

미생물 발효 영지버섯 추출액의 다당체에 관한 연구

황유연 · 정명수 · 김혜자 · 이기남*

원광대학교 한의과대학 예방의학교실

Studies on the Polysaccharide of Ganoderma lucidum Extract by Microorganism Fermentation

Yu Yeon Hwang, Myong Soo Chong, Hae Ja Kim, Ki Nam Lee*

Department of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

In order to investigate the totale yield, the content of soluble polysaccharide and the others of FEW extract from the yeast fermentated Ganoderma lucidum by supersonic method, the yeast strain was inoculated after pretreatment and subsequently followed fermentation and supersonic extract. The main construction of the extract method is composed of the main glucose and together with the xylose, fucose, galactose and mannose. Results show that because of the generated lactic acid and ethanol, pH value of extract decreases and the safety as well as the preservation is improved. The extract yield, the total soluble polysaccharide, SOD-like activity, cytotoxic effect and growth inhibitory effect against cancer cell line are much higher in FE method than RE method, especially FEW3 extracts fermented during 24hrs. It is concluded that yeast fermentation makes the extract yield increase because of the cell disintegration, the useful ingredients of the germ body, the metabolic products, the insoluble ingredients due to the generation of ethanol, and the cell fragmentation caused by the supersonic waves vibration. Content of generated ethanol, total soluble polysaccharide and extract yield all increase during the fermentation time from 24 to 72 hours and the optimum fermentation condition is at 27°C for 72 hours. The bitter taste and smell of the Ganoderma lucidum extract is diminished, fragrant-bitter taste and smell is generated so that the whole functional quality is improved.

Key words : Ganoderma lucidum, microorganism fermentation, polysaccharide, SOD-like activity

서 론

영지버섯은 구멍쟁이버섯과에 속하는 버섯으로 赤芝, 黑芝, 靑芝, 白芝, 黄芝, 紫芝의 6종으로 분류되어 있으며, 우리나라에서 재배되는 것은 주로 赤芝이다. 영지버섯은 예로부터 귀중한 약재로 사용되어 왔고 최근에는 인공재배에 성공함으로써 그 약효성분의 분리도 가능하게 되었다¹⁾. 영지자실체는 물 또는 유기용매로 추출한 것을 맛 보았을 때 가장 특이한 점은 고미를 나타낸다는 것이다. 이 쓴 맛의 성분이 각종 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있고 이러한 고미성분은 액체 배양한 균사체에서는 거의 생성되지 않지만 자실체에서는 갖의 표면에 집중되어 있는 것으로 알려져 있다²⁾. 이러한 영지버섯은 오래 전부터 진귀한 신

약으로 인식되어졌는데 <神農本草經>에는 생명에 無毒이면서 수명을 연장한다는 불로초로 영지를 기록하기도 하였으며³⁾ 자양강장, 진정, 진통, 항종양, 혈압강하제로써 그리고 동맥경화, 기관지염, 만성관절염, 급만성 간염 등의 치료에 만병통치의 약제로 쓰여져 왔다⁴⁾.

영지를 이용한 한의학적 치료방법은 영지를 이용한 한방적 치료방법은 <중약대사전>⁵⁾에 만성위장병, 만성기관지염, 기관지천식, 백혈구 감소증, 관상동맥 경화성 심장병, 부정맥, 급성간염 등에 사용하는 것으로 되어 있으며, 김 등⁶⁾의 연구에서는 국내산 재배영지 추출 수용성 다당체(Polysaccharides)가 흰쥐에 투여하였을 때 육종이 87.6% 억제된다고 보고하였으며, 다른 연구⁷⁻¹¹⁾에서는 영지버섯 추출물이 항암효과를 나타내어 간암, 폐암 및 기타 여러 암들에 대한 우수한 치료 및 예방효과를 가지고 있어 항종양 활성이 있다고 보고하였다.

효모(Yeast)는 진균류(Fungi)에 속하는 진핵생물로 당을 분

* 교신저자 : 이기남, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : kinam1@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6836

· 접수 : 2007/10/17 · 채택 : 2007/11/23

해하여 알코올과 CO₂를 만들어 내는 특징이 있으며 양질의 단백질과 무기질, 비타민 B군, 다당류 등을 많이 함유하고¹²⁾ 있으며, 특히 효모의 세포벽 속의 β-glucan 등은 각종 항암성 면역강화 기능이 있는 것으로 보고되고 있다¹³⁾.

본 연구에서는 각종 약리 기능이 있는 영지버섯 추출물에 효모 균주에 속하는 *Saccharomyces cerevisiae*를 배양하여 접종, 발효시킴으로써 약리성분의 추출을 극대화하고 유용성분의 분자 구조를 분해시켜 인체 흡수율과 이용률을 상승시켜 발효산물에 의한 부가적 기능성 이외에도 맛, 냄새 및 기호도 등을 개선 할 수 있는 방법을 연구하고 실험하였다.

