면역계를 자극할 수 있게 되므로 본 실험에서는 이러한 원리를 이용하여 Peyer's patch를 경유한 골수세포 증식활성을 측정하게 되었다. 그 결과, 시료대조군인 HE-HW 또는 MA-HW(각각 saline 대조군의 1.20배와 1.34배)보다 뽕잎발효물 열수추출물인 MA-HE-HW가 1.52배의 유의적으로 증가된 활성을 나타내었다(Table 1). 한편, 에탄올추출물인 MA-HE-E의 경우에는 1.32배의 활성으로 시료대조군인 HE-E(1.19배)에 비해 다소 증가된 활성을 나타내었으나, 비발효 뽕잎 에탄올추출물인 MA-E(1.35배)와는 유의적인 차이를 나타내지 않았고 마이트젠 활성과 마찬가지로 MA-HE-HW보다 유의적으로 낮은 활성을 확인하였다(Table 1). 이러한 결과로부터 면역활성에 관여하는 성분은 에탄올추출물에서 유래하는 저분자 물질보다는 다당 또는 단백다당 등의 고분자 성분이 주로 함유되어 있는 수용성 추출물에 기인하고 있음을 알 수 있었다.

노루궁뎅이버섯 균사체-뽕잎발효물 용매추출물의 세포독성

RAW 264.7 세포에 대한 항염증 실험을 진행하기에 앞서 RAW 264.7 세포에 대한 시료의 독성이 없는 농도 조건을 확립하기 위하여 CCK-8 시약을 이용하여 검토하였다. 100 µg/mL의 저농도에서는 모든 시료에서 독성을 나타내지 않았으며(saline 대조군 세포생존률의 97.4~108.3%) 1,000 µg/mL의 고농도에서도 노루궁뎅이버섯 균사체-뽕잎발효물의 열수(99.1%) 및 에탄올추출물(101.0%)과 시료대조군의 열수추출물(MA-HW; 99.0%와 HE-HW; 100.8%)은 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1). 그러나

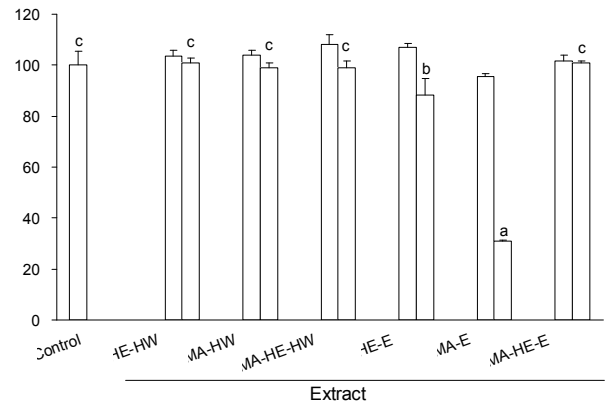


Fig. 1. RAW 264.7 murine macrophage cell viability of solvent extracts from fermented mulberry (*Morus alba*) leaves with *Hericium erinaceum* mycelium by solid-state fermentation. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells/mL) were treated with solvent extracts from fermented mulberry leaves for 48 hr, the cell viability was determined by CCK-8 assay. Control: only saline without extract, HE-HW/E: hot-water or EtOH extract from *H. erinaceum*, MA-HW/E: hot-water or EtOH extract from non-fermented mulberry leaves, MA-HE-HW/E: fermented mulberry leaves with *H. erinaceum*. □: saline without extract, ▨: extract (100 µg/mL), ▩: extract (1,000 µg/mL). Results are expressed as mean±SD of quadruplicate samples, and are shown as cell viability (%) compared to that of control. The different superscript is significantly different ($p<0.05$) in 1,000 µg/mL concentration.

시료대조군인 노루궁뎅이 균사체의 에탄올추출물인 HE-E (80.1%)와 비발효 뽕잎 에탄올추출물인 MA-E(30.7%)는 유의적으로 세포독성을 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 1). 특히, 에탄올추출물 고농도에서 뽕잎발효물(MA-HE-E)과 비발효 뽕잎(MA-E)의 RAW 264.7 세포에 대한 현저한 독성차이는 구성분의 변화를 나타내는 것으로서 고체배양을 통한 노루궁뎅이 균사체의 뽕잎 발효는 균사체 배양이 뽕잎에 생물학적 전환을 일으키고 있음을 제시하는 중요한 결과로 보인다.

