

노루궁뎅이버섯 균사체로 발효한 민들레잎 추출물의 항염증 활성

김연숙¹ · 정미연^{2,3} · 유범석³ · 박표잠¹ · 정재현³

¹건국대학교 생명공학과

²(주)참선진녹즙

³한국교통대학교 식품공학과

Anti-Inflammatory Activities of Extracts from Fermented *Taraxacum platycarpum* D. Leaves Using *Hericium erinaceum* Mycelia

Yon-Suk Kim¹, Mi-Yeun Jung^{2,3}, Beom-Seok Ryu³, Pyo-Jam Park¹, and Jae-Hyun Jeong³

¹Department of Biotechnology, Konkuk University

²Chamsunjin Greenjuice Co., Ltd.

³Department of Food Science and Technology, Korea National University of Transportation

ABSTRACT This study investigated the fermentation effect of *Taraxacum platycarpum* Dahlst. leaf extracts using *Hericium erinaceum* mycelia to test antioxidant and anti-inflammatory activities *in vitro*. The antioxidant activities of fermented or non-fermented extracts of *T. platycarpum* leaves were determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power, and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity. The leaf extract of *T. platycarpum* showed higher antioxidant activity than extract of fermented leaves. However, ethanolic extract of fermented *T. platycarpum* leaves decreased levels of nitric oxide production and pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. Moreover, fermented leaf extract suppressed protein expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 cell culture. Therefore, the enhanced anti-inflammatory activity of ethanolic extracts of fermented *T. platycarpum* leaves might be attributed to the molecular conversion of leaf ingredients during fermentation and the active ingredients might have specific affinity with ethanol during extraction.

Key words: antioxidant activity, anti-inflammatory effect, *Taraxacum platycarpum* D., *Hericium erinaceum* mycelia

서론

민들레는 국화과(Compositae)의 쌍자엽성 다년생 초본류로서 일반명은 dandelion, 학명은 *Taraxacum platycarpum*, 한방에서는 포공영(蒲公英), 포공초(浦公草), 지정(地丁), 금잠초(金簪草)로 불린다. 이러한 민들레는 우리나라에서 쉽게 구할 수 있는 야생화로 구황식물이자 약용식물로 이용되었으며, 이른 봄부터 늦가을까지 우리나라 전역에 걸쳐 널리 분포하고 전 세계에 약 2,000여 종이 존재하는 것으로 알려져 있는데 우리나라에 분포하는 대표적인 식용 가능한 민들레는 2종의 귀화종을 포함하여 민들레(*Taraxacum platycarpum*), 좀민들레(*Taraxacum hallaisanense*), 산민들레(*Taraxacum ohwianum*), 흰민들레(*Taraxacum coreanum*), 서양 민들레(*Taraxacum officinale*), 털민들

레(*Taraxacum mongolicum*) 등 6종이 전국적으로 자생하고 있다(1,2). 민들레는 예로부터 나물이나 국 등 식용으로 이용되었으며, 서양에서는 천연 허브로서 차나 캡슐 형태로 섭취하였고, 뿌리는 로스팅 과정을 통해 커피 대용으로 소비되기도 하였다(3). 민들레는 담낭과 류머티스, 이뇨작용에 효과가 있는 약용식물로 오랫동안 이용되어 왔다(4,5). 또한 민들레 추출물을 쥐에 투여한 결과 염분 배출 효과가 높아 다른 약용식물에 비해 이뇨작용이 뛰어난 것으로 알려져 있다(6). 한방에서는 강장, 해열, 건위, 거담, 해독제 등으로 사용되었고(7), 최근에는 항산화 효과(8-11), 항염증 효과(12), 각질세포 보호 효과(10), 간세포 보호 효과(13) 등의 다양한 기능성에 관한 연구가 보고되고 있으며, 미국에서는 GRAS등급(14)으로 인정받아 안전성에 문제가 없는 것으로 알려져 있다. 이처럼 민들레에 관한 연구는 민들레의 꽃이나 잎, 줄기를 이용한 여러 가지 생리활성에 관한 연구가 대부분이며, 민들레의 잎을 균사체로 발효한 연구는 전무한 실정이다.