또한 기존의 고온추출 방법을 저온 초음파 추출 방법으로 전환하여 고온추출에서 발생하는 유용성분의 열손실을 감소시키고 초음파의 세포 파쇄기능¹⁴⁾을 적용시켜 추출 수율 특히 효모 세포벽 속에 함유되어 있는 β-glucan 등을 효율적으로 추출할 수 있는지를 연구하고 효모 발효 조건을 탐색하여 최적의 발효 방법을 실시하여 유의한 결과를 규명하고, 영지버섯 추출물의 생리활성에 대하여 SOD-like activity 활성, Nitric oxide 생성, 암세포 저해율, IC₅₀ 값을 측정, 실험한 결과 본 연구에 의한 영지버섯 발효 초음파 추출물이 항산화 기능, 성인병 예방, 항암활성, 면역 증강 등의 생리활성 효과에 있어 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용한 영지버섯은 한국산 재배 영지버섯 (*Ganoderma lucidum* : 국내산)을 서울 경동시장에서 구입하여 실험에 사용하였으며, 효모는 동결 건조된 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 (주)송은통상에서 구입하여 -40℃에 보관하면서 YM액체배지(yeast extract 3 g, glucose 10 g, malt extract 3 g, peptone 5 g, D.W 1 L, pH 5.0)에서 12~14시간마다 2회 이상 계대배양하여 그 배양액을 균균으로 사용하였다.

그리고 대식세포주 Raw 264.7과 섬유성육종세포 HT1080 (Fibro sarcoma, Human)을 KCLB에서 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 재료의 전처리

(1) 영지버섯

영지버섯 200 g에 증류수 600 ml를 가하여 20℃에서 4시간 동안 침지시킨 후 분쇄기(Haniil, Korea, 500W)를 이용하여 40mesh 정도 크기의 입자로 습식 분쇄하였다.

(2) 효모

전 배양한 효모 배양액을 1회 더 계대배양하여 27℃ 배양기 (Vision Scientific. Co. Korea)에서 2~3일 정도 본 배양하여 총균수가 1.0×10⁸ cfu/ml 되도록 증식시켜 starter로 사용하였다.

2) 추출 및 발효

(1) 환류냉각 열수추출(Reflux extraction: RE)

40mesh로 습식 분쇄한 영지버섯 시료 50 g에 증류수 600 ml

을 가하여 100℃에서 1시간, 60℃에서 2시간 동안 환류냉각 열수 추출기(Daewoong, Korea, DWG-11,000R)에서 열수추출한 후에 여과지(Whatman NO.2)로 여과하여 원심분리기(Sigma, USA)로 7,500rpm에서 40분간 원심분리하여 상등액을 RE 추출액으로 하고 REW로 명명, 사용하였다.

(2) 발효추출(Fermented extraction: FE)

40mesh로 습식 분쇄한 영지버섯 시료 50 g에 증류수 600 ml을 가하여 Autoclave(Sanyo, Japan)에서 121℃로 20분간 멸균한 후에 효모 배양액을 5% 접종하여 배양기에서 27℃의 온도로 각각 24 hr, 48 hr, 72 hr, 96 hr 동안 발효시켰다.

그 후 각각의 시료를 65℃에서 15분간 효소활성을 실험시킨 다음 초음파(Branson, USA, 3510-EDTH) 진동을 30분씩 2회 가한 후에 여과지(Whatman NO.2)로 여과하여 원심분리기(Sigma, USA)로 7,500 rpm에서 40분간 원심분리하여 상등액을 FEW로 하였으며, 발효시간에 따라 각각 FEW1(24hr), FEW2(48hr), FEW3(72hr), FEW4(96hr)로 명명, 사용하였다.

REW와 FEW 제조방법을 도식화하여 Fig. 1에 나타내었다.



Fig. 1. Extraction Method of the *Ganoderma lucidum*

3) 효모의 생육도, pH 및 총산도 측정

생육도 측정은 REW는 원액을, FEW는 희석액을 각각 1 ml씩 취하여 효모 판별용 YM 고체평판배지에 도말하여 27℃에서 2~3일간 배양한 후 나타난 Colony를 총균수로 산출하여 생육상태로 하였다.

pH는 pH meter(M-8S, Horiba, Co.)로 측정하였고, 총산도는 REW와 FEW를 각각 10 ml씩 취한 것에 10 ml의 증류수를 가하고 0.5%(W/V) phenolphthalein-50% ethanol 3방울을 적가해서 혼합한 후 뷰렛을 이용하여 0.1 N-NaOH(F=1.000) 용액으로 시료가 분홍색(pH 8.3)으로 변할 때까지 중화 적정하였다. 이때 소비된 0.1 N-NaOH의 ml 양을 다음 식을 이용하여 젖산(Lactic acid)%로 환산하였다.

젖산(% W/V) = 적정치 x 0.009/10 x 100

4) Ethanol 정량

Ethanol 정량은 Gas chromatography(GC)로 수행하였다. Ethanol 분석용 시료 1 ml에 10 M phosphoric acid 0.1 ml을 가한 후 원심분리기(Sigma, USA)로 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 미량의 단백질을 침전시키고 상등액 1 ul를 취하여 1회 주입량으로 하였다. 이때 ethanol 농도는 5 mM ethanol 표준시약의 peak와 비교하여 ethanol 양으로 환산하였다.

