

노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 이화학적 특성 및 항산화성, 항돌연변이성, cytotoxicity 분석

김세령 · 김미라^{1†}

경북대학교 식품영양학과, ¹경북대학교 식품영양학과 · 장수생활과학연구소

Physicochemical Characteristics and Antioxidant activity, Antimutagenicity, and Cytotoxicity of Hot-water Extract of *Hericium erinaceus*

Se Ryung Kim and Meera Kim^{1†}

Dept. of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, South Korea

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University · Center for Beautiful Aging, Daegu 702-701, South Korea

Abstract

The physicochemical characteristics and biological activities, including antioxidant activity, antimutagenicity, and cytotoxicity of hot-water extract of fruiting body of *Hericium erinaceus*, were investigated in this study. Hot-water extract of fruiting body of *Hericium erinaceus* contained carbohydrate (7.86%), protein (10.91%), and β -glucan (3.62%). Water solubility of hot-water extract was 42.58%. Antioxidant activities of the extract were evaluated by ABTS assay and FRAP assay. The IC₅₀ value was 312.21 μ g/mL in ABTS assay. Antimutagenic activity of the extract was evaluated by Ames test. Antimutagenicity of hot-water extract (5 mg/mL) on *Salmonella* Typhimurium TA100 mutagenated by sodium azide (0.15 μ g/mg) was 69.2%. Cytotoxicity of hot-water extract was also evaluated by MTT and SRB assay. The cytotoxicity was highest (83.95%) on Hep3B treated with 2,000 μ g/mL of hot-water extract in SRB assay. Therefore, it is suggested that hot-water extract of fruiting body of *Hericium erinaceus* has high antioxidant activity, antimutagenicity, and cytotoxicity.

Key words : *Hericium erinaceus*, hot-water extract, antioxidant activity, antimutagenicity, cytotoxicity

1. 서론

노루궁뎅이 버섯(*Hericium erinaceus*)은 주로 한국, 일본, 중국 등에 분포되어 있으며 균속군류(*Hymenomycetidae*) 민주름버섯목(*Aphylllophorales*) 노루궁뎅이과(*Hericiaceae*)에 속하는 버섯이다(농촌진흥청 농업과학기술원, 2004). 현재 여러 종류의 버섯들에 대한 생리활성이 보고되고 있는 가운데 노루궁뎅이 버섯에 관한 다양한 연구도 이루어지고 있으나 대부분

의 연구는 버섯의 균사체 및 이를 이용한 추출물을 중심으로 수행되어오고 있다. 그 중, Park SJ 등(2006)에 의하면 국내에서 노루궁뎅이 버섯의 소비형태 중 가장 흔한 방법은 건조품을 구입하여 소비자들이 열수 추출하여 음용하는 형태라고 하였으며, Choi MA 등(2003)은 노루궁뎅이 버섯의 열수 추출물은 다른 유기용매로 추출한 추출물에 비해 전반적으로 생리활성 기능을 가진 성분이 더 많이 들어있는 것으로 보고하였다. 또한 노루궁뎅이 버섯 자실체 추출물이 균사체를 이용한 추출물보다 인간의 자궁암 세포인 HeLa에 대해 더 높은 세포 증식 억제작용을 나타낸다는 보고도 있었다(Lee HI 2004). Lee JS 등(2009)은 이온교환크로마토그래피인 DEAE-cellulose 컬럼을 통한 노루궁뎅이 버섯 정제분획물 중 산분획물인 HEF-AP fraction(β -1,3-branched- β -1,6-glucan으로 구성)이 면역세포인 대식세포의 자극활성을 나타냄을 보고하였고, Keong CY 등(2007)은 노루궁뎅이 버섯 다당체의 정량

[†]Corresponding author : Meera Kim, Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, South Korea.

Tel: +82-53-950-6233

Fax: +82-53-950-6229

E-mail: meerak@knu.ac.kr

및 구조적 특징을 보고하였으며, Kawagishi H 등(1996)은 노루궁뎅이 버섯으로부터 치매 치료제로 이용 가능한 물질인 erinacines E, F, G를 분리하여 구조를 확인하였다. 뿐만 아니라, Mizuno T(1995)는 노루궁뎅이 버섯 methanol 추출물의 ethyl acetate 분획물이 신경생장 인자의 합성을 촉진한다고 보고하였다. 이 밖에도 노루궁뎅이 버섯 추출물은 항돌연변이 활성이 우수하며(Park SH 등 2003) 항암 및 면역 활성 증진에 효과가 있을 뿐만 아니라 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있다고 보고되었다(Kim SP 등 2005, Park SH 등 2001a, Mizuno T 1995, Lee HI 2004, Choi MA 등 2003).

따라서 이러한 선행연구들을 바탕으로 본 연구에서는 가장 일반적으로 소비되는 형태이면서 동시에 높은 생리활성 특성을 나타낼 것으로 사료되는 노루궁뎅이 버섯 자실체를 이용한 열수 추출물의 이화학적 특성 및 항산화성, 항돌연변이성, 암세포 증식억제 활성 등 생리활성을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 추출

실험에 사용한 노루궁뎅이 버섯 자실체의 열수 추출물은 건조된 노루궁뎅이 버섯(강원도 화천산)을 구입하여 100 g을 분쇄기(J World Tech Co., Korea)를 이용하여 30초간 분쇄하여 분말로 만든 다음 10배의 증류수를 가한 뒤 100℃를 유지하면서 3시간 동안 1회 추출하였다. 추출물질은 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였고 상층액만을 모아 동결건조한 뒤 냉동실에 보관하여 사용하였다. 추출수율은 노루궁뎅이 버섯 자실체의 무게에 대한 동결건조 후 무게의 비율(w/w)로 나타내었다.