민들레잎의 발효에 사용한 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*)은 담자균류 민주름버섯목(Aphyllophorales),

턱수염버섯과(Hydnaeae), 산호침버섯속(*Hericium*)으로 분류되는 버섯으로 식용버섯으로 이용되어 왔다(15). 이전 연구는 담자균류의 균사체를 곡류 및 약용식물에 배양하여 다양한 기능성 소재에 관한 연구가 주를 이루고 있으며, Ha 등(16)과 Park 등(17)은 수삼을 이용한 여러 가지 균사체 배양물의 면역 활성에, Jang 등(18), Shin 등(19)과 Choi 등(20)은 인진쑈에 배양한 노루궁뎅이버섯 균사체의 숙취와 면역, 알코올성 지방간 등에 효과가 있다고 보고한 바 있다. 따라서 본 연구는 노루궁뎅이버섯 균사체를 이용하여 발효한 민들레잎과 발효하지 않은 민들레잎을 물과 에탄올로 추출하여 항산화 활성 및 항염증 활성을 측정하여 발효 및 추출용매에 따른 활성을 비교하고자 하였으며, 이를 통하여 발효 민들레잎을 항산화 및 항염증 소재로서 활용을 위한 기초자료로 사용하고자 하였다.

재료 및 방법

민들레잎의 발효 및 추출

본 연구에 사용한 민들레는 2014년 5월에 경북 청송군에서 재배한 민들레잎을 열풍건조 한 후 입자크기가 1~3 mm가 되도록 분쇄하여 사용하였다. 노루궁뎅이버섯(*H. erinaceum*) 균사체는 경기도 농업기술원(Hwaseong, Korea)에서 분양받아 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco, Sparks, MD, USA) 배지에서 5주 간격으로 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 분쇄된 민들레의 잎에 2배의 증류수를 첨가하여 12시간 동안 침지한 후 500 mL 버섯 배양병에 150 g씩 넣고 121.1°C에서 60분간 멸균하였다. 멸균한 민들레잎에 노루궁뎅이버섯 균사체 3차 배양액을 10%(v/w) 접종한 후 온도 25°C, 습도 60%에서 40일간 배양하였다. 배양이 완료된 후 동결건조 하여 추출시료로 사용하였다. 물 추출물의 제조는 시료 50 g에 증류수 1,000 mL를 첨가한 후 80°C에서 120분간 추출하였으며, 에탄올 추출물은 시료 50 g에 70% 에탄올 1,000 mL를 첨가한 후 70°C에서 120분간 추출하였고 물 추출물과 에탄올 추출물 모두 동일한 방법으로 여과지(No.2, Advantec, Tokyo, Japan)로 감압여과 하여 Rotary Evaporator(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축한 후 동결건조 하여 분석용 시료로 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(21)을 약간 변형하여 추출물 1.0 mL에 1.0 N Folin-Ciocalteu 시약 및 20% Na₂CO₃ 용액을 각 1.0 mL씩 차례로 가한 다음 실온에서 30분 정치한 후 분광광도계(Secomam, Ales, France)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 0~200 µg/mL의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석한 표준 검량선으로부터 추출물의 총 페놀 함량을 산출하였고 gallic acid equivalents(mg GAE/g extract)로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(22)의 방법에 따라 추출물 0.25 mL에 증류수 1.25 mL를 혼합하고 5% sodium nitrite 75 µL 추가한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 10% aluminum chloride 0.15 mL를 추가한 후 실온에서 6분간 반응시킨 다음 1.0 M sodium hydroxide 0.5 mL와 증류수 275 µL를 차례로 가하여 혼합한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin(Sigma-Aldrich Co.)을 표준물질로 하여 0~1 mg/mL 농도 범위의 표준 검량선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였고 catechin equivalents(mg CE/g extract)로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거 활성 실험은 Blois(23)의 방법을 응용하여 다음과 같이 실행하였다. Blank는 에탄올 100 µL, control은 에탄올 50 µL와 DPPH 용액 50 µL, DPPH와 시료 반응군은 에탄올 40 µL, DPPH 용액 50 µL와 시료 10 µL를 추가하였고, 시료 자체의 흡광도군은 에탄올 90 µL와 시료 10 µL를 추가한 후 상온에서 30분간 반응시킨 다음 515 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거 활성(%)을 측정하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{C-D}{B-A}\right) \times 100$$

A: Blank 흡광도

B: Control 흡광도

C: DPPH와 시료 반응액의 흡광도

D: 시료 자체의 흡광도

ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력 측정

ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 라디칼을 이용한 총 항산화력의 측정에는 Park과 Kim(24)의 방법에 따라 7.4 mM ABTS 용액과 2.4 mM potassium persulfate를 섞은 후 암실에서 12~16시간 동안 반응시켰다. 이를 734 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정된 후 1.0 mL를 취하고 추출물 50 µL를 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 동량의 Trolox를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 시료의 항산화력을 Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC)로 표시하였다.

FRAP를 이용한 총 항산화력 측정

FRAP(ferric reducing antioxidant power) 측정은 Benzie와 Strain(25)의 방법을 사용하였다. 즉 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ 및 20 mM FeCl₃·6H₂O를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP 시약을 제조하였다. 이어서 시료 0.15 mL와 3.0 mL의 FRAP 시약을 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 FeSO₄·7H₂O를

표준물질로 하여 mM FeSO₄ eq./mg extract로 표시하였다.