5) 추출 수율 측정

REW와 FEW1(24 hr), FEW2(48 hr), FEW3(72 hr), FEW4(96 hr) 시료 각각을 회전진공농축기(Sanyo, Japan)를 사용하여 감압농축시킨 후 동결건조하여 가용성 고형분 무게를 측정 한 후 100 g에 대한 추출율로 환산하였다.

6) 수용성 다당체의 함량 측정

REW와 FEW1(24 hr), FEW2(48 hr), FEW3(72 hr), FEW4(96 hr) 시료 각각을 ethanol 침전(ethanol 80% 이상)하여 4°C에서 24시간 침전시켜 20분간 원심분리하여 분리된 침전물에 5%의 증류수를 가하여 용해시킨 후 105°C에서 ethanol을 증류하고 한의 여과막으로 여과하여 동결건조기(Eyela FDU 540, Japan)에서 동결 건조하여 분리한 후 고형분 무게를 측정하여 수용성 다당체 함량으로 환산하였다.

수용성 조배당체의 함량측정 과정을 도식화하여 Fig. 2에 나타내었다.

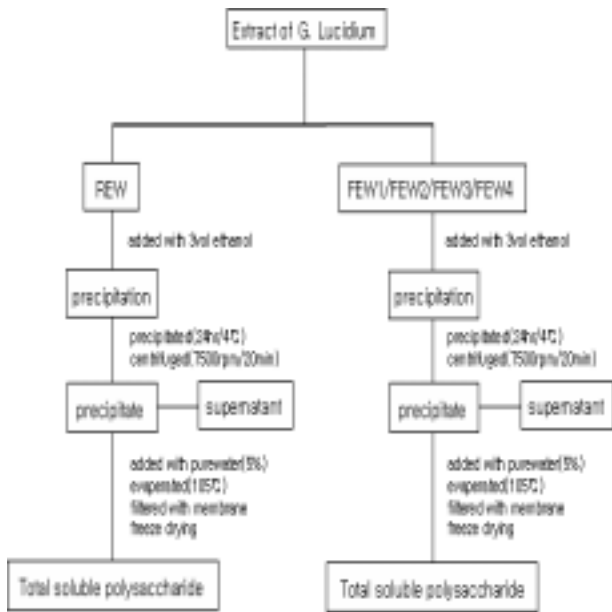


Fig. 2. Extraction Method of the Soluble Polysaccharide from the Ganoderma lucidum

7) 수용성 조배당체의 성분분석

FEW를 가수분해하여 얻은 가수분해물을 표준단당류와 함께 환원성 아민화 반응에 의해 형광기를 결합시킨 당을 제조하여 전기영동에 의해 분리한 다음 UV lamp(UV-Retrachter, Camag)를 사용하여 366nm에서 확인하고 HPLC(Spectra physics

Co.)로 분석하였다.

8) 관능검사

REW와 FEW1(24 hr), FEW2(48 hr), FEW3(72 hr), FEW4(96 hr) 시료 각각을 일정량 취하여 냄새, 맛, 그리고 전체적인 기호도를 평가하였다. 관능검사원은 사전에 식별 훈련을 받은 사람 중에서 예비실험을 거쳐 10명을 최종 선정하였고, 관능평가 항목은 쓴맛(Bitter taste), 향긋한 쓴맛 (Fragrant taste)과 이에 상응하는 냄새(Smell), 그리고 전체 기호도(Total acceptability)로써 조사방법은 척도법으로 등급화하여 1등급에서 5등급으로 각각 구분하여 그 도가 약함은 1등급으로, 그 정도가 강함은 5등급으로 표시하도록 하였다.

관능검사에 대한 통계처리는 SAS program으로 실시하였고, 그 결과의 차이는 ANOVA 분산분석법으로 분석하여 유의적인 차이가 있는 경우는 Student Newman Keul의 다중비교법에 의하여 검정하였다.

9) SOD 유사활성(SOD-like Activity)

REW와 FEW1~4의 SOD 유사활성은 H₂O₂로 전환시키는 반응의 촉매 pyrogallol의 생성량을 측정하였다. REW와 FEW1~4 각각의 시료 0.2 ml에 pH8.5로 보정한 tri-HCl buffer(50 mM tri[hydroxymethyl] amino-methane +10 mM EDTA, pH 8.5) 3 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml을 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1N HCl 1 ml을 가하여 반응을 정지시켰다.

반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며 SOD 유사활성을 다음과 같이 계산하였다.

SOD-like activity(%) = 100-(solution without extracts/ solution with extracts×100)

10) Nitric Oxide 생성

대식세포주(Raw264.7)를 10% fetal bovine serum(FBS)와 streptomycin 및 penicillin(100 ug/100 unit)을 포함하는 dulbecco's modified eagle medium (DMEM)에서 배양하여 사용하였다. Nitrite 측정은 griss 반응을 이용하여 cytokine에 의한 Raw264.7 세포가 발생하는 nitrite의 농도를 측정하였다.

Raw 264.7 세포를 hemocytometer를 이용하여 5×10⁶ cell/ml, 12well에 1ml 씩 분주하여 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양한 후에 비부착성 대식세포를 제거하고 다시 시료(REW와 FEW1~4, 100 ug/ml)를 포함한 배지 1.5 ml을 각각 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양하였다.