2. 이화학적 특성 분석

1) 당질 및 단백질 함량 분석

당질함량 분석은 micro phenol-sulfuric acid 법(Masuko T 등 2005)을 이용하였으며 표준물질로는 glucose를 사용하였다. 단백질의 함량은 Bradford MM(1976)법으로 정량하였으며 표준물질로는 bovine serum albumin을 이용하였다.

2) Glucan 함량 분석

(1) Total glucan 함량 측정

Mushroom and yeast beta-glucan kit(Megazyme, Ireland)을 이용하여 glucan 함량을 측정하였다. 즉, 시료 0.1 g에 37% HCl 1.5 mL를 첨가하여 30℃에서 총 45분간 정치시켰다. 여기에 10 mL의 증류수를 가하여 잘 섞어준 뒤 100℃의 끓는 물에서 2시간 동안 반응시키고 실온에서 냉각시켰다. 여기에 2 N KOH 10 mL를 첨가한 후 200 mM sodium acetate

buffer(pH 5.0)를 이용해 총 부피가 100 mL가 되도록 하였다. 원심분리기로 10분간(1,500 rpm) 원심분리한 다음 상층액 0.1 mL에 *exo*-1,3- β -glucanase(20 U/mL)와 β -glucosidase(4 units/mL)가 혼합된 용액 0.1 mL를 가한 뒤 40℃ 항온수조에서 60분 동안 반응시켰다. 여기에 3 mL의 glucose oxidase/peroxidase(GOPOD) 용액을 첨가하여 40℃ 항온수조에서 20분간 더 반응시켰다. Spectrophotometer(Du 800, Beckman coulter, USA)를 이용해 510 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음의 식에 따라 total glucan의 함량을 구하였다.

Total glucan (% w/w)= $\Delta E \times F/W \times 90$

ΔE : reaction absorbance - blank absorbance

$F = \frac{100}{GOPOD \text{ absorbance for } 100\mu\text{g of } D\text{-glucose standard}}$

W= weight of sample analyzed

(2) α -glucan 함량 측정

100 mg의 시료에 2 M KOH 2 mL를 첨가하여 ice water에서 20분간 교반한 다음 8 mL의 1.2 M sodium acetate buffer와 0.2 mL의 amyloglucosidase(1,630 units/mL) 및 invertase(500 units/mL) 혼합 용액을 넣어 40℃ 항온수조에서 30분 동안 반응시켰다. 이후에 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하고 최종 부피가 10.3 mL가 되도록 맞추었다. 상등액 0.1 mL에 GOPOD용액 3 mL를 첨가하고 0.1 mL의 200 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)를 넣은 후 잘 혼합하여 40℃ 항온수조에서 20분간 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하고 blank와 흡광도를 비교하였다.

(3) β -glucan 함량 산출

Total glucan의 함량 %(w/w)에서 측정된 α -glucan의 함량을 감하여 β -glucan의 함량을 산출하였다.

3) 용해도 측정

노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 물에 대한 용해도는 Chang PS와 Cho GB(1997)의 방법에 따라 실시하였다. 먼저 과포화 시료 용액을 0.3 g/5 mL로 제조하여 25℃에서 24시간 동안 교반한 다음 원심분리기를 이용하여 6,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 얻어진 상등액을 2 mL 취하고 여기에 6 mL ethanol을 첨가하였다. 10,000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 침전물을 60℃ 건조기에서 완전히 건조될 때까지 건조한 후 칭량하여 물에 대한 용해도를 계산하였다.

3. 항산화 활성 분석

1) ABTS assay

ABTS radical cation 소거능은 Re R 등(1999)의 방법을 이용하여 실시하였다. 동량의 7 mM의 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-

6-sulphonic acid)diammonium salt와 2.45 mM의 potassium persulfate(K₂S₂O₈)을 혼합하여 암소에서 12~16시간 반응시킨 후 418 nm에서의 흡광도가 0.7~0.8이 되도록 5 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 이용해 희석하여 ABTS radical cation 용액으로 사용하였다. 시료는 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)를 용매로 사용하여 농도별로 준비하였다. 40 µL의 시료용액과 ABTS radical cation 용액 4 mL를 잘 혼합한 후 spectrophotometer를 이용해 413 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical cation의 소거능은 다음의 계산식을 이용하여 산출하였고, 합성 항산화제인 BHA를 기준물질로 사용하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A: 시료 첨가군의 흡광도
B: 시료 무첨가군의 흡광도

2) FRAP assay

시료의 환원력을 확인하기 위한 Ferric reducing antioxidant power(FRAP) assay는 Benzie F와 Strain J(1996)의 방법을 이용하여 실시하였다. 40 mM의 HCl을 이용해 10 mM의 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ)를 용해시킨 것과 20 mM iron(III)chloride(FeCl₃·6H₂O)와 300 mM의 acetate buffer(pH 3.6)를 1:1:10(v/v/v)의 비율로 혼합해 FRAP reagent를 만들었다. 시료 100 µL에 FRAP reagent 3 mL를 첨가한 후 즉시 spectrophotometer를 이용해 593 nm에서 흡광도를 측정하고 37°C에서 4분간 반응시킨 후의 흡광도를 측정하였으며 FeSO₄·7H₂O를 이용해 얻은 standard curve를 이용해 Fe(II) eq. mM로 시료의 환원력을 나타내었다.

