

## 창출과 영지버섯 균사체 발효 추출물의 항산화 활성 및 인체 암세포주에 대한 세포독성 분석

박미혜 · \*김미라  
경북대학교 식품영양학과

### Analysis of Antioxidant Activity and Cytotoxicity against Human Cancer Cell Lines of Extract from *Atractylodes rhizoma* fermented with *Ganoderma lucidum* Mycelium

Mi Hye Park and \*Mee Ra Kim

Dept. of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

#### Abstract

*Ganoderma lucidum* has been traditionally used as a medicine for treatment of bronchitis, arthritis, and high blood pressure, and it has been reported to display many biological activities including anticancer and immune activities. Since mushroom mycelium is known to have excellent biological activities together with mushroom fruiting body, studies on biological activities of mushroom mycelium have been actively conducted. Thus, the present study compared the biological activities before and after the cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium on *Atractylodes rhizoma*. When the radical scavenging activity was assessed by the DPPH assay, ARGL (ethanol extract of *Atractylodes rhizoma* mycelium fermented with *Ganoderma lucidum*) showed radical scavenging activity of 5.58~82.56% at concentrations of 10~500 µg/assay, while AR (ethanol extract of *Atractylodes rhizoma*) showed radical scavenging activity of 5.27~72.08% at the same concentrations. When measured by using the ABTS assay, ARGL showed higher radical scavenging activity than AR, which was consistent with the result obtained by the DPPH assay. In the MTT assay, the cytotoxicity of ARGL against all cell lines was higher than that of AR. In particular, the cytotoxicities of AR and ARGL against Hep3B at a concentration of 400 µg/assay were 71.81% and 86.40%, respectively. In addition, the result obtained by the SRB assay was consistent with the result obtained by the MTT assay. According to the results mentioned above, there is a high probability that medicinal herb cultures using mycelium can be used as sources of functional foods since the cytotoxicities against cancer cells and antioxidant activities increased when the mycelium was fermented with *Atractylodes rhizoma*.

Key words: *Ganoderma lucidum* mycelium, *Atractylodes rhizoma*, antioxidant, cytotoxicity

#### 서론

서구화된 식생활과 생활습관 변화로 인하여 암, 당뇨병, 고콜레스테롤혈증, 동맥경화 및 면역기능 저하와 같은 만성 질환 유병률이 급속히 증가하고 있다. 이러한 만성질환을 예방하기 위하여 질병의 예방과 개선에 도움이 되는 식품의 기능성에 관심을 가지게 되었으며, 안전성이 확인된 천연물로

부터 생리활성 물질을 찾는 연구들이 활발히 진행되고 있다 (Lee NY 2013).

창출(*Atractylodes rhizoma*)은 국화과(Compositae)의 삼주(*Atractylodes*) 속에 속하는 식물로 건조된 근경을 일컬으며, 소염작용, 항균작용 및 위장 질병 치료를 위한 한약재로 많이 이용되어 왔으며 항알레르기, 진통, 해열작용과 면역증대 활성도 가지는 것으로 보고되었다(Li 등 2012).

\* Corresponding author: Mee Ra Kim, Dept. of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea.  
Tel: +82-53-950-6233, Fax: +82-53-950-6229, E-mail: meerak@knu.ac.kr

버섯은 전 세계적으로 약용 및 식용으로 널리 이용되고 있으며, 다양한 생리기능 조절 작용이 알려져 있다. 그 중 영지버섯은 대표적인 약용버섯으로 항종양 활성, 면역증대 활성, 항암작용, 항산화 활성 등의 다양한 생리활성을 가지고 있다 (Lee & Bang 2001). 이와 같이 영지버섯은 우수한 생리활성과 약리효과를 가지고 있으나, 가격이 비싸고 배양기간이 길어 기능성 식품 소재로 이용하는데 어려움이 있다. 한편, 버섯의 유용한 생리활성이 버섯의 자실체뿐만 아니라, 균사체에도 있는 것으로 알려지면서 균사체 이용에 대한 관심이 높아지고 있다(Kim 등 2010). 버섯 균사체는 죽은 나무와 같이 유기물질을 함유한 기질에서 효소를 분비하여 필요한 영양분을 취하는 방식으로 성장한다(Wasser SP 2002). 따라서 버섯 균사체의 이러한 생육방식을 이용하여 생리활성 물질을 생산하는 방법에 대한 연구들이 수행되고 있다. Joung 등 (2009)은 목질진흙버섯, 영지버섯, 노루궁뎅이 버섯 균사체와 인삼을 배양했을 때 배양물의 ginsenosides 함량이 원료 인삼보다 크게 증가하였으며, 특히 영지버섯 균사체와 인삼의 배양물에서 사포닌이 가장 많이 증가하였다고 하였다. 또한, Sohn 등(2010)은 장수상황버섯 균사체를 이용한 구기자 및 패모 발효 추출물이 대장암 세포에 대해 높은 암세포 성장 억제기능을 나타내었다고 하였다. 이는 버섯 균사체가 한약재를 영양원으로 이용하여 생육하는 동안 균류가 가지고 있는 생물학적 변환능력(biotransformation)에 의해 한약재가 본래 가지고 있는 약리 활성성분과 균사체에 의해 생성된 생리활성 성분이 시너지 효과를 줄 수 있음을 시사한다(Sohn 등 2010). 따라서 본 연구에서는 한약재로 널리 사용되고 있는 창출을 배지로 이용하여 영지버섯 균사체를 배양하고, 배양물을 용매 추출하여 항산화 활성 및 인체 암세포에 대한 세포독성을 분석하고, 새로운 기능성 식품소재로서의 이용 가능성을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험에 사용한 창출은 대구 약령시에서 시판되는 국내산 한약규격품을 구입하여 사용하였고, 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 균사체는 국립산림과학원(Korea Forest Research Institute, Korea)으로부터 분양받아 potato dextrose agar(PDA, Lansing, Mich, Acumedia, USA) 배지에서 25°C로 5일간 배양한 후, 4°C에서 보관하면서 4주마다 계대배양하여 사용하였다.