세포 배양

실험에 사용한 대식세포주인 RAW264.7(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)은 불활성화한 10% fetal bovine serum(FBS)과 1.0% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM) 배지에서 37°C 및 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다.

Nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO 생성량을 측정하는 nitrite assay는 Titheradge(26)의 방법에 의해 다음과 같이 측정하였다. 배양된 세포를 2×10⁴ cells/well 농도로 96 well plate에 분주한 후 20시간 동안 배양한 다음 각 농도별 시료를 한 시간 전처리하고 lipopolysaccharide(LPS, 100 ng/mL)를 처리한 다음 20시간 후 세포에서 medium으로 분비된 NO의 양을 Griess 시약 [0.1%(w/v) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1%(w/v) sulfanilamide in 5%(v/v) phosphoric acid]을 사용하여 반응시켰다. 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였고 sodium nitrite로 표준곡선을 작성하여 NO의 함량을 산출하였다.

세포독성 측정

세포독성 측정은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich Co.] 환원 방법을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다(27). RAW264.7 세포를 96 well plates에 2×10⁴ cells/well 농도로 분주한 뒤 24시간 배양한 후, 각 시료를 최종 농도 0, 62.5, 125, 250, 500 µg/mL가 되도록 세포에 처리하여 20시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액(0.2 mg/mL)을 가하고 37°C에서 2시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에 떨어져 나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. DMSO를 150 µL 분주하여 10분 동안 혼합한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot을 이용한 단백질 발현 분석

배양이 끝난 세포들을 모은 다음 적당량의 lysis buffer(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 첨가하여 4°C에서 15분 동안 lysis 시킨 후, 13,000 rpm으로 15분간 원심분리 하여 상층액을 모았다. 단백질을 정량하여 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate(SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 다음 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 전이가 끝난 멤브레인은 5% non-fat dry milk로 블로킹한 후, 1차 항체를 처리하여 4°C에서 over night 시킨 다음 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBS-T(0.1% Tween in PBS)로 충분히 세척하고 Enhanced Chemiluminescence

(ECL) 용액을 넣은 후 Luminescent Image Analyzer(LAS-3000, Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 특정단백질의 양을 분석하였다.

통계분석

실험은 3회 이상 반복하였고 실험 결과는 각 항목에 따라 평균치±표준편차(SD)를 구하였으며, 각 군 간의 유의성의 검증은 GraphPad Prism 5.0 version(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 one-way ANOVA 중 Tukey's test로 검증하여 P 값이 0.05 미만을 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

수율, 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량

노루궁뎅이버섯 균사체로 발효한 민들레잎의 물 추출물과 에탄올 추출물을 발효하지 않은 민들레잎의 추출물과 수율, 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 비교한 결과를 Table 1에 나타내었다. 발효하지 않은 민들레잎의 물 추출물과 에탄올 추출물의 수율은 각각 29.35%, 22.85%를 나타내었으며, 노루궁뎅이버섯 균사체로 발효한 민들레잎의 물 추출물과 에탄올 추출물의 수율은 각각 29.24%, 19.25%로 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 발효하지 않은 민들레잎 물 추출물과 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과 56.18±1.01 mg GAE/g extract, 59.88±0.89 mg GAE/g extract를 나타내었고, 노루궁뎅이버섯 균사체로 발효한 민들레잎의 물 추출물과 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 22.35±0.23 mg GAE/g extract, 14.60±0.19 mg GAE/g extract로 균사체 발효 후 물 추출물과 에탄올 추출물 모두 총 폴리페놀 함량이 약 60%, 약 75% 가량 감소하는 것을 확인하였다. 또한 발효 후 민들레잎의 물 추출물과 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량도 약 80%, 약 90% 가량 감소하였다. Kim 등(28)은 표고버섯의 균사체를 gallic acid 및 methyl gallate를 첨가한 액체배지에서

Table 1. Extraction yields, total polyphenols, and total flavonoids contents of *Taraxacum platycarpum* leaves extract and fermented *T. platycarpum* leaves using *Hericium erinaceum* mycelia

Sample	Extraction yields (% w/w)	Total polyphenol (mg GAE/g extract)	Total flavonoid (mg CE/g extract)
TLW	29.35	56.18±1.01 ¹⁾	36.30±0.76 ¹⁾
TLE	22.85	59.88±0.89	40.41±1.17
FTLW	29.24	22.35±0.23	7.07±1.33
FTLE	19.25	14.60±0.19	3.74±1.17

TLW: *T. platycarpum* leaves water extract, TLE: *T. platycarpum* leaves ethanol extract, FTLW: fermented *T. platycarpum* leaves water extract, FTLE: fermented *T. platycarpum* leaves ethanol extract.