4. 항돌연변이 활성 분석

시료의 항돌연변이 활성은 Maron MI와 Ames BN(1983)의 방법에 따라 Ames법으로 측정하였다. 실험에 사용한 균주는 *Salmonella* Typhimurium TA98(KCTC 2053)와 *Salmonella* Typhimurium TA100(KCTC 2054)로 생명자원센터(KCTC, 대전)에서 분양받았으며 실험 전 histidine 요구성 test, rfa 돌연변이 test, uvrB 돌연변이 및 R factor의 유전형질을 확인하였다. 돌연변이원으로는 직접 돌연변이 물질인 sodium azide(1.5 µg/plate)와 4-NQO(0.15 µg/plate)를 사용하였다. 시료는 mutagenicity test를 실시한 결과를 바탕으로 시료 농도를 결정하여 실험에 사용하였으며, 미리 멸균시킨 cap tube에 돌연변이원 50 µL와 시료 50 µL를 넣고 액상 배지에 미리 배양한 균액 100 µL를 첨가한 후 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 500 µL 첨가하고 뚜껑을 잘 닫은 후 37°C 항온수조에서 30분간 pre-incubation 하였다. 0.5 mM histidine/biotin이 함유된 top agar를 2 mL씩 첨가하여 잘 섞어준 다음 minimal glucose agar plate에 도말하고 암실에서 1시간 동안 굳힌 뒤 37°C의 incubator에서 48시간 동안 배양한 후 생성된 colony의 수를 측정하였다. 항돌연변이 활성은 아래의 식에 의해서 억제율

(%)로 나타내었다. 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{M - S_1}{M - S_0}$$

M: 돌연변이원 함유 복귀 돌연변이
S1: 시료 함유 복귀 돌연변이
S0: 자연 복귀 돌연변이

5. 암세포 증식억제 활성 분석

노루궁뎅이 버섯의 암세포 증식 억제 활성 측정을 위해 A549(폐암세포, KCLB10185), AGS(위암세포, KCLB21739), G361(피부암세포, KCLB21424), HeLa(자궁암세포, KCLB10002), Hep3B(간암세포, KCLB88064), MCF7(유방암세포, KCLB30022)를 이용하여 MTT와 SRB 분석을 수행하였다.

1) MTT assay

MTT assay는 Carmichael J 등(1987)의 방법에 따라 실시하였다. 세포는 1×10⁴ cells/mL의 농도로 96 well의 각 well에 180 µL씩 분주하고 37°C의 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 각 well에 20 µL씩의 시료를 첨가하고 다시 같은 조건에서 48시간 동안 배양하였다. 여기에 5 µg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium (MTT)용액을 20 µL씩 첨가하고 같은 조건에서 4시간 동안 배양하여 염색시켰다. 배양액을 제거하고 DMSO와 ethanol을 동량으로 혼합한 용액을 150 µL씩 첨가하여 같은 조건으로 30분간 반응시킨 후 ELISA reader(Tecan, Switzerland)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 무첨가군은 시료 대신 phosphate buffer saline(pH 7.4)을 첨가하였다. 아래의 식을 이용해 암세포의 성장저해 정도를 구하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: 시료 무첨가군의 흡광도
B: 시료 첨가군의 흡광도

2) SRB assay

SRB assay는 Doll R과 Peto R (1981)의 방법을 사용하여 실시하였다. 실험에 사용된 세포주는 MTT assay에 사용된 것과 동일한 암세포주를 사용하였다. 5×10⁴ cells/mL 농도의 cell을 96 well의 각 well에 100 µL씩 분주하고 37°C의 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 세포를 부착시키고 시료를 100 µL씩 첨가하여 동일 조건에서 48시간 동안 더 배양하였다. 배지를 제거한 다음 10% trichloroacetic acid(TCA) 용액을 100 µL 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 TCA를 제거하였다. 멸균된 증류수를 이용해 여러 차례 세척하고 건조한 다음 1% acetic acid에 용해한 0.4% sulfrodamine B를 100 µL씩 첨가하여 30분 동안 cells를 염색시켰다. 염색약을 제거한 다음 1% acetic acid를 이용해 다시 각 well을 세척한 후 건조시켜 10 mM Tris buffer(pH 10.5)를 100 µL씩 첨가하였다.

ELISA reader 내에서 96 well plate를 10초간 shaking한 다음 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 암세포 증식억제 활성은 MTT assay와 동일한 방법으로 계산하여 나타내었다.

6. 통계 분석

실험결과는 PASW statistics 18.0을 이용하여 유의적인 분석하였다. 각 실험군별 평균 간의 차이는 t-test와 one-way ANOVA로 분석하였고 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 시료 추출수율

건조된 노루궁뎅이 버섯 100 g에 대한 열수 추출 시 수용성 물질의 추출수율은 14.03%를 나타내었다(Table 1). Park WR(2008)은 노루궁뎅이 버섯을 70%와 100% ethanol로 추출하였을 때 각각 17.0%, 5.0%의 추출수율을 나타내었고 열수 추출 수율은 19.5%로 나타나 ethanol 추출 시보다 열수 추출 시 수율이 더 높게 나타났다고 하였다. 물과 ethanol 외에도 Jang HY(2005)은 노루궁뎅이 버섯을 80% methanol로 추출하였을 때 36.14%로 높은 추출수율을 나타냈다고 보고하였으나 methanol은 건강에 대한 위해성 때문에 식용추출 용매로 기피되고 있다. 이러한 사실로 미루어 볼 때 노루궁뎅이 버섯의 추출물은 추출용매에 따라 추출수율이 다양하게 나타나 ethanol보다는 물을 이용해 추출하는 것이 더 높은 수율을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

Table 1. Yield and solubility of the hot-water extract of fruiting body of *Hericium erinaceus*

Property	Value
Yield of water soluble extract (% w/w)	14.03 ¹⁾
Water solubility	42.58 ²⁾

¹⁾ Extracted amount per dry *Hericium erinaceus* 100 g

²⁾ Mean of triplicate determinations

2. 이화학적 특성

1) 당질 및 단백질 함량

노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 당질과 단백질 함량을 분석한 결과 Table 2와 같이 나타났다. 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 총 당질 함량은 7.86%, 총 단백질 함량은 10.91%로 나타나 당질보다 단백질 함량이 높은 것으로 나타났다.