상등액 100 ul을 취하여 96well에 넣고 griss reagent(1% sulfanilamide/ 0.1% naphthylene diamine dihydrochloride/ 2.5% H₃PO₄) 100 ul을 넣고 15분간 20°C에 방치하나 후 540 nm에서 microplate reader(ELISA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Positive control은 lipopolysaccharide(LPS)를 사용하였다.

11) 항암활성

영지버섯 추출물의 항암활성 측정을 위하여 섬유성육종암세포포(HT 1080, fibrosarcoma, human)을 10% fetal bovine serum (FBS)와 100unit/mL penicillin/streptomycin을 함유한 RPMI1640 medium에서 37°C, 5% CO₂에서 배양하여 사용하였다.

시료의 항암활성 효과는 MTT Assay로 수행하였다.

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 분석은 세포의 생육 및 분화를 측정하는 방법으로서 이 실험은 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase 가 황색 수용성 물질인 MTT에 의해 dark blue formazan을 생성하는 점을 기초로 한 것이다.

배양한 HT 1080세포를 10% fetal bovine serum을 함유한 RPMI 1640 배지(100 unit/mL penicillin/streptomycin)를 5×10⁴ cell/ml 농도로 각각의 well에 100 μl씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양시킨 후 REW와 FEW1~4를 1.0 mg/ml의 농도로 100 μl씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 여기에 MTT (5 ug/5 ul) 용액을 20 ul씩 첨가하여 48시간 배양시켜 formazan을 형성시킨 후 aspirator로 상등액을 제거시켰다. 그리고 DMSO(dimethyl sulfoxide) 150 ul를 첨가하여 formazan을 녹인 후 540 nm에서 microplate reader(ELISA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Control은 phosphate buffered saline 20 ul을 분주하여 사용하였다.

Growth inhibition rate(%) = (Control absorbance-Experimental absorbance/Control absorbance)×100

12) 통계처리

본 연구의 실험 결과들은 SPSS를 이용하여 각 군의 평균과 표준편차를 산출하고 시료간의 차이 검증은 One-way ANOVA를 사용하였고, Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다. 모든 값은 mean ± standard deviation 값으로 표기하였다.

결과 및 고찰

1. 효모균주의 생육도, pH, 총산도, Ethanol 함량

생육도, pH, 총산도 및 ethanol 함량을 실험한 결과는 Table 1과 같았는데, REW와 비교해 볼 때 발효 처리한 FEW1~4에서 균주의 생육도, 총산도의 생성 및 ethanol 함량이 모두 더 높게 나타났다.

총균수는 발효시간이 경과하면서 점차 증가하였는데 특히 72시간과 96시간 발효한 FEW3과 FEW4에서 다른 시료보다 유의적인 차이(p<0.05)를 나타냈으며, 증식속도는 발효 48시간에서 72시간 사이인 FEW2와 FEW3에서 빠른 증식속도를 보이다가 발효 96시간째인 FEW4에서는 완만하게 증식하는 것을 볼 수 있었다.

REW보다 효모발효에 의해 pH는 점차적으로 더 낮아지고, 반면에 산생성이 유의적인 차이로 더 증가하는 것을 볼 수 있으며, Ethanol 함량 또한 REW보다 FEW에서 유의적인 차이로 높게 나타났으며, FEW 시료간에는 FEW2가 약 68.80 mM로 가장 높았으며, 그 다음 FEW3가 약 63.60 mM로 나타났다.

이상의 실험결과에서 효모의 증식속도와 ethanol 생성량은 비례하며, 효모발효의 최적 조건은 48~72시간이 적합한 것을 알 수 있었다.

발효 대사산물에는 유기산, 알코올, CO₂ 등이 함유되어 있어 pH를 낮추어 보존성을 높여주고, 알코올에 의한 불용성 성분이 추출될 수 있으며 거부감이 있는 맛과 냄새를 제거하여 준다고 이미 알려져 있으며, 본 실험에서도 이와 동일한 결과를 얻을 수

있었다.

Table 1. Growth Pattern, pH, Total Acidity and Ethanol Production by Yeast in REW, FEW Samples

Sample	Cell growth (log.cfu/ml)	pH	Total acidity (% as lactic acid)	Ethanol (mM)
REW ¹⁾	0.00 ± 0.00 ^{6c*}	4.80 ± 0.07 ^a	0.30 ± 0.02 ^c	0.00 ± 0.00 ^{6**}
FEW1 ²⁾	5.10 ± 0.45 ^b	4.79 ± 0.02 ^{ab}	0.33 ± 0.03 ^{bc}	46.13 ± 2.18 ^d
FEW2 ³⁾	5.35 ± 0.25 ^b	4.76 ± 0.04 ^{ab}	0.37 ± 0.02 ^{ab}	68.80 ± 3.08 ^a
FEW3 ⁴⁾	7.38 ± 0.67 ^a	4.71 ± 0.02 ^{bc}	0.41 ± 0.03 ^a	63.60 ± 0.56 ^b
FEW4 ⁵⁾	7.72 ± 0.38 ^a	4.65 ± 0.03 ^c	0.42 ± 0.04 ^a	58.70 ± 1.23 ^c