GAE: gallic acid equivalents, CE: catechin equivalents.

¹⁾Values represent means±SD (n=4).

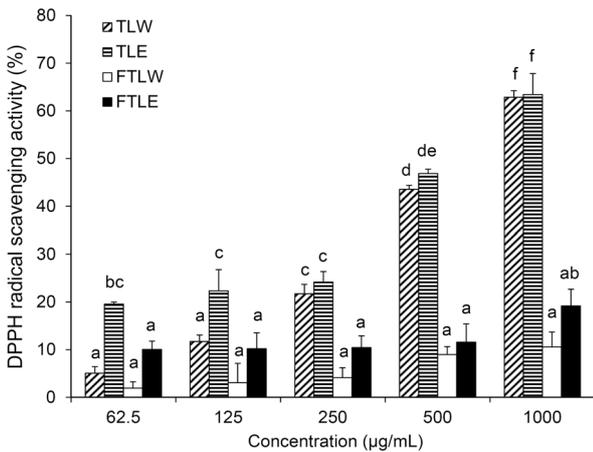


Fig. 1. Effect of fermentation on the leaves extracts of *T. platycarpum* on DPPH radical scavenging activity. Different letters (a-f) represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

배양시켜 표고균사의 생장과정 중의 폴리페놀의 함량 변화를 측정한 결과 최초로 첨가된 폴리페놀 함량보다 낮아진 것을 확인하였으며, 이것은 표고균사가 생장하면서 폴리페놀을 흡수, 분해하였거나 새로운 화합물을 생산하였을 가능성이 있다고 보고하였다. 민들레잎의 발효 후 폴리페놀 함량이 감소한 것과 일치한 경향을 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성

DPPH 라디칼은 보라색의 비교적 안정한 프리 라디칼로 이를 이용한 DPPH 라디칼 소거 활성 방법은 다양한 천연물로부터 항산화 물질을 검색하는 데 많이 사용되고 있다. 발효하지 않은 민들레잎의 물 추출물과 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 1.0 mg/mL 농도에서 각각 62.8%, 63.4%를 나타내었고, 노루궁뎅이버섯 균사체 발효한 발효 민들레잎의 물 추출물과 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 같은 농도에서 10.5%, 19.1%를 나타내었다(Fig. 1). 발효하지 않은 민들레잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 발효한 민들레잎 추출물보다 높았으며, 물 추출물보다는 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 높게 나타났다. 앞선 여러 연구에서 폴리페놀이나 플라보노이드의 함량과 라디칼 소거 활성이 상관성이 있음을 보고하였는데(29,30), 이는 발효 후 민들레 추출물의 폴리페놀 함량이 감소하면서 DPPH 라디칼 소거 활성이 낮아진 것과 유사한 경향을 나타내는 것으로 판단된다.

ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력

노루궁뎅이버섯 균사체로 발효시킨 민들레잎 추출물과 발효시키지 않은 민들레잎 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성은 Table 2에 나타내었다. 발효하지 않은 민들레잎의 물 추출물과 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성은 각각 0.359±0.006, 0.294±0.004 mM Trolox eq./mg extract를 나타내었고, 노루궁뎅이버섯 균사체로 발효한 민들레잎

Table 2. ABTS radical scavenging and FRAP activity of *T. platycarpum* leaves extract and fermented *T. platycarpum* leaves using *H. erinaceum* mycelia

Sample	TEAC (mM Trolox eq./mg extract)	FRAP (mM FeSO ₄ eq./mg extract)
TLW	0.359±0.006 ¹⁾	0.47±0.02
TLE	0.294±0.004	0.58±0.02
FTLW	0.194±0.007	0.14±0.01
FTLE	0.117±0.004	0.10±0.00

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity, FRAP: ferric reducing antioxidant power.

¹⁾Values represent means±SD (n=4).

의 물 추출물과 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성은 각각 0.194±0.007, 0.117±0.004 mM Trolox eq./mg extract를 나타내었다. Shon(31)은 버섯균사체로 발효시킨 복령과 후박의 항산화 평가에서 발효 후 ABTS 라디칼 소거 활성이 감소되고 이는 발효과정 중에 각종 항산화성 물질이 일부 누출되거나 살균공정을 통해 파괴나 산화되어서라고 판단하였다. 민들레잎을 노루궁뎅이버섯 균사체로 발효한 발효 추출물이 발효하지 않은 민들레잎의 추출물에 비해 ABTS 라디칼 소거 활성이 감소되는 결과와 비슷한 경향을 나타내었으며, 이는 발효 공정의 영향뿐만 아니라 이에 따른 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과도 관련이 있는 것으로 판단된다.