Table 2. Carbohydrate, protein, and glucan contents of hot-water extract from fruiting body of *Hericium erinaceus*

Component	Content (%) ¹⁾
Carbohydrate	7.86
Protein	10.91
Total glucan	4.83
α -glucan	1.21
β -glucan	3.62

¹⁾ Means of duplicate determinations

2) Glucan 함량

노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 glucan 함량 측정 시, 소화효소에 의해 분해가 잘 되는 α -glucan과 높은 생리활성 기능을 가지고 있다고 알려진 β -glucan으로 나누어 분석하였다. 그 결과 Table 2와 같이 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 α -glucan과 β -glucan 함량은 각각 1.21%와 3.62%로 나타나 β -glucan의 함량이 더 높은 것으로 나타났다. β -Glucan은 생물체에 있어서 생물학적인 기능을 비롯해 생체 방어계의 자극 작용 등 다양한 역할을 하며 식품 산업에서 중요한 소재로 많은 주목을 받고 있는 물질로(성낙계 등 2005) Hong JH 등(2004)은 버섯의 종류에 따라 β -glucan의 구성 다당류가 다르다고 보고하였으며, Keong CY 등(2007)의 연구에 의하면 노루궁뎅이 버섯 자실체 추출물의 β -glucan은 arabinose, glucose, rhamnose를 함유하는 것으로 보고되었다.

한편, Jung EB 등(2008)은 해송이 버섯 열수 추출물의 β -glucan 함량이 9.32%라고 보고하여 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물보다 더 많은 β -glucan 함량을 나타냈지만 해송이버섯 ethanol 추출물의 β -glucan 함량은 1.43%로 보고되어 β -glucan의 함량은 추출용매에 따라 차이를 나타내었다. Hong JH 등(2004)도 버섯의 열수 추출물 제조 시 압력을 가하는 경우 β -glucan 함량이 달라진다고 보고하여 버섯의 β -glucan 함량은 추출용매 및 추출 조건 등에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다.

3) 용해도

그 동안 버섯류는 항암활성을 가지고 있는 것으로 알려지기에 대한 많은 연구가 수행되었다. 버섯 추출물의 용해도 생리활성에도 영향을 미치는 것으로 알려졌는데 Wasser SP(2002)은 버섯에서 추출한 다당체의 생리활성은 단당류의 구성 및 배치, 물에 대한 용해도, 분자량, 다당체에 결합된 branch의 비율과 형태에 따라 달라질 수 있다고 보고하고 있으며 그 외에도 다당체의 분자량이 클수록, 다당체가 물에 더 잘 녹을수록 더 높은 생리활성을 나타낸다는 사실이 보고되었다(Wasser SP 2002, 성낙계 등 2005, Tao Y 등 2006, Surenjav U 등 2006). 이에 따라 본 연구에서도 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 물에 대한 용해도를 측정하여 Table 1과 같이 42.58%의 용해도를 나타내었다. Jung HY(2009)은

새송이 버섯 추출물에 황산화 유도 시 물에 대한 용해도가 1.5~2.0배 증가하였고 이로 인해 DPPH 라디칼 소거능이 향상되었으며 암세포에 대한 세포독성이 나타났다고 보고하였다.

3. 항산화 활성 분석

1) ABTS assay

노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 ABTS radical 소거능에 대한 결과는 Figure 1과 같다. 노루궁뎅이 열수 추출물의 농도가 증가함에 따라 radical 소거 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 87.86%의 radical 소거능을 나타내었다. 대조군으로 사용된 합성 항산화제인 BHA는 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 46.78%의 radical 소거능을 나타냈고 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도 이상에서는 실험에 사용된 농도의 ABTS radical을 대부분 소거하여 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 ABTS radical 소거능보다 높은 활성을 나타내었다. 그러나 송이버섯 추출물의 ABTS radical 소거능은 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 7.0%로 보고되어(Kim YE 등 2009) 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 ABTS radical 소거 활성이 송이버섯 추출물보다 우수한 것으로 나타났다. 또한 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 IC_{50} 값은 321.21 $\mu\text{g/mL}$ 로서 비교적 저농도의 IC_{50} 값을 나타내었다. 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물은 400 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 50%가 넘는 ABTS radical 소거능을 나타내어 우수한 항산화 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

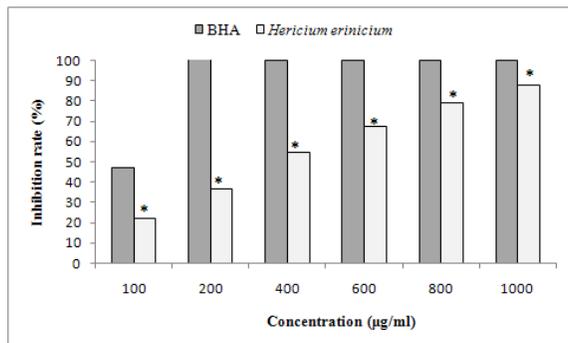


Figure 1. ABTS radical scavenging effects of hot-water extract from fruiting body of *Hericium erinaceus* and BHA.

The marker (*) at each concentration indicates significant difference between the *Hericium erinaceus* extract and BHA by t-test ($p < 0.05$).