1) Reflux extract with hot water, 2 times. 2) Fermented extract with Yeast for 24hrs. 3) Fermented extract with Yeast for 48hrs. 4) Fermented extract with Yeast for 72hrs. 5) Fermented extract with Yeast for 96hrs. 6) All data were represented as mean SEM of three independent experiments. * : a~e Different superscripts in the table indicate significant difference at the p<0.05 level by Duncan's multiple range test. ** : Not Detected

2. 추출 수율 및 수용성 다당체의 함량

REW와 FEW1~4의 추출 수율과 수용성 다당체의 함량을 측정된 결과는 Table 2와 같았다. Table 2에서 RE방법보다 FE방법에 의한 추출물의 추출 수율과 수용성 다당체의 함량이 유의적인 차이로 높은 것으로 나타났다. RE방법에 의한 추출 수율은 약 12.55 mg/g으로 FE방법 중에서 가장 높은 수치를 보이는 FE4에 의한 추출 수율인 약 23.38 mg/g 비하여 유의적인 차이로 낮은 추출 수율을 나타내고 있는데, 이는 효모발효에 의한 세포분해효과, 효모의 유용성분 및 효모발효에 의한 대사산물 및 ethanol 생성으로 불용성 성분의 추출효과, 초음파 진동에 의한 세포파괴로 인한 추출 수율 상승 효과 등에 의한 것으로 판단된다.

본 실험 결과 효모발효 시간이 24~72시간 까지는 추출 수율 및 수용성 다당체의 함량이 유의적인 차이로 증가하고 있으나 72시간 이후에는 큰 변화를 보이지 않고 있는 것으로 보아 효모 배양액 5% 접종시의 최적발효 시간은 27°C에서 72시간으로 확인되었다.

Table 2. Extraction Yield and Totale Soluble Polysaccharide of Ganoderma lucidum

Sample	Extraction Yield(mg/g) ¹⁾	Total Soluble Polysaccharide(mg/g) ²⁾
REW	12.55 ± 0.47 ^{3cd*}	3.20 ± 0.28 ^c
FEW1	17.93 ± 0.79 ^c	5.00 ± 0.23 ^b
FEW2	19.63 ± 0.46 ^b	5.24 ± 0.25 ^b
FEW3	22.83 ± 0.54 ^a	6.76 ± 0.62 ^a
FEW4	23.38 ± 0.04 ^a	7.14 ± 0.22 ^a

1) mg Soluble solid/g dry matter. 2) mg Soluble crude polysaccharide/g dry matter. 3) All data were represented as mean SEM of three independent experiments. * : a~d Different superscripts in the table indicate significant difference at the p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

3. 수용성 다당체의 성분분석

FEW에서 최적 추출 조건으로 판단된 FEW3의 수용성 다당체의 성분을 분석한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같이 대부분이 Glucose로서 약 94.93%로 이루어져 있으며 Xylose와 Fucose가 미량 존재하고 Galactose와 Mannose 등이 극미량 결합되어 있는 것으로 나타났다.

권 등¹⁵⁾은 영지버섯 자실체 다당류가 Glucose, Galactose, Mannose, Fucose, Xylose가 각각 62.5%, 20.7%, 13.9 %, 2.0%, 0.86%의 비율로 함유되어 있다고 보고 한 바 있으며, 이 등¹⁶⁾은

Glucose, Mannose, Xylose, Galactose의 순으로 많다고 보고하기도 하였다.

본 실험에 의한 결과로 미루어 볼 때 영지버섯의 수용성 다당체는 Glucose를 주요 구성당으로 하여 Xylose, Fucose, Galactose, Mannose 등이 영지버섯에 함유되어 있는 미량의 단백질과 결합하여 Hetero Glucan 형태로 이루어져 있을 것으로 판단된다. 한편 FEW의 당 성분은 효모발효 및 초음파 추출에 의한 효모 세포벽 속의 β -glucan도 일부 추출되어 전체적인 구성당의 비율에 다소간의 유의차가 생겼을 것으로 보인다.

Table 3. Compositional Sugar Analysis of Polysaccharide from Ganoderma lucidium FEW3

Sugar	Contents(%) ¹⁾
Glucose	94.93 ± 0.87 ^{3a,*}
Xylose	3.20 ± 0.70 ^b
Fucose	1.87 ± 0.21 ^c
Galactose	0.00 ± 0.00 ^{2d}
Mannose	0.00 ± 0.00 ^{2d}

1) : Area percent in HPLC chromatogram. 2) : Trace. 3) All data were represented as mean SEM of three independent experiments. * : a~d Different superscripts in the table indicate significant difference at the p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

4. 관능검사

REW와 FEW1~4의 관능적 특성의 변화를 측정된 결과는 Table 4와 같았다. 냄새, 맛, 전체적인 기호도 등 모든 항목에서 REW와 FEW1~4 시료간에 p<0.01 또는 p<0.001 수준에서 유의적인 차이를 보였는데, 발효가 진행됨에 따라 영지의 쓴맛과 냄새는 계속 감소하는 반면에 향긋하고 상큼한 냄새와 맛이 향상 및 증가 되었으며, 특히 향긋한 맛은 열수추출보다 효모발효한 시료에서 상당한 차이를 보여 p<0.001 수준에서 유의적인 차이가 나타났다. 전체적인 기호도는 48에서 72시간 발효를 한 FEW2와 FEW3가 다른 실험군과 p<0.01 수준에서 유의적인 차이를 보였다.