### 2. 시약

2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl(DPPH), 2,2'-azinobis(3-ethyl-

benzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt(ABTS), dimethyl sulfoxide(DMSO), L-ascorbic acid, thiazoly blue tetrazolium bromide(MTT), sulforhodamine B(SRB), trichloroacetic acid(TCA), Folin-ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, quercetin, potassium hydroxide, sodium chloride, potassium chloride, trizama base는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 균사체 배양에 사용된 PDA, potato dextrose broth(PDB)는 Acumedia Co. (Lansing, Mich, USA)에서 구입하였다. 또한, 세포주 배양에 사용한 roswell park memorial institute medium(RPMI-1640 with L-glutamin), dulbecco's modified eagle's minimal essential medium(DMEM/ High glucose), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin solution, trypsin 0.25% EDTA solution은 Hyclone Co.(Logan, UT, USA)에서 구입하였다.

### 3. 영지버섯 균사체와 창출의 발효 및 추출물 제조

영지버섯 균사체를 PDA 배지에 접종하고, 25°C에서 7일간 배양한 뒤 cork borer(Ø 8 mm)를 이용하여 5~6개의 균주 디스크를 취하였다. 이를 PDB 배지 250 mL에 접종하여 25°C에서 7일간 진탕배양한 후, homogenizer(400 Mark II, SEWARD, USA)로 균질화하고 발효에 사용하였다. 창출은 증류수에 1시간 동안 침지시킨 다음, autoclave에서 121°C에서 15분간 멸균하여 상온으로 냉각시키고, 여기에 균질화시킨 영지버섯 균사체 액체중균을 접종하여 25°C에서 10일간 발효하였다. 이 발효물에 10배(w/v)의 80% 에탄올을 가하고 25°C에서 24시간 교반하여 추출물을 얻었다. 이를 여과지(Toyo No. 2, Advantec, Japan)로 여과한 다음 감압농축기(LABOROTA 4000-efficient, Heidolph Instruments GmbH & Co., KG, Germany)로 농축시켜 에탄올 추출물을 얻었다. 이를 동결건조기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Japan)를 이용하여 동결건조시킨 다음 -18°C에서 보관하여 실험에 사용하였다.

### 4. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu(FC)법(Re 등 1998)으로 측정하였다. 즉, 희석된 시료 1 mL에 증류수 5 mL를 혼합한 다음, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL를 가하고 vortex로 혼합하여 8분간 반응시킨 후, 7% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 mL를 첨가하였다. 여기에 증류수를 이용하여 부피를 25 mL로 맞추고 상온 암소에서 2시간 방치한 다음 UV/Vis spectrophotometer(DU 800, Beckman, USA)로 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 사용하여 검량곡선을 작성하고, 시료의 총 폴리페놀 함량을 구하였다. 시료의 총 폴리페놀 함량은 g당 gallic acid mg당량(mg GAE/g)으로 표시하였으며, 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

### 5. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등(2007)의 방법을 이용하여 측정하였다. 희석된 시료 500  $\mu\text{L}$ 에 10% aluminum nitrate 1 mL, 1 M potassium acetate 100  $\mu\text{L}$ 와 80% 에탄올 4.3 mL를 순서대로 가하고 암소에서 40분 동안 반응시킨 다음 UV/Vis spectrophotometer로 510 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 quercetin을 사용하여 검량곡선을 작성하고, 시료의 총 플라보노이드 함량을 구하였다. 총 플라보노이드 함량은 g당 quercetin mg당량(mg QE/g)으로 표시하였으며, 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

### 6. $\beta$ -Glucan 함량 측정

$\beta$ -Glucan 함량은 mushroom and yeast beta-glucan assay procedure kit(K-YBGL, Megazyme Int. Wicklow, Ireland)를 이용하여 측정하였다.

### 7. DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Blois MS(1958)의 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)를 이용하여 희석한 시료 1 mL에  $7.5 \times 10^{-5}$  M DPPH 용액 2 mL를 혼합하여 37°C에서 30분간 방치한 후 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였으며, DPPH 라디칼 소거 활성은 아래의 식을 이용하여 백분율로 나타내었고, 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거 활성(\%)} = \left\{ \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \right\} \times 100$$

### 8. ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거를 통한 항산화 활성 측정은 Roberta 등(1999)의 방법을 따라 측정하였다. 즉, 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 30°C의 암소에서 12시간 동안 방치하여 ABTS<sup>+</sup>을 형성시킨 후 5 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 413 nm에서 흡광도가 0.7이 되도록 희석하였다. 희석된 ABTS 시약 4 mL에 시료 40  $\mu\text{L}$ 를 가하여 1분 동안 반응시킨 뒤 413 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였으며, 각 시료의 ABTS 라디칼 소거 활성은 DPPH 라디칼 소거 활성 측정에 이용한 식을 이용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

### 9. 철 이온 환원력 측정

철 이온 환원력(Ferric Reducing Antioxidant Power; FRAP value)은 Benzie & Strain(1996)의 방법을 사용하여 측정하였다. FRAP 시약은 300 mM sodium acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM의 2,4,6-tris(z-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)과 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 10:1:1의 부피 비율로 실험 직전에 혼합하여 사용하였다. 시료와 FRAP 시약을 7:1(v/v) 비율로 혼합하여 37°C에서 5분간 반응시킨 다음 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP value는 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O를 이용한 표준곡선을 작성하여 구하였으며, FeSO<sub>4</sub> eq  $\mu\text{M}$ 로 나타내었다. 결과 값은 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

### 10. 세포주 배양

실험에 사용한 4종류의 세포주는 인체폐암 세포인 A549, 간암 세포인 Hep3B, 자궁경부암 세포인 HeLa, 자궁 정상세포인 HeLa229로 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, KCLB, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. A549, HeLa 및 HeLa229는 RPMI 1640 배지, Hep3B는 DMEM 배지를 사용하였고, 각각의 배지에 10% FBS와 1% penicillin streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### 11. MTT 분석