2) FRAP assay

노루궁뎅이 열수 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위한 다른 실험방법으로 FRAP assay를 실시하였으며 그 결과는 Table 3과 같다. 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물은 합성 항산화제인 BHA 보다는 유의적으로 낮은 FRAP 값을 나타내었으나, 실험에서 사용된 농도 중 가장 낮은 농도인 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서

0.07 FeSO_4 eq. mM을 나타내었고, 이보다 10배 진한 농도인 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 0.72 FeSO_4 eq. mM을 나타내어 10배 높은 FRAP 값을 나타냄으로써 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 농도와 FRAP 값 사이에 비례적인 양의 상관관계 ($R^2=0.99$)를 나타내었다.

선행연구들에서 송이버섯, 느타리버섯, 상항버섯, 차가버섯, 해송이버섯 등과 같은 다양한 버섯 추출물 및 분획물의 항산화 활성 측정 결과들이 보고되었는데(Kim YE 등 2009, Jung IC 등 1996, Kim JO 등 2008, Lee SO 등 2005, Xu XM 등 2007), 이들은 시료의 추출방법 및 실험방법에 차이가 있어 이들 선행연구와 직접적으로 비교하기는 어려우나 ABTS와 FRAP assay를 통해 노루궁뎅이 버섯의 열수 추출물이 높은 항산화활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 한편, Ryu SR 등 (2009)은 버섯류의 대표적인 항산화 기능물질로 알려진 polyphenol이 고등식물과는 다르게 버섯류에서 생합성이 가능하고 인체에서 직접적으로 활성산소를 소거하는 작용을 하는 ergothioneine(ERG)이 다량 함유되어 있으며, 노루궁뎅이 버섯은 균주에 따라 5.9-7.8 mg/g의 polyphenol과 1.6-3.7 mg/g의 ERG를 함유하고 있다고 보고하여 노루궁뎅이 버섯에 함유된 polyphenol과 ERG가 항산화성에 영향을 주었을 것으로 추측되었다.

Table 3. Ferric ion reducing antioxidant power of hot-water extract from fruiting body of *Hericium erinaceus* and BHA

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	FRAP values (FeSO_4 eq. mM)	
	BHA	Hot-water extract
100	1.20 \pm 0.30 ¹⁾	0.07 \pm 0.01 ²⁾
200	1.67 \pm 0.04	0.15 \pm 0.00*
400	2.33 \pm 0.54	0.28 \pm 0.00*
600	2.64 \pm 0.33	0.41 \pm 0.01*
800	3.28 \pm 0.23	0.57 \pm 0.03*
1,000	3.93 \pm 0.47	0.72 \pm 0.02*

¹⁾ Means \pm SD of triplicate determinations

²⁾ *: The marker in the same row indicates significant difference by t-test ($p < 0.05$).

4. 항돌연변이 활성

시료의 돌연변이 억제능을 확인하기 위한 Ames test를 실시하기 전 시료자체의 돌연변이원성을 확인하기 위해 mutagenicity test를 실시하여 항돌연변이 실험에 사용할 시료의 농도 범위를 결정하였다. *Salmonella* Typhimurium TA98과 *Salmonella* Typhimurium TA100에 대하여 직접돌연변이원인 4-NQO(Table 4)와 sodium azide(Table 5)를 적용했을 때 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 농도에 따른 항돌연변이 활성을 측정하였다. 실험 결과, 4-NQO에 의한 돌연변이 유발 억제능은 *S. Typhimurium* TA98과 *S. Typhimurium* TA100에 대하여 모두 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 농도가 증가함에 따라

Table 4. The antimutagenic activity of hot-water extract from fruiting body of *Hericium erinaceus* mutagenated by 4-NQO at *Salmonella* Typhimurium TA98 and *Salmonella* Typhimurium TA100

	Treatment		TA98		TA100	
	4-NQO (μ g/plate)	Extract (mg/plate)	Revertants /plate	Inhibition rate (%)	Revertants /plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous revertants	0.00	0.0	17 \pm 1.2 ¹⁾		168 \pm 4.6	
Positive control	0.15	0.0	72 \pm 6.5		1,104 \pm 18.9	
Extract treatment	0.15	0.5	58 \pm 3.5	24.0 ^{c2)}	917 \pm 29.8	20.0 ^c
	0.15	1.0	50 \pm 5.2	39.6 ^b	735 \pm 15.1	39.5 ^b
	0.15	5.0	42 \pm 4.0	53.4 ^a	564 \pm 29.0	57.7 ^a

¹⁾ Means \pm SD of triplicate determinations

²⁾ Different superscripts within the same column indicate significant difference among the concentrations at $\alpha=0.05$ level by Duncan's multiple range test.

Table 5. The antimutagenic activity of hot-water extract from fruiting body of *Hericium erinaceus* mutagenated by sodium azide in *Salmonella* Typhimurium TA98 and *Salmonella* Typhimurium TA100

	Treatment		TA98		TA100	
	Sodium azide (μ g/plate)	Extract (mg/plate)	Revertants /plate	Inhibition rate (%)	Revertants /plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous revertants	0.00	0.0	16 \pm 3.2 ¹⁾		160 \pm 8.2	
Positive control	0.15	0.0	191 \pm 6.5		1,376 \pm 16.7	
Extract treatment	0.15	0.5	145 \pm 5.7	26.0 ^{b2)}	1,033 \pm 73.0	28.1 ^c
	0.15	1.0	140 \pm 3.0	29.0 ^b	874 \pm 5.9	41.2 ^b
	0.15	5.0	127 \pm 5.0	36.5 ^a	534 \pm 21.5	69.2 ^a

¹⁾ Means \pm SD of triplicate determinations

²⁾ Different superscripts within the same column indicate significant difference among the concentrations at $\alpha=0.05$ level by Duncan's multiple range test.