이상에서 살펴본 바와 같이 효모발효를 함으로써 효모가 생성하는 ethanol을 비롯한 다양한 휘발성화합물들이 부여되면서 맛, 냄새 등 전체적인 기호도가 개선되는 효과를 얻을 수 있었다. 이는 김 등¹⁷⁾과 Heath¹⁸⁾와 Furia 등¹⁹⁾이 이미 효모(Saccharomyces fermentati) 배양액에서 휘발성화합물의 조성 및 향기 성분의 특성을 분리, 동정한 바 있으며 본 실험에서도 이와 일치된 결과를 얻을 수 있었다.

Table 4. Statistical Analysis of Taste, Smell and Total Acceptability Evaluation Score between Samples

Sample	Smell		Taste		Total acceptability
	Bitter	Fragrant bitter	Bitter	Fragrant bitter	
REW	3.50 ^a	1.38 ^b	4.13 ^a	2.00 ^b	3.06 ^b
FEW1	3.13 ^{ab}	2.13 ^a	3.50 ^b	2.88 ^a	3.13 ^b
FEW2	3.00 ^{ab}	2.38 ^a	3.19 ^b	3.00 ^a	3.88 ^a
FEW3	2.38 ^b	2.33 ^a	3.19 ^b	3.00 ^a	4.13 ^a
FEW4	2.50 ^b	2.50 ^a	3.00 ^b	3.13 ^a	3.25 ^b
F value	8.65**	6.24**	8.37**	10.80***	7.58**

Means with the same letter are not significantly different(p<0.005). * : Significant at p<0.05. ** : Significant at p<0.01. *** : Significant at p<0.001

5. SOD 유사활성

SOD는 ROS(Reactive oxygen species, 활성산소종)에 대한 항산화 효소의 일종으로 강한 독성을 갖는 Superoxide radical

anion(O₂⁻)을 hydrogen peroxide(H₂O₂)와 O₂로 바꾸어 주어 세포를 보호하는 물질로 퇴행성 뇌질환, 심혈관계 질환 등 각종 질병과 관련이 있는 것으로 보고되어 있다²⁰⁾.

이러한 SOD에 대하여 pyrogallol을 이용한 SOD 유사활성을 REW와 FEW1~4에서 측정된 결과를 Table 5에 나타내었다. REW와 FEW1~4의 모든 추출물에서 SOD 활성 유사능이 있었으며 특히 FEW3과 FEW4의 추출물에서 다른 시료보다 유의적인 차이를 보여 각각 약 15.27%와 14.49%로 높게 나타났다. 따라서 영지버섯 발효추출물은 SOD-like activity 생성능에 의한 항산화능력이 뛰어난 것으로 판단된다.

Table 5. SOD-like Activity of Extracts from REW, FEW1-4

Sample	Conc(mg/ml)	SOD-like Activity(%)
REW	1	11.07 ± 0.14 ^{1d,*}
FEW1	1	12.38 ± 0.23 ^c
FEW2	1	11.88 ± 0.56 ^c
FEW3	1	15.27 ± 0.43 ^a
FEW4	1	14.49 ± 0.45 ^b

1 All data were represented as mean SEM of three independent experiments.* : a~d Different superscripts in the table indicate significant difference at the p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

6. Nitric Oxide 생성

대식세포(Macrophage)는 미생물 감염에 대한 방어기능과 항상성 유지 기능을 하며 골수에서 생성되어 혈관 내에서는 백혈구의 일종인 단핵세포(단구) 형태로, 조직 내에서는 대식세포로 존재하는 것으로 알려져 있다²¹⁾. 또한 대식세포는 T-cell에서 생성되는 Lymphokine에 의해 활성화 되어 superoxide(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂)와 같은 반응산소 중간 물질이나 NO와 같은 반응질소 중간물질을 생성하여 이물질을 분해시키고 Interleukin(IL-1, IL-6), tumor necrosis fater와 같은 cytokine 및 NO를 생산하여 종양세포구에 대한 세포특성을 나타내는 것으로 보고되어 있다²¹⁾.

NO는 매우 불안정한 free radical 중의 하나로 산소 등에 의해 NO₂, N₂O₃, nitrite(NO₂⁻)와 같은 안전한 nitrogen oxide로 바뀌진다고 보고되어 있다⁸⁾. 그리고 NO는 대식세포에 의한 식균작용 후에 Interferon 등의 자극으로 nitric oxide synthetase(NOS)가 산소와 결합하여 L-arginine을 산화시켜 생성되는 것으로 알려져 있다⁹⁾. NOS는 endothelial NOS(eNOS)와 neuronal NOS(nNOS) 같은 항상성 유지에 필요한 NO를 생성하는 것과 inducible NOS(iNOS)와 같은 염증성 인자 등에 의해 유도되는 것으로 분류되고 있다⁹⁾.