추출물의 암세포 증식 억제 효과를 측정하기 위해 Carmichael 등(1987)의 방법을 이용하여 MTT 분석을 실시하였다. 배양된 암세포를  $1 \times 10^5$  cells/mL가 되도록 96 well plate에 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지 80  $\mu\text{L}$ 를 제거하고, 각 well에 추출물을 농도별로 100  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하였다. 이를 48시간 동안 배양한 다음 MTT 용액 20  $\mu\text{L}$ 씩을 첨가하고 4시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하였다. 이때 생성된 formazan 결정에 DMSO:ethanol(1:1)용액 150  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 30분간 진탕배양한 뒤 ELISA reader(Versamax, Molecular Device, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 아래의 식을 이용하여 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \left\{ \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \right\} \times 100$$

### 12. SRB 분석

SRB 분석은 Doll & Peto(1981)의 방법을 이용하여 추출물의 암세포에 대한 세포독성을 측정하였다. 즉, 암세포를  $5 \times 10^4$  cells/mL 농도로 96 well plate의 각 well에 100  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양한 후,

농도별로 희석된 시료 100  $\mu$ L를 각 well에 첨가하고 48시간 동안 재배양하였다. 그 후 상등액을 제거하고 10% TCA를 각 well에 100  $\mu$ L씩 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음, TCA를 제거하고 증류수로 5번 세척하여 실온에서 건조하였다. 여기에 1% acetic acid에 용해시킨 0.4% SRB 용액을 각 well에 100  $\mu$ L씩 첨가하여 30분 동안 염색한 후 1% acetic acid로 5회 세척하여 건조시켰다. 여기에 10 mM tris buffer (pH 10.5) 100  $\mu$ L를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 암세포에 대한 세포 독성은 MTT 분석과 동일한 식으로 계산하였으며, 3회 반복 측정한 후 평균값으로 나타내었다.

### 13. 통계분석

실험결과는 SPSS 통계프로그램(version 22, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분산분석(ANOVA, analysis of variance) 및 *t*-test로 유의성을 분석하였으며, 사후검증은 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 영지버섯 균사체를 이용한 창출 발효 및 추출 수율

영지버섯 균사체를 창출에 접종하고 배양하여 3-4일이 경과된 후에는 균사가 성장하는 것을 볼 수 있었고, 10일 경과 후에는 영지버섯 균사체가 창출을 완전히 뒤덮을 만큼 왕성하게 성장한 것을 확인할 수 있었다. 창출 에탄올 추출물(AR)과 영지버섯 균사체와 창출 발효물의 에탄올 추출물(ARGL)의 수율은 각각 14.17%와 17.55%로 나타났다(Table 1).

### 2. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

AR과 ARGL의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. AR과 ARGL의 총 폴리페놀 함량은 각각 10.38 mg GAE/g, 13.82 mg GAE/g으로 ARGL의 총 폴리페놀 함량이 AR보다 유의적으로 높았다. 이러한 결과는 영지버섯 균사체를 이용한 가시오가피 발효 추출물이 가시오가피 추출물보다 총 폴리페놀 함량이 높게 나타났다고 보고한 Kim 등

(2014)의 연구 결과와 같은 양상이었다. Joung 등(2009)도 상 황버섯, 영지버섯 및 노루궁뎅이버섯 균사체로 발효된 인삼의 페놀성 물질이 원료 인삼보다 높다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 식물계에 분포되어 있는 페놀성 화합물은 분자 내 phenolic hydroxyl기가 free radical을 소거하는 역할을 하여 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Madsen 등 1996; Moller 등 1999). 따라서 본 연구에서 영지버섯 균사체와 창출 발효과정을 통해 폴리페놀 화합물이 증가함으로써 발효물의 항산화 활성 증가에 영향을 줄 것으로 기대되었다.

추출물의 총 플라보노이드 함량은 Table 1에 나타난 바와 같이, ARGL이 8.18 mg QE/g으로 측정되어 AR의 총 플라보노이드 함량인 4.73 mg QE/g보다 유의적으로 높게 나타났다. Kim 등(2014)은 노루궁뎅이버섯 발효 가시오가피 열수 추출물이 가시오가피 열수 추출물보다 높은 총 플라보노이드를 함유하였다고 보고하여 본 연구 결과와 일치하였다. 이러한 결과는 버섯 균사체가 발효되는 과정에서 결합된 고분자 페놀 화합물이 저분자로 분해되거나, 새로운 페놀 화합물들이 생성되었기 때문으로 생각된다.

### 3. $\beta$ -Glucan 함량

영지버섯 균사체 발효 전·후의 시료에 함유되어 있는  $\beta$ -glucan 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. AR과 ARGL은 각각 1.13, 12.65%의  $\beta$ -glucan을 함유하여 영지버섯 균사체와의 발효 후  $\beta$ -glucan 함량이 발효 전보다 유의적으로 증가된 것으로 나타났다. 이는 현미에 영지버섯 균사체를 접종 배양하였을 때,  $\beta$ -glucan 함량이 원료 현미에 비하여 약 30배 증가하였다고 보고한 Lee & Lee(2009)의 결과와 유사하였다. 버섯에 함유된  $\beta$ -glucan은 암이나 면역질환 개선 등의 생리활성 효과가 큰 것으로 알려져(Ohno 등 2000; Yoshikawa 등 2010), 다양한 버섯에서 추출한  $\beta$ -glucan의 구조와 생리활성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Carbonero 등 2012; Ma 등 2008; Wang 등 2004). 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)의  $\beta$ -glucan은 주로 세포벽에서 추출되며, glucose, mannose, galactose

**Table 1. Yields, contents of total polyphenol, flavonoid and  $\beta$ -glucan of ethanol extract from *Atractylodes rhizoma* and *Atractylodes rhizoma* extracts fermented with *Ganoderma lucidum***

Sample <sup>1)</sup>	Yield (%)	Total polyphenols (mg GAE/g) <sup>2)</sup>	Total flavonoids (mg QE/g) <sup>3)</sup>	$\beta$ -glucan (%)
AR	14.17±1.24	10.38±0.79	4.73±0.32	1.13±0.17
ARGL	17.55±0.89	13.82±1.11 <sup>*4)</sup>	8.18±0.45 <sup>*</sup>	12.65±0.81 <sup>**</sup>

<sup>1)</sup> AR: Ethanol extract from *Atractylodes rhizoma*.