유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 한편, sodium azide에 의한 돌연변이 유발 억제능은 *S. Typhimurium* TA100에서는 시료 농도가 증가할수록 증가하였으나 *S. Typhimurium* TA98에 대한 돌연변이 유발 억제능은 0.5와 1.0 mg/plate의 농도에서는 유의차가 나타나지 않았고, 5.0 mg/plate의 농도에서는 돌연변이 유발 억제능이 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물은 5.0 mg/plate의 농도에서 4-NQO가 야기하는 *S. Typhimurium* TA98과 *S. Typhimurium* TA100에 대한 돌연변이를 50% 이상 억제하였고, sodium azide로 인해 *S. Typhimurium* TA100에 야기될 수 있는 돌연변이를 69.2%까지 억제하는 강한 항돌연변이 활성을 나타내었다. Kim HJ 등(1998)은 간접변이원인 benzo(a)pyrene에 노출된 *S. Typhimurium* TA98에 대해서 노루궁뎅이 버섯 에탄올추출물과 열수 추출물을 1.25 μ g/plate 농도로 처리하였을 때 돌연변이 억제능이 각각 2%와 19%로 나타났다고 보고하였다. 또한 Park SH 등(2001b)은 *Salmonella* Typhimurium TA100 균주에 대해 직접 돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine와 간접 돌연변이원인 benzo(a)pyrene으로 돌연변이를 유발하고 노루궁뎅이 버섯 methanol 추출물 및 분획물을 처리하여 항돌연변이 활성을 검증한 결과, 노루궁뎅이 버섯 methanol 추출물 및 분획물들은 직간접 변이원에 대하여 높은 억제효과를 나타냈다고 보고하였다. 따라서 선행연구와 본 연구결과를 통해서 볼 때 용매나 변이원의 종류에 따라 차이는 있으나 노루궁뎅이 버섯 추출물이 항돌연변이 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

5. 암세포 증식 억제 활성

1) MTT assay

노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 인체 암세포주인 폐암세포(A549), 위암세포(AGS), 피부암세포(G361), 자궁암세포(HeLa), 간암세포(Hep3B), 유방암세포(MCF7)를 이용해 MTT assay를 실시한 결과는 Table 6과 같다. 모든 암세포주에 대해 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의

Table 6. Cytotoxicity of hot-water extract from *Hericium erinaceus* on human cancer cell lines by MTT

Cancer cell line	Concentration (μ g/mL)					
	50	100	500	1,000	1,500	2,000
A549	11.12 \pm 7.32 ^{1)C2)ns3)}	14.54 \pm 4.67 ^{BCns}	16.47 \pm 10.96 ^{BCns}	23.65 \pm 2.26 ^{BCns}	25.53 \pm 0.71 ^{Bab}	48.83 \pm 9.26 ^{Aa}
AGS	10.27 \pm 4.37 ^B	14.23 \pm 12.06 ^B	15.56 \pm 2.12 ^{AB}	17.80 \pm 10.00 ^{AB}	21.16 \pm 8.79 ^{ABb}	30.71 \pm 8.21 ^{Ab}
G361	13.47 \pm 10.13 ^C	13.65 \pm 5.06 ^C	22.03 \pm 6.13 ^{BC}	27.90 \pm 4.8 ^{ABC}	33.17 \pm 2.0 ^{ABa}	37.81 \pm 13.51 ^{Aab}
HeLa	12.67 \pm 3.02 ^B	13.87 \pm 8.56 ^B	16.43 \pm 1.83 ^B	17.06 \pm 9.57 ^B	27.72 \pm 1.99 ^{Ab}	32.89 \pm 3.63 ^{Aab}
Hep3B	14.95 \pm 9.98 ^C	17.24 \pm 7.46 ^{BC}	20.41 \pm 5.47 ^{BC}	26.67 \pm 7.60 ^{BC}	33.06 \pm 8.20 ^{ABa}	45.31 \pm 11.02 ^{Aab}
MCF7	19.13 \pm 4.22 ^B	20.68 \pm 2.70 ^B	20.93 \pm 9.17 ^B	24.77 \pm 3.83 ^{AB}	25.46 \pm 4.44 ^{ABab}	32.13 \pm 1.44 ^{Aab}

¹⁾ Means \pm SD of triplicate determinations

²⁾ Different superscripts (capital letters) within the same row indicate significant difference among the concentrations at $\alpha=0.05$ level by Duncan's multiple range test.

³⁾ Different superscripts (small letters) within the same column indicate significant difference among the samples at $\alpha=0.05$ level by Duncan's multiple range test (ns=non significantly different).

농도가 증가함에 따라 암세포 증식 억제 효과가 증가하는 경향을 보였다. 세포주간에는 2,000 µg/mL의 농도에서 A549에 대한 세포 증식 억제 효과가 48.83%로 가장 높았고 시료의 저농도 처리군에서는 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 세포주에 따른 세포독성이 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 고농도의 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물 처리군에서는 유의적인 차이를 나타내었고 2,000 µg/mL의 농도에서는 폐암 세포인 A549에 대한 48.83%의 생육억제능을 나타내어 가장 높은 생육 억제 활성을 나타내었다.

2) SRB assay

SRB assay로 암세포 증식 억제 효과를 측정된 결과는 Table 7과 같다. 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물은 실험에 사용된 암세포주들 중 A549와 G361을 제외한 다른 암세포주에 대해 시료의 농도가 증가함에 따라 암세포 증식 억제율이 증가하는 경향을 보였다. Park JM 등(2004)의 연구에서도 표고 버섯 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 세포 증식 억제율이 높아졌는데 이는 세포의 apoptotic cell이 증가됨으로써 종양세포의 성장이 억제되기 때문이라고 하였다.