FRAP를 이용한 총 항산화력

FRAP법은 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine(Fe³⁺-TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe²⁺-TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용하여 시료 내의 총 항산화력을 측정하는 방법으로 흡광도가 증가할수록 항산화 활성이 높음을 의미한다. 노루궁뎅이버섯 균사체로 발효시킨 민들레잎의 물 추출물 및 에탄올 추출물과 발효시키지 않은 민들레잎의 물 추출물과 에탄올 추출물의 항산화 활성 비교를 위해 FeSO₄ 검량선에 대입하여 FRAP value를 측정된 결과를 Table 2에 나타내었다. 1.0 mg/mL의 농도에서 발효시키지 않은 민들레잎의 에탄올 추출물의 FRAP value는 0.58±0.02 mM FeSO₄ eq./mg extract로 가장 높게 나타났고, 발효한 민들레잎의 에탄올 추출물의 FRAP value는 0.10±0.00 mM FeSO₄ eq./mg extract로 가장 낮았다. 따라서 노루궁뎅이버섯 균사체로 발효한 민들레잎의 발효 추출물은 발효 후 오히려 항산화 활성이 낮아지는 것을 확인하였다.

NO 생성량 측정

NO는 LPS, interleukin-1β(IL-1β), tumor necrosis factor-α(TNF-α) 등과 같은 염증유발인자에 의해 발현되는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 과량 발현되며(32), NO의 지속적인 과발현은 조직의 손상 등 염증 반응을 촉진한다(33). 따라서 추출물이 LPS로 유도하여 과

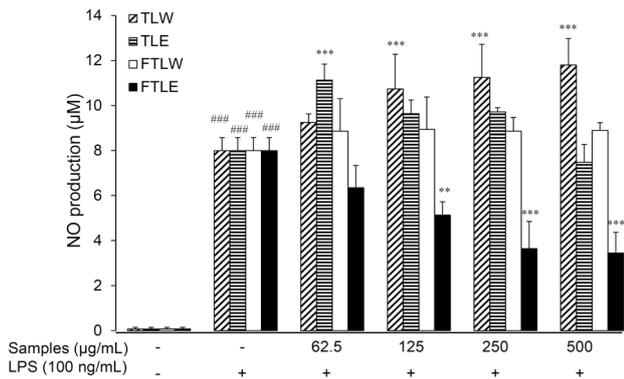


Fig. 2. Effect of fermentation on the leaves extracts of *T. platycarpum* on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with samples at various concentrations (62.5, 125, 250, and 500 µg/mL) with or without LPS (100 ng/mL) for 20 h. The nitrite in the culture supernatant was evaluated using Griess reagent. Data are presented as the mean ±SD (n=3) for three independent experiments. ###P<0.001 versus control, ***P<0.001, **P<0.01 versus LPS are significantly different as analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

발현된 NO의 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 발효한 민들레잎과 발효하지 않은 민들레잎의 물 추출물과 에탄올 추출물을 62.5, 125, 250, 500 µg/mL의 농도로 RAW264.7 대식세포에 한 시간 전처리하고, LPS로 NO의 생성을 유도한 후 민들레 추출물의 NO 생성량을 측정된 결과 LPS만 단독 처리한 군에서는 NO가 약 7배 증가하였다. 추출물을 농도별로 전처리하였을 때 노루궁뎅이버섯 균사체로 발효한 민들레잎의 에탄올 추출물을 제외한 다른 추출물들은 NO의 생성을 효과적으로 억제하지 못하였으며, 발효한 민들레잎의 에탄올 추출물은 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하는 효과가 우수한 것을 확인하였다(Fig. 2).

세포 생존율

RAW264.7 대식세포에 샘플 추출물을 농도별로 한 시간 전처리한 후 LPS를 처리하고 20시간 배양하였을 때 발효한 민들레잎의 물 추출물은 125 µg/mL 이하 농도에서 독성을 나타내지 않았으며, 발효한 민들레잎의 물 추출물을 제외한 다른 샘플들은 최고 농도인 500 µg/mL 농도에서도 모두 100%에 가까운 생존율을 나타낸 것으로 보아 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다(Fig. 3). 특히 500 µg/mL 농도에서 발효한 민들레잎 물 추출물의 세포 생존율이 81%인 것에 비해 발효한 민들레잎 에탄올 추출물의 세포 생존율은 98%를 나타내었으며 이는 추출용매에 따라 세포의 독성 및 활성에 미치는 영향이 다른 것을 확인하였다.