ARGL: Ethanol extract from *Atractylodes rhizoma* fermented with *Ganoderma lucidum*.

<sup>2)</sup> mg of gallic acid equivalents/g of sample.

<sup>3)</sup> mg of quercetin equivalents/g of sample.

<sup>4)</sup> The star marker indicates significant difference between AR and ARGL by Student's *t*-test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

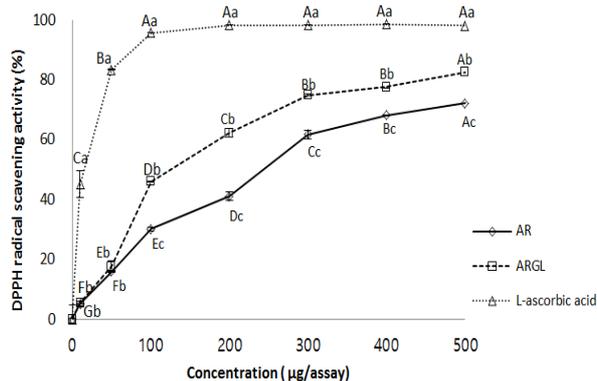
등과 결합된 형태로 존재하는데, 이와 같이 영지버섯 균사체로 발효된 추출물의  $\beta$ -glucan 함량이 증가된 것은 발효과정 중 균체의 증가로 세포벽도 증가하였기 때문으로 보인다.

#### 4. DPPH 분석

영지버섯 균사체를 이용한 추출 발효물의 항산화 활성 변화를 측정하기 위하여 AR과 ARGL의 농도에 따른 DPPH에 대한 전자공여능을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 즉, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g}/\text{assay}$  농도에서 AR은 5.27~72.08%, ARGL은 5.58~82.56%의 전자공여능을 각각 나타내어, 두 추출물 모두 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 증가하는 양상을 보였다. 또한, 100  $\mu\text{g}/\text{assay}$  이상의 농도에서 AR보다 ARGL의 DPPH 라디칼 소거능이 유의적으로 높아 균사체와의 발효를 통하여 항산화 활성이 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 이는 버섯 균사체를 이용하여 적미와 흑미를 발효하는 과정에서 DPPH radical 소거능이 증가되었다고 보고한 Kim S(2012)의 결과와 일치하는 것으로, 균사체가 발효과정을 거치면서 폴리페놀과 플라보노이드 등 항산화 물질이 증가되어 발효물의 항산화 활성에 영향을 준 것으로 생각된다.

#### 5. ABTS 분석

AR과 ARGL의 ABTS radical 소거능을 분석한 결과는 Fig. 2

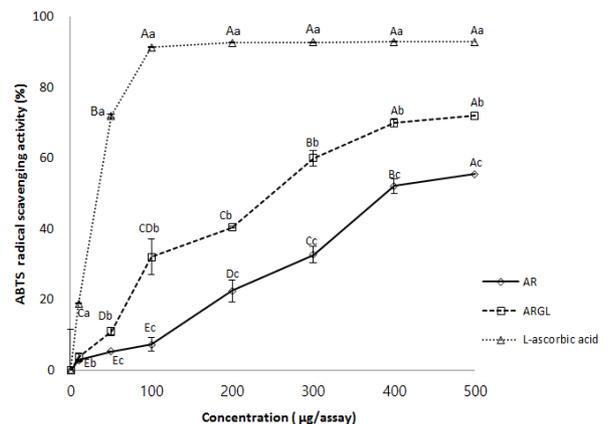


**Fig. 1.** The electron donating ability of *Atractylodes rhizoma* and *Atractylodes rhizoma* extracts fermented with *Ganoderma lucidum* mycelium using the DPPH assay. AR: Ethanol extract from *Atractylodes rhizoma*, ARGL: Ethanol extract from *Atractylodes rhizoma* fermented with *Ganoderma lucidum*, L-ascorbic acid: positive control group. Values with the different small letters (<sup>a-c</sup>) are significantly different at the same concentration by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Values with the different capital letters (<sup>A-G</sup>) are significantly different at the same sample by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

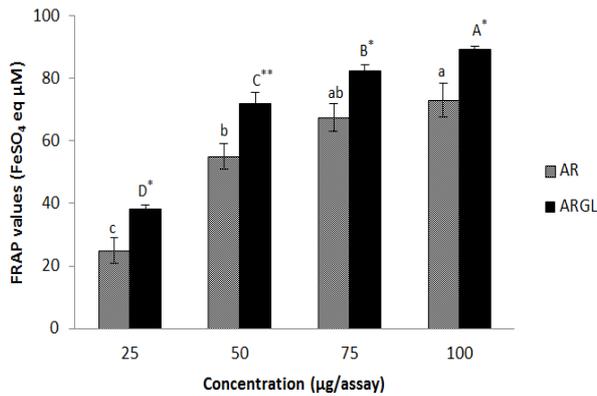
와 같다. 즉, AR은 10~100  $\mu\text{g}/\text{assay}$  농도에서 2.96~55.62%의 라디칼 소거능을 나타낸 반면, ARGL은 3.79~72.08%의 라디칼 소거능을 나타내었고, 50  $\mu\text{g}/\text{assay}$  이상의 농도에서 ARGL이 AR보다 유의적으로 높은 항산화 활성을 보였다. 이와 같이 ABTS 분석에 의해 측정된 항산화 활성은 DPPH 분석에 의해 나타난 결과와 같은 양상을 나타내었다. Joung 등(2009)의 연구에서도 인삼에 영지버섯 균사체를 발효한 경우, 원재료인 인삼보다 ABTS 라디칼 소거능이 유의적으로 증가했다고 하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. Kim 등(2004)은 버섯 균사체 발효물의 항산화 활성이 증가된 것은 버섯균사체가 가진 여러 효소들의 반응에 의하여 항산화 활성이 낮은 물질이 항산화 활성이 높은 물질로 생물 전환되었기 때문이라고 보고하였다. 본 실험에서도 AR보다 ARGL의 항산화력이 높은 것은 영지버섯 균사체가 생산하는 미생물 효소에 의하여 폴리페놀 및 플라보노이드와 같은 항산화 활성이 높은 물질이 생성되었기 때문으로 생각되며, 앞의 실험에서 AR보다 ARGL의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량이 높게 나타난 결과가 이를 뒷받침해 주었다.