SRB assay에서 Hep3B에 대한 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 세포 증식 억제율은 50 µg/mL에서 2,000 µg/mL에 이르기까지 다른 암세포주보다 높은 암세포 증식 억제 활성을 나타내었으며, 2,000 µg/mL의 농도에서는 83.95%의 높은 세포 증식 억제율을 나타내어 6 종류의 암세포 중 가장 높은 암세포 증식 억제 활성을 나타내었다. 이는 앞의 MTT assay에서 Hep3B에 대한 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 세포 증식 억제율이 높게 나타난 결과와 일치하였다. SRB assay에서 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물은 AGS와 HeLa에 대해서도 50%에 가까운 높은 암세포 증식 억제능을 나타내었다. 한편 A549에 대한 세포 증식 억제율은 SRB assay에서는 낮았으나 MTT assay에서는 높게 나와 assay에 따른 차이를 나타내었는데, 이는 두 분석법의 방법과 사용된 시약에 따른 각 암세포주의 감수성 차이에 기인한 것으로 보이며, MTT와 SRB assay를 통

해 측정된 노루궁뎅이 버섯 열수추출물이 항암세포에 나타난 세포독성이 암세포에만 기질 특이적으로 나타나는 반응인지에 대한 *in vivo*적 연구를 통해 노루궁뎅이 버섯 열수추출물의 암세포에 대한 작용 기작에 관한 후속연구가 필요한 것으로 보인다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 노루궁뎅이 버섯이 일반적으로 가장 많이 섭취되는 형태인 열수 추출물의 물리화화학적 특성 및 생리활성을 분석하였다. 그 결과, 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물에는 당질과 단백질 및 β-glucan이 각각 7.86%, 10.91%, 3.62% 함유된 것으로 나타났으며, 물에 대한 용해도는 42.58%로 나타났다. 또한, 열수 추출물을 이용한 항산화활성 분석 결과 시료의 농도가 증가할수록 항산화 활성이 증가하였고, ABTS assay결과 IC₅₀값이 312.21 µg/mL로 나타나 노루궁뎅이 열수 추출물의 높은 radical 소거능을 확인하였으며, 항돌연변이능 측정에서는 sodium azide로 유발된 *Salmonella* Typhimurium TA 100의 돌연변이 억제능이 69.2%로 높게 나타났다. MTT와 SRB assay를 통한 6 종류의 인체 암세포에 대한 세포독성 측정 결과 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물의 암세포 증식 억제 활성을 통한 암세포에 대한 세포독성을 확인할 수 있었으며, 그 중 SRB assay에서 Hep3B세포에 대해 열수 추출물이 2,000 µg/mL 농도에서 83.95%의 높은 암세포 증식 억제 활성을 나타내었다. 본 연구에서 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물은 높은 항산화 활성과 항돌연변이 및 암세포 증식 억제 활성을 통한 세포독성을 나타내어 향후 다양한 목적의 건강기능성 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 7. Cytotoxicity of hot-water extract from *Hericium erinaceus* on human cancer cell lines by SRB

Cancer cell line	Concentration (µg/mL)					
	50	100	500	1,000	1,500	2,000
A549	1,96±9.79 ^{1)NS2)c3)}	3,40±16.48 ^c	8,39±13.42 ^c	11,33±11.26 ^c	13,04±10.47 ^d	18,41±9.62 ^c
AGS	25,71±4.99 ^{Db}	28,65±4.06 ^{Db}	38,06±6.19 ^{Cb}	48,76±4.63 ^{Bb}	52,75±0.33 ^{ABb}	59,52±5.04 ^{Ab}
G361	9,29±12.70 ^{NSc}	10,26±10.42 ^{bc}	10,75±12.85 ^c	10,80±12.00 ^c	14,45±2.22 ^{cd}	27,05±4.20 ^c
HeLa	12,29±9.18 ^{Bbc}	19,11±13.11 ^{Bbc}	17,72±12.12 ^{Bc}	23,20±11.24 ^{Bc}	33,32±8.78 ^{ABc}	47,98±10.25 ^{Ab}
Hep3B	59,84±1.76 ^{Ca}	61,26±3.67 ^{Ca}	60,57±1.29 ^{Ca}	68,41±1.81 ^{Ba}	70,23±1.38 ^{Ba}	83,95±2.27 ^A
MCF7	2,78±8.31 ^{Bc}	3,55±11.52 ^{Bc}	5,04±10.56 ^{ABc}	10,67±9.97 ^{ABc}	16,52±11.77 ^{ABd}	25,08±12.41 ^{Ac}

¹⁾ Means ± SD of triplicate determinations

²⁾ Different superscripts (capital letters) within the same row indicate significant difference among the concentrations at α=0,05 level by Duncan's multiple range test (NS=non significantly different).

³⁾ Different superscripts (small letters) within the same column indicate significant difference among the samples at α=0,05 level by Duncan's multiple range test.