Pro-inflammatory cytokine 생성 억제 효과

세포독성평가에서도 독성이 나타나지 않았고, NO 생성량 측정에서도 NO 생성 억제능이 가장 높았던 노루궁뎅이버섯 균사체로 발효한 민들레잎 에탄올 추출물을 이용하여 RAW264.7 세포로부터 pro-inflammatory cytokine의 생

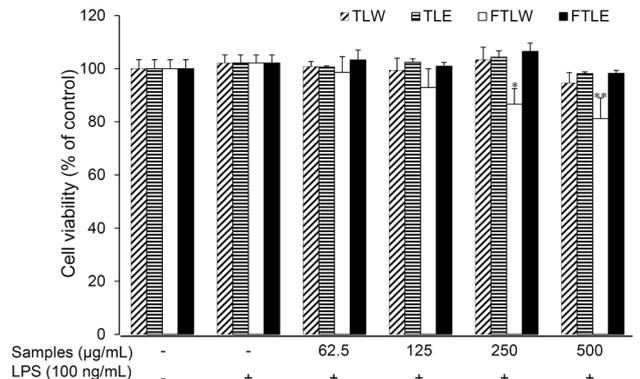


Fig. 3. Effects of fermentation on the leaves extracts of *T. platycarpum* on the viability of RAW264.7 cells. The results are displayed in percentage of control samples. Data are presented as the mean±SD (n=3) for three independent experiments. *P<0.05, **P<0.01 versus LPS are significantly different as analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

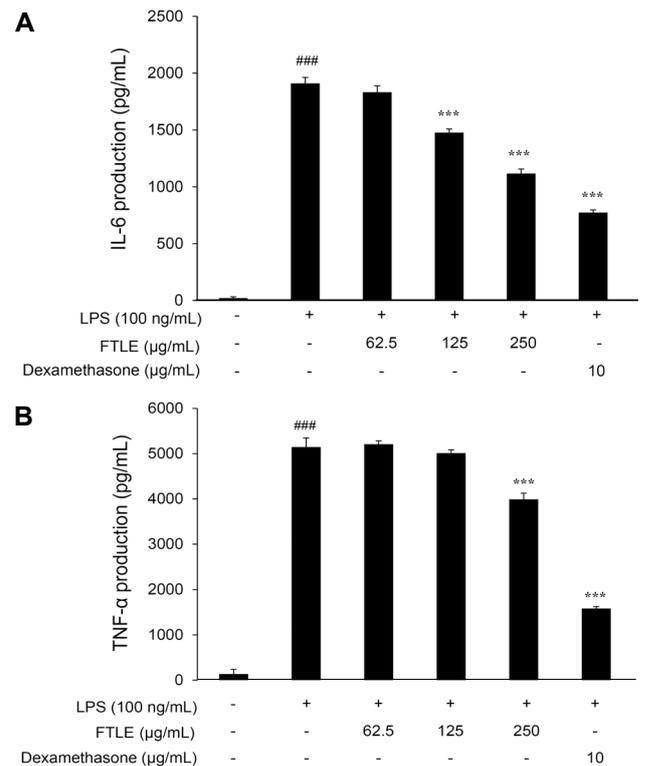


Fig. 4. Effect of FTLE on the production of IL-6(A) and TNF-α (B) in RAW264.7 cells. The cells were pre-treated with samples as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS (100 ng/mL) for 20 h. The level of cytokine was measured by ELISA. Data were represented as mean±SD (n=4) with one-way ANOVA followed by Tukey's test. ###P<0.001 versus control, ***P<0.001 versus LPS.

성 억제 효과를 측정하였으며 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. LPS는 RAW264.7과 같은 대식세포 또는 monocyte에서 TNF-α, interleukin-6(IL-6), IL-1β와 같은 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있다

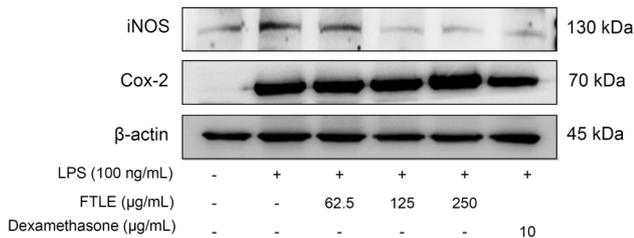


Fig. 5. Effect of FTLE on LPS-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) and COX-2 protein expression in RAW264.7 cells by western blot analysis. The cell were pre-treated with FTLE for 1 h, and then incubated with or without LPS (100 ng/mL) for 20 h. Detail methods were described in Materials and Methods. The results presented are representative of three independent experiments.