노루궁뎅이버섯 균사체-뽕잎발효물 용매추출물의 항염증 활성

그람 음성균의 세포외막 구성성분인 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 자극받은 단구 또는 대식세포는 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완 등 다양한 생물학적 과정에 관여하는 것으로 알려진 NO를 생성하는데 NO는 농도에 따라 세포 기능유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포독성을 일으키기도 한다(21). 특히, NO 합성경로 중 inducible NOS (iNOS)에 의한 NO 생성은 염증자극에 의해 지속적으로 대량 생산이 유도됨으로써 염증반응에 기여하게 되는데(22), 이러한 iNOS는 대식세포에서 TNF- α , IL-1 β 와 IFN- γ 와 같은 염증성 사이토카인의 자극에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다(23). 따라서 염증유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성(24)에 대한 노루궁뎅이버섯 균사체-뽕잎발효물 열수 및 에탄올추출물의 억제효과를 LPS로 유도

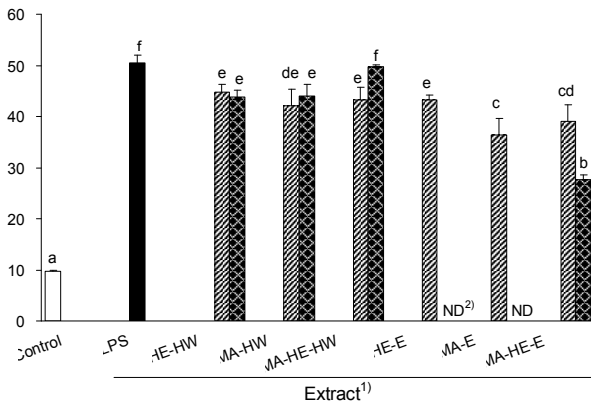


Fig. 2. Inhibitory effect of solvent extracts from fermented mulberry (*Morus alba*) leaves with *Hericium erinaceum* mycelium by solid-state fermentation on the production of nitric oxide (NO) in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell line. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells/mL) were treated with solvent extracts from fermented mulberry leaves for 30 min prior to the addition LPS (1.0 µg/mL), the cells were further incubated for 48 hr. The NO concentrations in the cultured medium were determined by Griess assay. ¹⁾Refer to Fig. 1, and LPS: only LPS treatment without extract. ²⁾ND: not determined because of sample cytotoxicity against RAW 264.7 cell (Fig. 1). □: saline without LPS, ■: lipopolysaccharide (1.0 µg/mL) without extract, ▨: extract (100 µg/mL), ▩: extract (1,000 µg/mL). Results are expressed as mean \pm SD of quadruplicate samples, and different superscript is significantly different ($p < 0.05$).

한 RAW 264.7 murine macrophage 세포에서 측정하였다. LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO의 농도는 50.41 µM이었으나 시료농도 100 µg/mL의 경우, 열수추출물인 MA-HE-HW(43.24 µM, LPS 처리군의 14.2% 억제)는 시료대조군인 HE-HW(44.75 µM, 11.2% 억제) 및 MA-HW(42.13 µM, 16.4% 억제)와 유의적인 NO 생성 억제효과를 나타내지 않았다(Fig. 2). 또한, 동일농도에서 에탄올추출물인 MA-HE-E(39.10 µM, 22.4% 억제)의 경우에도 시료대조군인 HE-E(43.24 µM, 14.2% 억제)보다는 유의적으로 높았으나 MA-E(36.34 µM, 27.9% 억제)보다는 낮은 NO 생성 억제효과를 나타내었다. 그러나 시료농도 1,000 µg/mL에서는 시료대조군인 MA-E와 HE-E는 세포독성을 나타낸 반면, 뿔잎발효물 에탄올추출물인 MA-HE-E는 독성을 나타내지 않으면서 열수추출물(49.79~43.87 µM)보다도 유의적으로 높은 NO 생성 억제효과(27.67 µM, 45.1% 억제)를 나타내었다(Fig. 1과 Fig. 2). 이러한 결과로부터 뿔잎의 균사체 발효과정에서 비발효 뿔잎의 에탄올추출물 중 고농도에서 독성을 나타내었던 성분을 생물학적으로 전환시킬 뿐만 아니라 NO 생성의 억제에 관여하는 유효성분은 증진시키고 있음을 확인할 수 있었다.