V. 감사의 글

이 논문은 2012학년도 경북대학교 학술연구비에 의하여 연구되었음

참고문헌

- 농촌진흥청 농업과학기술원. 2004. 한국의 버섯-식용버섯과 독버섯. 동방미디어. 서울. pp 264-265
- 성낙계, 성낙주, 정영철. 2005. 암을 이기는 신비의 상황버섯 다당체. 북랜드. 서울. pp 170-187
- Benzie F, Strain J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *J Anal Bio Chem* 239(1):70-76
- Bradford MM. 1976. A rapid, sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biol Chem* 72:248-254
- Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Can Res* 47:936-942
- Chang PS, Cho GB. 1997. Oxidation of primary alcohol groups of polysaccharides with 2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidine oxammonium ion. *Korean J Food Sci Technol* 29(3):446-451
- Choi MA, Park NY, Woo SM, Jeong YJ, Shin SR. 2003. Characteristics of *Hericium erinaceus* and its extracts. *Korean J Food Preserv* 10(4):560-564
- Doll R, Peto R. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Cancer Inst* 66(6):1191-1308.
- Hong JH, Youn KS, Choi YH. 2004. Characteristics of crude protein-bound polysaccharide from *Agaricus blazei* Murill by extraction and precipitation conditions and its antitumor effect. *Korean J Food Sci Technol* 36(4):586-593
- Jang HY. 2005. Antioxidative activities and chemopreventive effects of *Hericium erinaceus* extracts. MA thesis. Keimyung University of Korea. p 16
- Jung EB, Jo JH, Cho SM. 2008. Nutritional component and anticancer properties of various extracts from haesongi mushroom (*Hypsizigus marmoreus*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37(11):1395-1400
- Jung HY. 2009. Physicochemical properties and biological activities of polysaccharide from *Pleurotus eryngii* and its derivatives. MA Thesis. Hanyang University
- Jung IC, Park S, Park KS, Ha HC, Kim SH, Kwon YI, Lee JS. 1996. antioxidative effect of fruit body and mycelial extracts of *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Food Sci Technol* 28(3):464-469
- Kawagishi H, Shimada A, Hosokawa S, Mori H, Sakamoto H, Ishiguro, Sakemi S, Bordner J, Kojima N, Furukawa S. 1996. Erinacines E, F and G stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett* 37:7399-7402
- Keong CY, Rashid BAA, Ing YS, Ismail Z. 2007. Quantification and identification of polysaccharide contents in *Hericium erinaceus*. *Nutr Food Sci* 37(4):260-271
- Kim HJ, Lee BH, Lee KD, Lee KR. 1998. Screening for antimutagenic effects of the wild mushrooms in Korea. *Korean J Food Sci Technol* 30(3):688-692
- Kim JO, Jung MJ, Choi HJ, Lee JT, Lim AK, Hong JH, Kim DI. 2008. Antioxidative and biological activity of hot water and ethanol extracts from *Phellinus linteus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37(6):684-690
- Kim SP, Choi YH, Kang MY, Nam SH. 2005. Effects of the extracts by extraction procedures from *Hericium erinaceus* on activation of macrophase. *J Korean Agr Chem Soc* 48(3):285-291
- Kim YE, Yang JW, Lee CH, Kwon EK. 2009. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Thricholoma matsutake* sing (Pine mushroom). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38(5):555-560
- Lee HI. 2004. (The) study on the immune modulatory activity of *Hericium-erinaceum* water extract. MA Thesis. Konkuk University of Korea. pp 8-21
- Lee JS, Cho JY, Hong EK. 2009. Study on macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharides from the liquid culture broth of *Hericium erinaceus*. *Carbohydr Polym* 78:162-168
- Lee SO, Kim MJ, Kim DG, Choi HJ. 2005. Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34(2):139-147
- Maron MI, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113:173-215.
- Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura SI, Lee YC. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem* 339:69-72
- Mizuno T. 1995. Bioactive substances in Yamabushitage, the *Hericium erinaceum* fungus, and its medicinal utilization. *Food*

- Rev Int 11(1):173-178
- Park JM, Lee SH, Kim JO, Park HJ, Park JB, Sin JI. 2004. In vitro and in vivo effects of extracts of *Lentinus edodes* on tumor growth in a human papillomavirus 16 oncogenes-transformed animal tumor model-apoptosis-mediated tumor cell growth inhibition. Korean J Food Sci Technol 36(1):141-146
- Park SH, Chang JS, Lee KR. 2003. Effect of *Hericium erinaceus* extract on cancer cell growth and expression of cell cycle associated proteins. J Korean Soc Food Sci Nutr 32(6):931-936
- Park SH, Kim JY, Chang JS, Oh EJ, Kim OM, Bae JT, Kim HJ, Hae DJ, Lee KR. 2001a. Protective effect of *Hericium erinaceus* extracts on hepatic injury induced by benzo(α)pyrene in mice. J Korean Soc Food Sci Nutr 30(5):928-932
- Park SH, Kim OM, Lee KR. 2001b. Antimutagenic and quinone reductase inducing activities of *Hericium erinaceus* extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 30(6):1287-1292
- Park SJ, Hong JH, Youn KS, Choi YH. 2006. Form manufacturing and quality characteristics using extracts from *Hericium erinaceus*. Korean J Food preservation 13(5):569-573
- Park WR. 2008. Studies on the antioxidant activity and preparation of the fermented *Artemisia iwayomogi* with functional mushroom. MA Thesis. Chungju National University of Korea, pp 31-33
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-evans C. 1999. antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26(9):1231-1237
- Ryu SR, Lee WY, Ka KH. 2009. Comparative study on the wawdust cultivation and the antioxidants of *Hericium* spp. Korean J Mycology 37(1):80-85
- Surenjav U, Zhang L, Xu X, Zhang X Zeng F. 2006. Effect of molecular structure on antitumor activities of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans from different *Lentinus edodes*. Carbohydr Polym 63(1):97-104
- Tao Y, Zhang L, Cheung C.K. 2006. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. Carbohydr Res 341:2261-2269
- Wasser SP. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol. 60(3): 258-274
- Xu XM, Jun JY, Jeong IH. 2007. A study on the antioxidant activity of hae-songi mushroom (*Hypsizigus marmoreus*) hot water extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 36(11):1351-1357