#### 6. 철 이온 환원력

AR과 ARGL의 철 이온 환원력(FRAP value)을 25, 50, 75, 100  $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 농도에서 측정된 결과가 Fig. 3에 나타나 있다.



**Fig. 2.** ABTS radical scavenging activity of *Atractylodes rhizoma* and *Atractylodes rhizoma* extracts fermented with *Ganoderma lucidum* mycelium. AR: Ethanol extract from *Atractylodes rhizoma*, ARGL: Ethanol extract from *Atractylodes rhizoma* fermented with *Ganoderma lucidum*, L-ascorbic acid: positive control group. Values with the different small letters (<sup>a-c</sup>) are significantly different at the same concentration by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Values with the different capital letters (<sup>A-F</sup>) are significantly different at the same sample by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 3. Ferric ion reducing antioxidant power of *Atractylodes rhizoma* and *Atractylodes rhizoma* extracts fermented with *Ganoderma lucidum* mycelium.** AR: Ethanol extract from *Atractylodes rhizoma*, ARGL: Ethanol extract from *Atractylodes rhizoma* fermented with *Ganoderma lucidum*. Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ), as ascertained by Duncan's multiple range test, among the different concentrations in the same sample. Star marker at the same concentration indicates a significantly different between AR and ARGL at the same concentration by student's *t*-test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

AR과 ARGL의 FRAP value는 추출물의 농도에 따라 각각 24.90~72.97 FeSO<sub>4</sub> eq μM, 38.33~89.18 FeSO<sub>4</sub> eq μM로 나타났으며, ARGL은 AR보다 모든 농도에서 유의적으로 높은 FRAP value를 나타내었다. 이 결과를 볼 때, 제2철 이온을 환원시키는 환원력을 측정된 FRAP value는 라디칼 소거방식으로 항산화력을 측정된 DPPH 분석 및 ABTS 분석 결과와 일치하였다. 이와 같이 발효과정을 거치면서 환원력이 높아진 본 연구의 결과는 동충하초, 팽이버섯 및 큰느타리버섯 균사체로 발효시킨 후박추출물의 환원력이 비발효 후박추출물보다 높아졌다고 보고한 Shon MY(2007)의 연구 결과와 유사하였다. 또한, 버섯균사체로 발효한 가시오가피를 연구한 Kim 등(2014)도 영지버섯 균사체로 발효한 추출물이 다른 버섯 균사체를 이용하여 발효한 추출물보다 높은 환원력을 보였다고 보고하였다. 본 연구에서도 영지버섯 균사체 발효물의 환원력이 유의적으로 증가하는 결과를 보였는데, 이는 영지버섯 균사체 자체가 우수한 환원력을 가짐으로써 발효물의 환원력 증가에 영향을 미친 것으로 보인다.