한편, 염증(inflammation)은 외부 자극에 대한 생체조직 방어반응의 하나로써 유해물질이나 화학적 자극에 의한 손상으로 일어나며(25), 염증반응이 발생되면 여러 가지 염증 매개인자(pro-inflammatory mediators)가 생성되어 임상적으로 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타난다(26). 특히, 초기 면역반응에 중요한 역할을 하는 선천면역계

세포인 매크로파지가 이물질에 대응할 때 분비하는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등은 숙주에게 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다(27). 또한, 내독소로 잘 알려진 LPS는 RAW 264.7 세포와 같은 매크로파지 또는 단구에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등의 pro-inflammatory 사이토카인을 증가시키는 것으로 알려져 있다(26-28). 따라서 본 실험에서는 노루궁뎅이버섯 균사체-뿔잎발효물 용매추출물의 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 LPS로 유도시킨 RAW 264.7 세포로부터 염증성 매개물질의 억제능을 cytokine level에서 확인하였다(Table 2). 먼저, TNF- α 의 경우에는 시료농도 100 µg/mL에서 LPS 처리군(1,670.7 pg/mL)과 뿔잎발효물 및 시료대조군의 모든 열수 및 에탄올추출물(1,772.8~1,570.5 pg/mL)에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 시료농도 1,000 µg/mL의 고농도에서도 시료대조군 열수추출물인 HE-HW 및 MA-HW(1,662.8과 1,652.4 pg/mL)은 LPS 처리군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2). 그러나 세포독성 실험에서 시료대조군인 비발효 뿔잎과 노루궁뎅이버섯 균사체-뿔잎발효물 에탄올추출물인 MA-HE-E는 독성이 없을 뿐만 아니라 LPS 처리군 또는 MA-HE-HW보다 유의적으로 높은 TNF- α 생성 억제효과(981.1 pg/mL, LPS 처리군의 41.3% 억제)를 나타내어 균사체 발효를 통하여 독성분과 항염증 활성성분이 변화되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1과 Table 2). 한편, TNF- α 와 함께 LPS 자극으로 발열 및 급성기 반응(acute phase reaction)을 유도하는 IL-1 β (28)의 생성결과에서도 100 µg/mL의 저농도에서는 MA-HE-E의 경우에 LPS 처리군(432.9 pg/mL)과 비교하여 유의적으로 IL-1 β 의 생성이 억제되었으나(266.4 pg/mL, LPS 처리군의 38.5% 억제) 시료대조군인 MA-E와는 유의적인 차이를 보이지 않았으며, MA-HE-HW(LPS 처리군의 23.7%의 억제)에서도 시료대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 2). 그러나 시료농도 1,000 µg/mL의 고농도에서는 시료대조군인 MA-E와 HE-E가 세포독성을 보인 반면, 독성을 보이지 않은 뿔잎발효물의 MA-HE-E(128.9 pg/mL)가 70.2%의 높은 IL-1 β 생성 억제효과를 나타내어 염증 매개인자인 IL-1 β 의 생성억제와 관련된 활성성분이 발효과정 중에 증가되고 있음을 보여주었다(Fig. 1과 Table 2). 또한, IL-6에서도 100 µg/mL의 독성이 없는 저농도에서 MA-HE-E 및 MA-HE-HW는 LPS 처리군(1,164.9 pg/mL)과는 유의적인 억제효과를 보였으나(LPS 처리군의 19.5와 9.0% 억제), 시료대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 2). 그러나 1,000 µg/mL의 고농도에서는 TNF- α 및 IL-1 β 의 생성 억제효과와 마찬가지로 MA-HE-E의 경우에 독성이 없으면서 LPS 처리군과 비교하여 55.7%의 유의적인 IL-6 생성 억제효과를 나타낸 반면, 동일농도에서 MA-E와 HE-E는 독성을 나타내어 균사체 발효를 통하여 뿔잎에서