마우스 대식세포주인 Raw264.7에서 나타난 NO 생성능은 Table 6과 같다.

Table 6. Response Relationship for REW, FEW1-4 the Nitric Oxide Formation in Raw264.7 Cell Line

Sample	conc(ug/ml)	Nitric Oxide (uM)
REW	100	17.48 ± 0.56 ^{1d,*}
FEW1	100	17.13 ± 0.55 ^d
FEW2	100	18.57 ± 0.67 ^c
FEW3	100	28.72 ± 0.58 ^a
FEW4	100	20.96 ± 0.52 ^b

1) All data were represented as mean SEM of three independent experiments. * : a~dDifferent superscripts in the table indicate significant difference at the p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

FEW3는 REW와 FEW1,2,4에 비해 100 ug/ml에서 비교하였을 때 상대적으로 NO 생성능이 유의적으로 높은 것으로 나타났는데 이것으로 보아 영지버섯 추출물 중 FEW3가 암세포 독성과 대식세포의 증가 및 대식세포에 의한 식균기능이 가장 클 것으로 판단된다.

7. 암세포 성장억제

영지버섯 추출물에는 각종 생리활성 물질이 존재하고 있는 것으로 알려져 오고 있다. 특히 영지버섯의 항암성분에 대한 연구에서 영지버섯의 단백다당체는 종양에 대한 생체 방어력을 높여 간접적으로 종양세포를 저지한다고 알려져 있으며 또한 대식세포의 수를 증가시켜 각종 암세포를 사멸시킨다고 보고되어 있다⁹⁾.

버섯류의 항암효과는 Ikekawa 등²²⁾에 의하여 말굽버섯과 (polyporaceae)를 비롯한 식용균류의 자실체 열수추출물이 sarcoma180 등의 동물 이식암에 대하여 현저한 항종양 활성이 있는 것이 보고 되었으며 특히 영지버섯의 약효성분은 주로 다당류와 단백질이 결합된 polysaccharide protein complex로서 그 화학적 조성도 밝혀진 바 있으며 동물실험에서도 암세포 억제효과가 입증되기도 하였다²³⁾.

본 연구에서는 암세포에 대한 세포독성을 규명하기 위하여 섬유성 육종암 세포(HT1080, fibrosarcoma, human)을 이용하여 REW와 FEW1~4에 대한 MTT assay를 실시하여 Table 8과 같은 결과를 얻었다. 영지버섯 추출물인 REW와 FEW1~4를 1 mg/ml 첨가 시에 약 46.74%~ 62.94%의 암세포 성장 억제율을 나타내고 있으며 특히 FEW3에서 가장 높은 억제율을 나타내고 있었다.

REW와 FEW1~4의 IC₅₀을 구한 결과 FEW3의 IC₅₀ 값이 REW와 FEW 1,2,4에 비해 낮으므로 암세포 성장저해 효과가 높을 것으로 판단된다. 따라서 영지버섯의 FEW3 추출물은 암세포 성장 저해율이 높고 상대적으로 IC₅₀ 값이 낮은 것으로 보아 각종 종양 등에 대하여 항암활성이 높을 것으로 판단된다.

Table 7. MTT Assay of Extracts from REW, FEW1-4 against HT1080 Cell Line and IC₅₀ Value

Sample	Growth Inhibition rate(%) (conc : 1 mg/ml)	IC ₅₀ (ug/mL)
REW	49.40± 1.15 ^{1a)} *	434.17 ± 4.61 ^a
FEW1	46.74± 0.55 ^d	402.89 ± 0.47 ^b
FEW2	53.03± 0.27 ^c	376.84 ± 3.19 ^{bc}
FEW3	62.94± 0.83 ^b	315.63 ± 4.10 ^c
FEW4	56.80± 0.39 ^b	356.62 ± 2.50 ^{cd}

1) All data were represented as mean SEM of three independent experiments. * :a~eDifferent superscripts in the table indicate significant difference at the p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

결 론

영지버섯 효모발효 초음파 추출액(FEW)과 영지버섯 열수 추출액(REW)의 발효 및 추출방법, 추출 수율 및 수용성 다당체 함량, 다당체의 성분, 관능적 특성, SOD-like activity, 암세포 성장 저해율, IC₅₀ 값을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

FEW에 유기산(Lactic acid)과 Ethanol 등의 성분이 생성된 것을 확인 하였으며 이로 인해 pH를 낮추어 안전성과 보존성을 높여주고, 알코올에 의한 불용성 성분이 추출될 수 있음이 확인