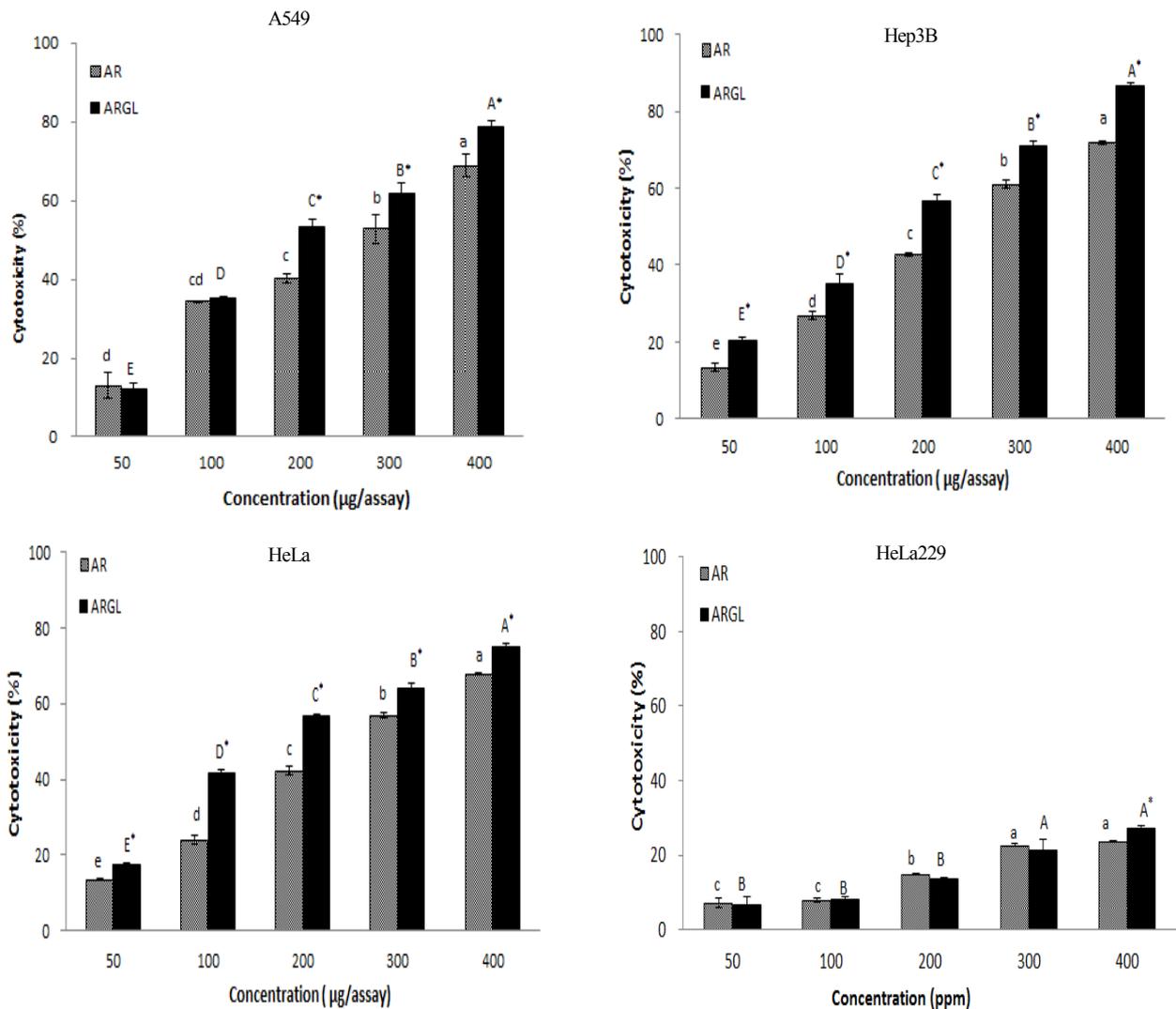
### 7. MTT 분석

인체 암세포인 A549, Hep3B, HeLa와 정상세포인 HeLa229에 대하여 MTT 분석을 실시한 결과는 Fig. 4와 같다. Hep3B에 대한 세포 증식 억제율은 농도별(50, 100, 200, 300, 400 μg/assay)로 AR은 13.48, 25.26, 42.71, 61.07, 71.81%, ARGL은

20.51, 29.62, 56.77, 71.03, 86.40%로 나타나, 실험한 세포주들 가운데 가장 높은 세포독성을 나타내었다. 또한 Hep3B와 HeLa의 경우, 모든 시료 농도에서 ARGL이 AR보다 높은 세포독성을 보였으며, A549에 대해서도 200~400 μg/assay 농도에서 ARGL이 AR보다 세포독성이 높았다. 이와 같이 ARGL이 AR보다 암세포에 대한 세포독성이 높게 나타남으로써 영지버섯 균사체 발효를 통해 암세포 증식억제 활성이 증가되었음을 확인할 수 있었다. 한편, 정상세포에 대한 추출물의 세포독성을 알아보기 위하여 인체 자궁 정상세포인 HeLa229에 대해서도 동일한 실험을 실시한 결과, 모든 농도에서 30% 미만의 낮은 독성이 나타나, 정상세포의 증식에는 큰 영향을 미치지 않은 것을 확인할 수 있었다. 균사체 추출물의 세포독성에 대한 Park 등(1998)의 연구에서도 표고버섯 균사체 추출물이 간암세포인 Hep3B에 대해 높은 세포독성을 가지고 있다고 하였으며, Bae & Ye(2007)도 Hep3B 세포에 인동초와 표고버섯 균사체를 발효한 추출물을 처리하였을 때 인동초 추출물을 처리하였을 때보다 세포독성이 3배 정도 증가하였다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 앞의 β-glucan 함량 분석에서 영지버섯 균사체를 이용하여 발효하는 동안 β-glucan 함량이 증가하였는데, 이와 같이 β-glucan과 같은 암세포 증식억제에 효과가 높은 물질들이 균사체와의 발효를 통해 생성되어 암세포에 대한 세포독성이 높아진 것으로 생각된다.

### 8. SRB 분석

SRB 분석을 통하여 A549, Hep3B, HeLa, HeLa229 세포에 대한 추출물의 세포독성 실험을 실시한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. SRB 분석에서도 AR과 ARGL 모두 Hep3B 세포에 대한 증식 억제 활성이 가장 높은 것으로 나타나 MTT 분석과 일치하는 결과를 보였다. 시료 농도에 따른(50, 100, 200, 300, 400 μg/assay) Hep3B에 대한 세포독성을 살펴보면, AR은 15.10~69.50%, ARGL은 16.47~83.81%의 세포독성을 나타내어 시료 농도에 의존적으로 세포독성이 증가하였다. 또한, ARGL이 AR보다 유의적으로 높은 세포독성을 보여 영지버섯 균사체 발효를 통하여 암세포 증식 억제 활성이 증가한 것으로 나타났다. 동일한 농도에서 A549에 대한 세포독성은 AR이 12.93~68.77%, ARGL은 12.18~78.58%로 나타났으며, 200 μg/assay 농도 이상에서 A549에 대해서도 균사체 발효과정을 거치면서 세포독성이 유의적으로 증가한 것을 볼 수 있었다. 또한, HeLa에 대해서도 가장 높은 농도인 400 μg/assay에서 ARGL은 76.80%의 높은 세포독성을 나타내었고, 200 μg/assay 이상의 모든 농도에서 ARGL이 AR보다 유의적으로 높은 세포독성을 보였다. 한편, 정상세포인 HeLa229에 대한 시료의 세포독성을 측정된 결과, MTT 분석에서와 마찬가지로