Table 2. Inhibitory effects of solvent extracts from fermented mulberry (*Morus alba*) leaves with *Hericium erinaceum* mycelium by solid-state fermentation on the production of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell line

Extract ¹⁾ ($\mu\text{g/mL}$)	Cytokine production (pg/mL)					
	TNF- α		IL-1 β		IL-6	
	100	1,000	100	1,000	100	1,000
Control	— ²⁾		—		—	
LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)	1,670.7 \pm 82.3 ^{bc}		432.9 \pm 103.3 ^{cd}		1,164.9 \pm 34.6 ^c	
HE-HW	1,570.5 \pm 33.8 ^b	1,662.8 \pm 48.3 ^{bc}	375.9 \pm 17.2 ^{bc}	515.8 \pm 43.9 ^d	1,108.7 \pm 65.6 ^{de}	1,174.2 \pm 41.6 ^e
MA-HW	1,579.5 \pm 64.1 ^b	1,652.4 \pm 59.0 ^{bc}	361.1 \pm 120.9 ^{bc}	352.8 \pm 77.0 ^{bc}	1,058.0 \pm 43.2 ^{cd}	998.0 \pm 43.6 ^{bc}
MA-HE-HW	1,772.8 \pm 127.0 ^c	1,534.6 \pm 12.3 ^b	330.3 \pm 41.0 ^{bc}	524.1 \pm 94.2 ^d	1,059.5 \pm 95.2 ^{cd}	998.0 \pm 23.3 ^{bc}
HE-E	1,664.1 \pm 142.9 ^{bc}	ND ³⁾	339.4 \pm 30.8 ^{bc}	ND	1,147.8 \pm 53.8 ^e	ND
MA-E	1,703.2 \pm 137.8 ^{bc}	ND	280.1 \pm 10.4 ^b	ND	954.1 \pm 21.7 ^b	ND
MA-HE-E	1,577.7 \pm 115.4 ^b	981.1 \pm 40.4 ^a	266.4 \pm 3.9 ^b	128.9 \pm 33.5 ^a	937.5 \pm 27.1 ^b	516.0 \pm 23.3 ^a

RAW 264.7 cells (1×10^6 cells/mL) were treated with 100 or 1,000 $\mu\text{g/mL}$ concentrations of solvent extracts from fermented mulberry leaves for 30 min prior to the addition of LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), and the cells were further incubated for 6 hr (TNF- α), 48 hr (IL-1 β) and 24 hr (IL-6), respectively. The pro-inflammatory cytokines in the cultured medium were determined by sandwich ELISA assay.

¹⁾Refer to Table 1, and LPS: only LPS treatment without extract.

²⁾Not detected.

³⁾ND: not determined because of sample cytotoxicity against RAW 264.7 cell (Fig. 1).

Results are expressed as mean \pm SD of quadruplicate samples, and different superscript is significantly different ($p < 0.05$) in each cytokine.

의 생물학적 전환이 유도됨으로써 독성감소와 함께 항염증 활성은 비발효 빵잎보다 증가하고 있음을 나타내었다(Fig. 1과 Table 2). 이러한 결과로부터 노루궁뎅이버섯 균사체-빵잎발효물로부터 분획된 에탄올추출물(MA-HE-E)은 LPS로 자극된 RAW 264.7 매크로파지로부터 염증반응을 매개하는 사이토카인 생성을 효과적으로 억제하는 결과를 나타냄으로써 면역활성과는 달리 항염증 활성은 주로 저분자 성분이 관여하고 있는 것으로 보인다.