되었다. RE방법 보다 FE 추출방법에서 추출 수율과 수용성 배당체의 함량이 유의적인 차이(P<0.05)로 더 높게 나타났다. 효모 발효 시간이 24에서 72시간 까지는 ethanol 생성, 추출 수율 및 수용성 배당체의 함량이 유의적인 차이(P<0.05)로 증가 하였으나 그 이후에는 큰 변화를 보이지 않아 효모 배양액 5% 접종시의 최적발효 조건은 27℃에서 72시간으로 확인 되었다. FEW3에 함유된 수용성 다당체는 Glucose를 중심으로 Xylose, Fucose, Galactose 및 Mannose로 구성되어 있는 것을 알 수 있었다. FEW는 효모발효로 인해 ethanol을 비롯한 다양한 휘발성 화합물들이 생성되어 영지의 쓴맛과 냄새가 감소된 반면에 향긋하고 상큼한 냄새와 맛이 부여되는 등 전체적인 관능적 특성이 개선되는 효과를 얻을 수 있었다. FEW3는 SOD-like activity가 15.27±0.43%의 높은 활성능을 나타내고 있어 항산화 활성이 있는 것으로 판단되었다. FEW3는 NO 생성능이 27.72±0.58 uM, 암세포 성장 저해율이 62.94±0.83%로 높고, IC₅₀ 값이 315.63±4.10 ug/ml로 상대적으로 낮은 값을 나타내고 있어 각종 항암활성 및 생리활성 기능이 있는 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. 정승용, 김성애, 김성희, 김한수, 김군자, 김희숙, 정효숙. 영지열수추출액이 식이성 고콜레스테롤 혈증 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 19(2): 180-186, 1990.
2. Kikuchi, T., Kanomi, S., Kadota, S., Mural, T., Yubono, K., Ogita, Z. Chem Pharm Bull 34: 4030-4403, 1986.
3. 김선환. 버섯의 문헌에 의한 영양학적 고찰. 중부대학교 자연과학논문집 8(1):33-41, 1999.
4. 권석형, 김춘년, 김철용, 권석태, 박기문, 황보식. 버섯 균사체에 의한 암세포 성장 억제 효과. 한국식품영양학회지 16(1): 15-21, 2003.
5. 강소신의학원 편. 중약대사전. 상해, 상해과학기술출판사, pp 1180-1182, 1978.
6. 김병각, 정희수, 정경수, 양문식. 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구. 한국균학회지 8(2):107-113, 1980.
7. Mizuno, T., Kato, N., Totsuka, A., Takenaka, K., Shinkai, K., Shimizu, M. Fractionation structural features and antitumor activity of water soluble polysaccharide from "Reishi", the fruit body of Ganoderma lucidium. Nippon Noegeikagaku Kaisi 58(9):871-880, 1984.
8. 강창을, 심미자, 최웅철, 이영남, 김병각. 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구 - 만년 버섯의 균사 배양 및 항암성분. 한국생화학학회지 14(2):101-112, 1981.
9. 김성환, 김을상, 김영식. 영지에서 분리한 항암성 다당체에 관한 연구. J. Korea, Soc, Food Nutr; 24(1):147-153, 1995.
10. 김명자, 김하원, 이영순, 심미자, 최웅철, 김병각. 영지의 안전성에 관한 연구. 한국균학회지14(1):49-59, 1986.
11. Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y., Hayashi, T. Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of

- Ganoderma lucidum fruit bodies. *Planta Med* 51: 339-340, 1985.
12. 박기문, 강국희, 최윤주, 이재영. 발효 유제품에 있어서 유산균과 효모의 상호 작용. 한국미생물생명공학회 학술대회지, pp 246-247, 1979.
 13. 박정훈, 강만식, 김홍일, 정봉현, 이광호, 문원국. 효모 변이주 *Saccharomyces cerevisiae*182 세포벽 유래의 β -glucan 면역활성능에 관한 연구. 한국식품과학회지 35(3):488-492, 2003.
 14. 정현식, 윤광섭. 마이크로파, 초음파 및 볶음 전처리가 오가피의 열수추출 특성에 미치는 영향. 한국식품저장유통학회지 12(2):146-150, 2005.
 15. 권형철, 김정수, 최기철, 최동성, 송창원. 영지버섯의 항암효과 : 세포독성과 종양의 성장억제에 미치는 영향(1). 대한방사선종양학회지 12(3):301-305, 1994.
 16. 이준우, 정훈, 정철희, 이권행. 영지 균사체의 알칼리 추출물이 보체계와 망내계에 미치는 영향. 한국균학회지 18: 137, 1990.
 17. 김혜자, 양차범, 강상모. 김치로부터 분리한 효모가 생산하는 휘발성화합물이 김치의 풍미에 미치는 효과. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol* 24(4):512-518, 1996.
 18. Heath, H.B. *Flavor Technology: Profiles, Products, Applications*, AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, USA, pp 199 - 207, 1978.
 19. Furia, T.E., Bellanca, N. *Handbook of flavoringredients*. Vol.II, CRC press, Ohio, USA, 1975.
 20. Salim, A.S. Oxygen-derived free radicals and the prevention of duodenal ulcer relapse, *AM J Med Sci*; 300: 1-8, 1990.
 21. Bendtzen, K. Interleukin1, Interleukin6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol. letters* 19: 183-192, 1988.
 22. Ikekawa, T., Nakamishi, M., Uehara, N., Chihara, C., Fukuoka, F. Antitumor action of some basidiomycetes especially *phellinus*. *Linteus Gann*. 59: 155-157, 1968.
 23. Kim, S.W. Studies on anti-microbial and anti-cancer functions of polysaccharide extracted *Ganoderma lucidium*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 1183-1188, 1998.