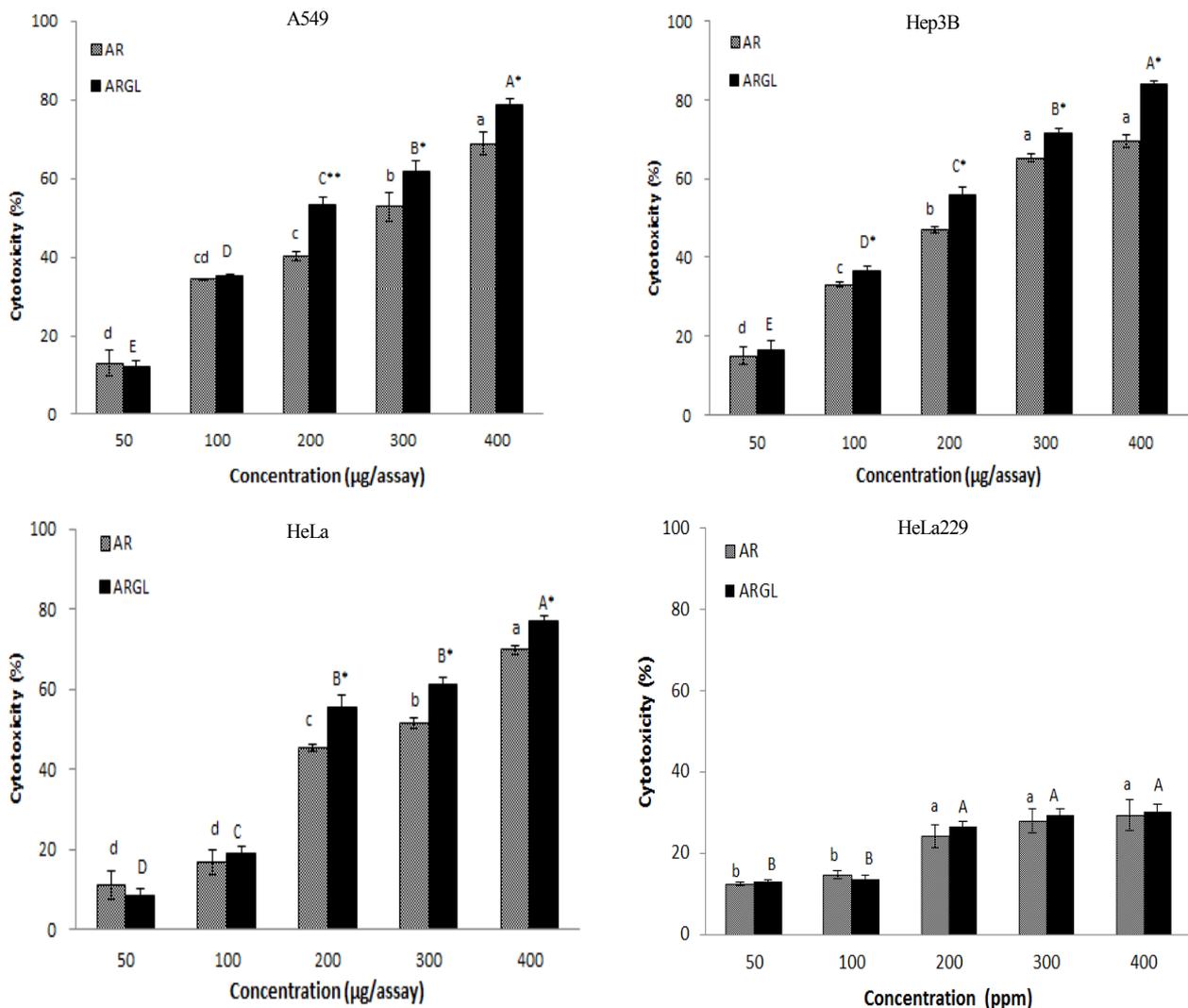


**Fig. 4.** Cytotoxicity effect of ethanol extracts from *Atractylodes rhizoma* and *Atractylodes rhizoma* extracts fermented with *Ganoderma lucidum* on human cancer cell lines using the MTT assay. AR: Ethanol extract from *Atractylodes rhizoma*, ARGL: Ethanol extract from *Atractylodes rhizoma* fermented with *Ganoderma lucidum*. Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ), as ascertained by Duncan's multiple range test, among the different concentrations in the same sample. Star marker at the same concentration indicates a significantly different between AR and ARGL at the same concentration by student's  $t$ -test ( $* p < 0.05$ ).

가지로 모든 농도에서 30% 이하로 세포독성이 나타나 정상 세포에 대한 독성은 높지 않은 것으로 나타났다. 영지버섯의 높은 항암 활성은 영지버섯에 함유되어 있는  $\beta$ -glucan과 polysaccharide, triterpene류의 항종양작용에 인한 것으로 보고되었는데(Bae 등 2005), 본 연구에서도 영지버섯 균사체를 이용하여 발효한 ARGL의 세포독성 효과가 큰 것은 발효과정 중 영지버섯 균사체에 함유된  $\beta$ -glucan과 같은 다당류를 비롯한 여러 항암 활성 물질이 생성되었기 때문인 것으로 사료된다.

## 결론 및 요약

본 연구에서는 영지버섯 균사체를 이용한 추출 발효 추출물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량,  $\beta$ -glucan 함량, 항산화 활성 및 인체 암세포에 대한 세포독성을 분석하였다. AR과 ARGL의 총 폴리페놀 함량은 각각 10.38 mg GAE/g, 13.82 mg GAE/g으로 ARGL이 AR보다 총 폴리페놀 함량이 유의적으로 높았으며, 총 플라보노이드 함량은 ARGL이 8.18 mg QE/g으로 4.73 mg QE/g인 AR보다 유의적으로 높게 나타났다. 또한 AR과 ARGL의  $\beta$ -glucan 함량은 각각 1.13, 12.65%로 발효과정 중  $\beta$ -glucan 함량이 증가한 것으로 분석되었다. 항산화 활성 측정을 위한 DPPH 분석 결과, 100  $\mu$ g/assay 이상



**Fig. 5.** Cytotoxicity effect of ethanol extracts from *Atractylodes rhizoma* and *Atractylodes rhizoma* extracts fermented with *Ganoderma lucidum* on human cancer cell lines using the SRB assay. AR: Ethanol extract from *Atractylodes rhizoma*, ARGL: Ethanol extract from *Atractylodes rhizoma* fermented with *Ganoderma lucidum*. Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ), as ascertained by Duncan's multiple range test, among the different concentrations in the same sample. Star marker at the same concentration indicates a significantly different between AR and ARGL at the same concentration by student's  $t$ -test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