결론적으로 solid-state culture를 이용한 노루궁뎅이버섯 균사체의 빵잎발효는 시료대조군인 비발효 빵잎 또는 노루궁뎅이 균사체보다 면역활성 및 항염증활성을 증가시킬 수 있는 중요한 공정으로 확인되었으며, 면역활성은 고분자 물질이 항염증활성은 저분자 성분이 관여하고 있음을 알 수 있었다. 특히, 세포독성 및 항염증 활성을 통하여 고농도에서 비발효 빵잎이 RAW 264.7 cell에 독성을 나타낸 반면, 빵잎발효물의 경우에는 독성이 나타나지 않으면서 항염증 활성이 증가하는 결과로부터 균사체 발효가 빵잎 성분을 생물학적으로 전환시키고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 향후 이러한 소재를 기능성식품에 적용하기 위하여 빵잎 성분이 노루궁뎅이 균사체 발효과정에 의해 생물학적으로 전환되었음을 명백히 밝히기 위한 활성회분의 정제 및 활성성분의 구조적인 동정 등을 연구하고자 한다.

요 약

빵잎(*Morus alba* leaves)의 생리활성을 증강시키기 위하여 solid-state culture 방법을 이용하여 노루궁뎅이버섯 균사체(*Hericium erinaceum*)를 빵잎에 배양하여 조제한 노루궁뎅이버섯 균사체-빵잎발효물(MA-HE)을 열수(MA-HE-

HW)와 에탄올(MA-HE-E)로 추출하였다. MA-HE의 용매 추출물 중 MA-HE-HW는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 시료농도에서 시료대조군인 비발효 빵잎 또는 액체배양으로 얻은 노루궁뎅이 균사체 중군의 열수추출물(MA-HW와 HE-HW)보다 증강된 마이토젠 및 장관면역활성을 나타내었다(각각 saline 대조군의 1.41과 1.52배). 한편, LPS로 자극한 RAW 264.7 murine macrophage에서 염증반응에 중요하게 관여하는 매개인자인 nitric oxide, tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β 및 IL-6의 생성 억제효과를 확인한 결과, MA-HE-E는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 LPS 처리군 및 시료대조군보다 유의적으로 증강된 항염증활성을 나타내었다(LPS 처리군의 45.1, 41.3, 70.2와 55.7% 억제). 또한, RAW 264.7 세포에 대하여 노루궁뎅이버섯 균사체-빵잎발효물의 MA-HE-HW와 MA-HE-E는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서도 독성을 나타내지 않았으나 시료대조군 중 에탄올추출물인 HE-E와 MA-E는 각각 80.1과 30.7%의 세포생존률을 나타내어 독성이 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 solid-state culture를 이용한 노루궁뎅이버섯 균사체의 빵잎발효는 비발효 빵잎보다 면역활성 및 항염증활성을 증가시킬 뿐만 아니라 독성을 감소시키는데 중요하게 작용하고 있어 균사체 발효과정에서 빵잎에 생물학적인 전환과정이 일어나고 있음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청 기업부설연구소 설치지원 사업(협약번호; 00043299)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