(34). 따라서 RAW264.7 세포를 LPS로 자극했을 때 IL-6와 TNF- α 의 생성량은 유의적으로 증가했으며, 양성대조군으로 사용한 dexamethasone을 10 μ g/mL 전처리했을 때 IL-6와 TNF- α 의 생성량이 유의적으로 감소하였다($P < 0.001$). 발효 민들레잎의 에탄올 추출물을 전처리했을 때 IL-6의 생성량은 농도 의존적으로 감소하였으나 TNF- α 의 생성량은 250 μ g/mL 농도에서만 유의적인 감소를 나타내었다($P < 0.001$).

iNOS 및 cyclooxygenase-2(COX-2) 발현 억제 효과

RAW264.7 세포에 발효 민들레잎의 에탄올 추출물을 62.5, 125, 250 μ g/mL로 1시간 동안 전처리한 후 LPS(100 ng/mL)를 처리하고 20시간 후에 대표적인 염증발현 protein인 iNOS와 COX-2의 발현 정도를 western blot을 통해 관찰하였다(Fig. 5). 그 결과 NO 생성량의 경향과 마찬가지로 LPS로 유도된 iNOS의 발현이 추출물에 의해서 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 iNOS 발현 억제를 통하여 NO의 생성 억제가 이루어진 것으로 판단된다. 그러나 발효 민들레잎의 에탄올 추출물이 COX-2의 발현을 억제하지는 않는 것으로 나타났으며, Han 등(35)의 연구 결과에 의하면 구절초 꽃 추출물을 처리하였을 때 iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 억제시켰으나 COX-2의 발현을 감소시키지 않았다고 하였다. 본 연구 결과 또한 Han 등(35)과 유사하게 발효 민들레잎의 에탄올 추출물에서 COX-2 단백질의 발현 억제는 유의성이 없는 것으로 나타났다.

요 약

본 연구는 민들레잎을 노루궁뎅이버섯 균사체로 발효한 후 물과 에탄올로 추출하여 추출용매별 및 발효 전과 발효 후의 항산화 및 항염증 활성을 비교 평가하였다. 추출물의 항산화 활성을 탐색하고자 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거능, ABTS를 이용한 라디칼 소거 활성, FRAP을 이용한 총 항산화능을 측정하였다. 또한 RAW 264.7 대식세포를 이용하여 NO 생성량, 염증관련 단백질

및 사이토카인의 변화를 측정하였다. 민들레잎을 발효한 후 항산화 활성은 감소하였으나 오히려 항염증 활성은 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 발효 민들레잎의 에탄올 추출물은 NO 생성 및 iNOS 단백질 발현을 효과적으로 억제하였으며 염증성 사이토카인인 IL-6를 억제하는 효과가 우수하였다. 이상의 결과로 항염증 소재로서 노루궁뎅이버섯 균사체를 이용한 발효 민들레잎의 에탄올 추출물의 활용 가능성을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 한국교통대학교 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kang MJ, Kim KS. 2001. Current trends of research and biological activities of dandelion. *Food Industry and Nutrition* 6(3): 60-67.
- Chon SU. 2012. Antioxidant activity and cytotoxicity of different *Taraxacum* species in Korea. *Korean J Crop Sci* 57: 51-59.
- Williams CA, Goldstone F, Greenham J. 1996. Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry* 42: 121-127.
- Bradley P. 1992. *British herbal compendium: A handbook of scientific information on widely used plant drugs*. British Herbal Medicine Association, Bournemouth, UK. Vol 1, p 73.
- González-Castejón M, Visioli F, Rodriguez-Casado A. 2012. Diverse biological activities of dandelion. *Nutr Rev* 70: 534-547.
- RácZ-Kotilla E, RácZ G, Solomon A. 1974. The action of *Taraxacum officinale* extracts on the body weight and diuresis of laboratory animals. *Planta Med* 26: 212-217.
- Jo JW. 1999. Compositae 10. In *Encyclopedia of Oriental Medicine*. Kyung Hee University Press, Seoul, Korea. p 514.
- Han EK, Lee JY, Jung EJ, Jin YX, Chung CK. 2010. Antioxidative activities of water extracts from different parts of *Taraxacum officinale*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1580-1586.
- Han EK, Jung EJ, Lee JY, Jin YX, Chung CK. 2011. Antioxidative activity of ethanol extracts from different parts of *Taraxacum officinale*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 56-62.
- Kim HW, Kim BJ, Lim SH, Kim HY, Lee SY, Cho SI, Kim YK. 2009. Anti-oxidative effects of taraxaci herba and protective effects on human HaCat keratinocyte. *Kor J Herbolology* 24: 103-108.
- Lim AK, Kim JO, Jung MJ, Jung HK, Hong JH, Kim DI. 2008. Functional biological activity of hot water and ethanol extracts from Taraxaci Herba. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1231-1237.
- Lee DS, Li B, Lee YJ, Chun HJ, Ryu IW, Jae YJ, Chae GU, Kwon YS, Shon JU, Kang HG, Lee SH, An RB, Lee HS. 2011. Anti-inflammatory effect of extracts from the roots of *Taraxacum coreanum* on lipopolysaccharide-induced inflammation in BV2 cells. *Kor J Oral Maxillofac*