의 모든 농도에서 ARGL이 AR보다 DPPH 라디칼 소거 활성이 높은 것으로 나타났다. 또한, ABTS 분석과 FRAP 분석에서도 대부분의 농도에서 ARGL이 AR보다 높은 항산화 활성을 나타내어, 창출이 균사체와의 발효 과정을 통해 항산화 활성이 증가된 것을 보여주었다. AR과 ARGL의 인체 암세포 증식 억제 활성을 측정된 결과, MTT 분석에서는 AR과 ARGL 모두 Hep3B에 대하여 가장 높은 세포독성을 보였으며, A549와 HeLa에 대해서도 비교적 높은 세포독성을 나타내었다. 또한 실험한 A549, Hep3B, HeLa 암세포주에 대해서 ARGL이 AR보다 높은 세포독성을 보였으며, 이러한 결과는

SRB 분석에서도 동일하게 나타나 균사체 발효과정을 거치면서 암세포 증식억제 활성이 증가된 것으로 확인되었다. 한편, 정상세포인 HeLa229에 대한 세포독성은 크지 않은 것으로 나타났다. 이와 같이 균사체와의 발효를 통해 항산화, 항암 활성이 높아진 것은 발효과정에서 폴리페놀, 플라보노이드 및  $\beta$ -glucan 함량 등 항산화, 항암과 관련된 기능성 성분들이 증가되었기 때문으로 생각된다. 따라서 영지버섯 균사체를 이용하여 발효한 창출은 우수한 생리활성을 가지고 있어, 앞으로 고부가가치의 기능성 식품 원료로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## References

- Bae MJ, Ye EJ. 2007. Effect of mycelia extracts from *Lentinus edodes* mushroom-cultured *Lonicera japonica* thunberg on anticancer and antiallergy activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36:424-430
- Bae WC, Kim YS, Lee JW. 2005. Bioactive substances from *Ganoderma lucidum*. *Kor J Microbiol Biotechnol* 33:75-83
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Carbonero ER, Ruthes AC, Freitas CS, Utrilla P, Galvez J, da Silva EV. 2012. Chemical and biological properties of a highly branched  $\beta$ -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydr Polym* 90:814-819
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936-942
- Doll R, Peto R. 1981. The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66:1191-1308
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13:572-584
- Joung EM, Kim HY, Hwang IG, Jeong JH, Yu KW, Lee JS, Jeong HS. 2009. Changes of antioxidant activities on cultured ginseng with mushroom mycelia during cultivation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:1346-1352
- Kim DB, Shin GH, Lee JS, Lee OH, Park IJ, Cho JH. 2014. Antioxidant and nitrite scavenging activities of *Acanthopanax senticosus* extract fermented with different mushroom mycelia. *Korean J Food Sci Technol* 46:205-212
- Kim H, Yoon HS, Jeong JH, Jeong HS, Hwang JH, Yu KW. 2010. Enhancement of immunostimulation by fractionation of active polysaccharide from fermented ginseng with *Phellinus linteus* mycelium in solid culture. *Korean J Food Sci* 42:223-232
- Kim S. 2012. The Physiochemical characteristics and whitening and antioxidant effects of colored rice cultured with the mycelium of *Phellinus baumii* pilst. MS Thesis, Chonnam National University. Gwangju. pp.30
- Kim SJ, Lim DK, Hyung SW, Kim MS, Kim MN, Lee KK, Ha YL. 2004. Inhibition of lipid autoxidation by the extract of the submerged-liquid culture of mushroom in the medium containing mulberry tree powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33:249-254
- Lee HD, Lee KS. 2009.  $\beta$ -Glucan and glucosamine contents in various cereals cultured with mushroom mycelia. *Kor J Mycol* 37:167-172
- Lee JW, Bang KW. 2001. Biological activity of *Phellinus* spp. *Food Indus Nutr* 6:25-33
- Lee NY. 2013. Antioxidant effect and tyrosinase inhibition activity of seaweeds ethanol extracts. *J Korean Soc Food Nutr* 42:1893-1898
- Li X, Lin J, Han W, Wang L, Li Q, Lin B, Bai M, Zhang L, Chen D. 2012. Antioxidant ability and mechanism of rhizoma *Atractylodes macrocephala*. *Molecules* 17:13457-13472
- Ma Z, Wang J, Zhang L. 2008. Structure and chain conformation of beta-glucan isolated from *Auricularia auricula-judae*. *Biopolymers* 89:614-622
- Madsen HL, Nielsen BR, Bertelsen G, Skibsted LH. 1996. Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. *Food Chem* 57:331-337
- Moller JKS, Madsen HL, Altonen T, Skibsted LH. 1999. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water extractable antioxidants. *Food Chem* 64:215-219
- Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2007. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71:109-114
- Ohno N, Miura NN, Nakajima M, Yadomae T. 2000. Antitumor 1, 3- $\beta$ -Glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. *Biol Pharm Bull* 23:866-872
- Park MH, Oh KY, Lee BW. 1998. Anti-cancer activity of *Lentinus edodes* and *Pleurotus*. *Korean J Food Sci Technol* 30:702-708
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1998. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azino-bis(3-ethylene benzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Method Enzymol* 299:379-389
- Roberta R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Catherine RE. 1999. Antioxidant activity applying an im-

- proved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231-1237
- Sohn HY, Shin YK, Kim JS. 2010. Anti-proliferative activities of solid-state fermented medicinal herbs using *Phellinus baumii* against human colorectal HCT116 cell. *J Life Sci* 20:1268-1275
- Shon MY. 2007. Antioxidant and anticancer activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* fermented with mycelial mushrooms. *Food Indus Nutr* 12:51-57
- Wang Y, Zhang L, Li Y, Hou X, Zeng F. 2004. Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of a eta-glucan from *Poria cocos* sclerotium. *Carbohydr Res* 339: 2567-2574
- Wasser SP. 2002. Medical mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:258-274
- Yoshikawa K, Kokudo N, Hashimoto T, Yamamoto K, Inose T, Kimura T. 2010. Novel phthalide compounds from *Sparassis crispa* (Hanabiratake), Hanabiratakelide A-C, exhibiting anti-cancer related activity. *Biol Pharm Bull* 33:1355-1359

---

Received 11 March, 2017

Revised 22 April, 2017

Accepted 16 May, 2017