문헌

- Lee WC, Kim AJ, Kim SY. 2003. The study on the functional materials and effects of mulberry leaf. *Food Science and Industry* 36: 2-14.
- Chae JY, Lee JY, Hoang IS, Whangbo D, Choi PW, Lee WC, Kim JW, Kim SY, Choi SW, Rhee SJ. 2003. Analysis of functional components of leaves of different mulberry cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 15-21.
- Kim AJ, Lim YH, Kim MW, Kim MH, Woo KJ. 2000. Mineral contents and properties of Pongihp Julpyun preparation by adding mulberry leaves powder. *Korean J Soc Food Sci* 16: 311-315.
- Lee JR, Hah YJ, Lee JW, Song YM, Jin SK, Kim IS, Hah KH, Kwak SJ. 2002. Physico-chemical and sensory properties of emulsified sausages containing mulberry and persimmon leaf powder. *Korean J Food Sci Ani Resour* 22: 330-336.
- Omori M, Yano T, Okamoto J, Tsushida T, Murai T, Higuchi M. 1987. Effect of anaerobically treated tea (Gabaron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 61: 1449-1451.
- Tews JK. 1981. Dietary GABA decreases body weight of genetically obese mice. *Life Sci* 29: 2535-2542.
- Bea MJ, Ye EJ. 2010. Antioxidant activity and *in vitro* for anticancer effects of manufactured fermented mulberry leaf tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 796-804.
- Cho YJ, An BJ. 2008. Anti-inflammatory effect of extracts from *Cheongmoknosang* (*Morus alba* L.) in lipopolysaccharide-stimulated Raw cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 51: 44-48.
- Asano N, Oseki K, Tomioka E, Kizu H, Matsui K. 1994. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr Res* 259: 243-255.
- Kim SY, Lee WC, Kim HB, Kim AJ, Kim SK. 1998. Anti-hyperlipidemic effects of methanol extracts from mulberry leaves in cholesterol induced hyperlipidemia in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1217-1222.
- Ahn CS, Yuh CS, Bang IS. 2009. Physicochemical characteristics of fermented milk containing mulberry leaf extract. *Korean J Food Nutr* 22: 272-278.
- Mizuno T, Wasa T, Ito H, Suzuki C, Ukai N. 1992. Antitumor-active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, an edible and medicinal mushroom called yamabushitake or houtou. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 347-348.
- Yang BK, Park JB, Song CH. 2003. Hypolipidemic effect of an exo-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Hericium erinaceus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1292-1298.
- Kim H, Park CK, Jeong JH, Jeong HS, Lee HY, Yu KW. 2009. Immune stimulation and anti-metastasis of crude polysaccharide from submerged culture of *Hericium erinaceum* in the medium supplemented with Korean ginseng extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1535-1542.
- Kim H, Jeong JH, Hwang JH, Jeong HS, Lee HY, Yu KW. 2010. Enhancement of immunostimulation and anti-metastasis in submerged culture of bearded tooth mushroom (*Hericium erinaceum*) mycelia by addition of ginseng extract. *Food Sci Biotechnol* 19: 1259-1266.
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1996. A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19: 1518-1520.
- Yu KW, Kiyohara H, Matsumoto T, Yang HC, Yamada H. 1998. Intestinal immune system modulating polysaccharides from rhizomes of *Atractylodes lancea* DC. *Planta Med* 64: 714-719.
- Park E, Kum S, Wang C, Park SY, Kim BS, Schuller-Levis G. 2005. Anti-inflammatory activity of herbal medicines: inhibition of nitric oxide production and tumor necrosis factor- α secretion in an activated macrophage-like cell line. *Am J Chin Med* 33: 415-424.
- Mowat AM, Viney JL. 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156: 145-166.
- Trier JS. 1991. Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterol Clin North Am* 20: 531-547.
- Jeoung YJ, Choi SY, An CS, Jeon YH, Park DH, Lim BO. 2009. Comparative effect on anti-inflammatory activity of the *Phellinus linteus* and *Phellinus linteus* grown in germinated brown rice extracts in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 97-101.
- Lowenstein CJ, Snyder SH. 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70: 705-707.
- Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. 1998. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 113: 147-156.
- Ohshima H, Bartsch H. 1994. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 305: 253-264.
- Cho W, Nam JW, Kang HJ, Windono T, Seo EK, Lee KT. 2009. Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF- κ B pathway in LPS-stimulated murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 9: 1049-1057.
- Yun HJ, Hoe SK. 2008. Anti-inflammatory effect of Injinhotang in RAW 264.7 cells. *Kor J Herbol* 23: 169-178.
- Seymour RM, Henderson B. 2001. Pro-inflammatory-anti-inflammatory cytokine dynamics mediated by cytokine-receptor dynamics in monocytes. *Math Appl Med Biol* 18: 159-192.
- Smirnova MG, Kiselev SL, Gnuchev NV, Birchall JP, Pearson JP. 2002. Role of the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α , interleukin-1 beta, interleukin-6 and interleukin-8 in the pathogenesis of the otitis media with effusion. *Eur Cytokine Netw* 13: 161-172.

(2011년 7월 8일 접수; 2011년 8월 2일 채택)