- Pathol* 35: 231-238.
13. Back HU. 2003. *In vitro* free radical scavenging and hepatoprotective activities of *Taraxacum mongolicum*. *Kor J Pharmacogn* 34:4 324-326.
 14. Duke JA. 1992. Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. In *Herbal Reference Library*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p 587-589.
 15. Kang MG, Jo WS, Kim WH, Choi SY, Park SD. 2015. The difference of occurring pattern of *Hericium erinaceus* by pinheading induction methods. *J Mushrooms* 13: 11-15.
 16. Ha JH, Jeong HS, Oh SH, Jeong SS, Jeong MH, Jeong HS, Jeong JH, Yu KW, Lee HY. 2009. Comparison of immuno activities of fresh ginseng cultured *Phelinus linteus* and *Hericium erinaceum* mycelium associated with ultrasonification extraction. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 311-320.
 17. Park CK, Kim H, Tu Qi, Yu KW, Jeong HS, Lee HY, Jeong JH. 2009. Chemical composition and immunostimulating activity of the fermented Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) with mushroom mycelium by solid culture. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1145-1152.
 18. Jang JY, Shin S, Choi B, Park D, Jeon JH, Cho YM, Cho JH, Jung DH, Hwang SY, Ahn B, Jeong MS, Jeong JH, Kim YB. 2006. Effects of Erinacol[®], extract of *Hericium erinacium* cultivated with *Artemisia iwayomogi*, on alcoholic hangover and immune function. *Lab Anim Res* 22: 157-163.
 19. Shin S, Jang JY, Choi B, Jeon JH, Ji HJ, Moon SH, Jung DH, Yeo YG, Baek SJ, Hwang SY, Chung JH, Kim YB. 2006. Effects of Erinacol[®], extract of *Hericium erinacium* cultivated with *Artemisia iwayomogi*, on alcoholic fatty liver. *Lab Anim Res* 22: 165-170.
 20. Choi BI, Shin SH, Jang JY, Park DS, Kang DH, Nahm SS, Yeo YG, Cho JH, Hwang SY, Jeong MS, Jeong JH, Kim YB. 2006. Single- and repeated-dose toxicities of Erinacol[®], extract of *Hericium erinacium* cultivated with *Artemisia iwayomogi*, in rats. *Lab Anim Res* 22: 171-179.
 21. Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-968.
 22. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
 23. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1181: 1199-1200.
 24. Park MK, Kim CH. 2009. Extraction of polyphenols from apple peel using cellulase and pectinase and estimation of antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 535-540.
 25. Benzie IF, Strain JJ. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299: 15-27.
 26. Titheradge MA. 1998. The enzymatic measurement of nitrate and nitrite. *Methods Mol Biol* 100: 83-91.
 27. Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeong JH. 2012. Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1205-1210.
 28. Kim JS, Jeong JY, Nam JB, Oh JS, Yun CY, Ha SY, Choi MS, Yang JK. 2011. Polyphenol absorption potential in *Lentinula edodes* mycelium growth. *Mushroom* 15: 49.
 29. Jun DH, Lee JT, Cheon SJ, Kim TH, Lee DH, Han J, Kim SH. 2009. Polyphenol and anti-oxidant effects of *Kalopanax septemlobus* Koidz. leaf extracts. *Korean J Plant Res* 22: 343-348.
 30. Park MR, Yoo C, Chang YN, Ahn BY. 2012. Change of total polyphenol content of fermented *Gastrodia elata* Blume and radical scavenging. *Korean J Plant Res* 25: 379-386.
 31. Shon MY. 2007. Antioxidant and anticancer activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* fermented with mycelial mushrooms. *Food Industry and Nutrition* 12(2): 51-57.
 32. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1970. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med* 75: 410-421.
 33. Knowles RG, Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.
 34. Yoon WJ, Lee JA, Kim KN, Kim JY, Park SY. 2007. *In vitro* anti-inflammatory activity of the *Artemisia fukudo* extracts in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Korean J Food Sci Technol* 39: 464-469.
 35. Han J, Kim Y, Sung J, Um Y, Lee Y, Lee J. 2009. Suppressive effects of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* flower extracts on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1685-1690.