韓藥作誌(Korean J. Medicinal Crop Sci.) 18(3) : 135 – 142 (2010)

상황 균사체 배양에 의한 파삼의 항암 활성 증진

하지혜* · 정명훈* · 서용창* · 최운용* · 정헌상*** · 정재헌**** · 유광원**** · 이현용*,**†

*강원대학교 BT특성화학부대학, **강원대학교 생명공학연구소,
***충북대학교 식품공학과, ****충주대학교 식품생명공학과

Enhancement of Anticancer Activities of Low Quality Ginseng by *Phelinus linteus* Fermentation

Ji Hye Ha*, Myeong Hoon Jeong*, Yong Chang Seo*, Woon Yong Choi*, Heon Sang Jeong*, Jae Hyun Jung***, Kwang Wan Yu**** and Hyeon Yong Lee*,**†**

**College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.*
***Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.*
****College of Agriculture, Life & Enviroent Sience, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea.*
*****Department of Food and Biotechnology, Chungju National University, Chungju 380-702, Korea.*

ABSTRACT : Low quality fresh ginseng was fermented by *Pheliuus linteus* mycelium at 22℃ for 30 days, then extracted by water solvent at 100℃ for 180 min. On human normal cell lines (HEK293), cytotoxicity was about 10% lower in adding extracts of the fermentation ginseng than that from low quality ginseng. The fermented extracts also inhibited the growth of several human cancer cells. Among them, respectively, digestive organs related cancer cells, such as human stomach adenocarcnioma and human epithelial adenocarcinoma were most effectively inhibited up to 85% and 90%, respectively. Then, selectivities were in the ranges of 3 to 5, compared to 2 to 3 from low quality fresh ginseng. Generally, fermented ginseng extract showed higher anticancer activities as well as higher DPPH radical sacavening activity, possibly due to high contents of total phenolic components as 6.96 ㎎/g. It was very interesting that the fermented ginseng contained very higher contents of ginsenoside-Rc+Rb_2, compared to others in low quality fresh ginseng because of partition digestion of mycelium growth. The results can tell that low quality fresh ginseng can be utilized by the fermentation with *Pheliuus linteus* mycelium.

Key Words **:** Low Qualtiy Fresh Ginseng, Anticancer Activity, *Phelinus linteus* Mycelium

서 언

인삼 (*Panax ginseng* C.A. Mayer)은 수천 년간 사용되어진 대표적인 약용식물로서 오갈피나무과 (Araliaceae)에 속하는 다년생 초본류로 triterpenoid saponins을 비롯한 polyacetylenes, phenolic compounds, polysaccharide, peptidoglycans 등의 성분을 함유하고 있다 (Attele *et al*., 1999). 또한 ginsenoside를 중심으로 많은 연구가 이루어지기 시작하여 면역증강 (Rivera *et al*., 2005), 암세포 증식 및 전이 억제 작용 (Lee *et al*., 1999), 항스트레스 (Kim *et al*., 2003), 항산화 (Kim *et al*., 2002), 기억 및 학습 능력 증진 (Wang *et al*., 2010) 등의 여러 가지 약리작용이 과학적으로 입증됨에 따라 동양 한방 뿐 아니라 현대의학에서도 의약품 및 기능성 보조식품으로 그 수요가 증가하고 있다.

이러한 필요로 인해 인삼의 가공형태는 매우 다양하게 개발되고 있지만 그 동안 인삼에 대한 효능 연구는 대부분 홍삼 및 백삼 위주로 이루어져 왔으며, 수삼을 이용한 기능성 제품 개발 및 연구는 매우 미미한 실정이다. 인삼은 크게 수삼 및 1차 가공제품인 홍삼과 백삼으로 공급이 이루어진다. 하지만 채굴, 운반 및 관리 과정에서 부러지거나 상처를 입어 그 형태가 불완전하여 상품으로서 품질요건에 부합하지 못하는 파삼은 홍삼 및 백삼으로 가공이 어렵기 때문에 지닌 약리적 효과에 비하여 저가에 공급되는 상태이다.

반면 최근 새로운 식량자원의 개발과 유용물질의 생산을 위해 질병의 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물로서 버섯류의 이용에 대한 연구가 이루어지고 있으며 기능성 식품 소재 및 각종 생리활성을 나타내는 신약개발 소재로써 큰 관심을 받고 있다. 버섯류는 일반적으로 고분자 다당체, 단백질, 아미노산,

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr
Received 2010 March 24 / 1st Revised 2010 April 26 / Accepted 2010 May 11

비타민, 미네랄, 무기질 등과 같은 인체에 중요한 각종 성분을 함유하고 있으며 (Genccelep *et al*., 2009), 약용버섯의 약리적 효능으로는 면역증강 작용에 의한 항암효과 (Liu *et al*., 1999; Ronald Han *et al*., 2009) 이외에도 간 기능 개선효과 (Lau *et al*., 2002), 혈중 콜레스테롤 저하 효과 (Jeong *et al*., 2010), 항산화 효과 (Wang *et al*., 2009) 등이 있다. 특히 버섯류에 면역증강 작용에 의한 항암 활성을 갖는 성분이 β-D-glucan 구조를 갖는 단백 다당체로 밝혀지면서 약용버섯 유래 의약품 및 약용버섯 가공 기능성 식품은 큰 규모의 시장을 형성하고 있다 (Manzi *et al*., 2004). 상기의 내용과 같이 현재 식용 또는 약용으로 사용되는 것은 대부분 자실체로서 버섯에 대한 연구는 주로 자실체에 대한 연구가 많이 이루어져 왔다. 하지만 자실체를 포함한 버섯 재배가 장시간 걸리는데 비해 버섯 균차체는 대량배양을 통해 쉽게 얻을 수 있고 단백질 함량이 높고 아미노산 조성 면에서도 영양학적으로 가치가 있어 이러한 식이버섯 배양에 근거를 둔 기술은 앞으로 새로운 식품자원으로서 유망한 기대를 받고 있다 (Jang *et al*., 2005). 또한 버섯 균사체는 자실체에 비해 4배 정도 높은 각종 영양소와 50~60배 높은 약리활성을 함유하고, 균사의 활력이 강하여 단기간 배양에 따른 높은 수율을 얻을 수 있으며 배양 후 특정 생리활성물질의 추출이 용이한 장점으로 인하여 버섯균사체와 액체배양액이 건강보조식품의 원료로서의 개발이 활성화 되고 있다 (Cho *et al*., 2006). 본 연구에서 사용한 상황버섯은 항암면역 증강제로서 부작용이 없어 간접적인 항암제로서의 역할과 높은 항염증, 항산화 효과도 보고된 바 있다 (Kim *et al*., 2004; Kim *et al*., 2004; Song *et al*., 2003).

본 연구에서는 상품성이 떨어지는 파삼을 기질로 하여 생리활성 작용이 좋은 버섯 균사체를 접종시켜 배양하였다. 이러한 발효로 인해 고분자 구성성분과 연결되어 있어 인체 내 흡수 시 수용 정도가 비효율적이며, 체내 흡수가 용이하지 못하여 물리, 화학적인 작용이나 미생물에 의한 분해가 필요하였던 인삼의 주요 활성성분인 ginsenoside의 생물학적 변환을 유도하여 인삼 본래의 유용 성분의 약리적 효과가 증가되거나 또는 버섯과 인삼의 생리활성 성분 간의 시너지 효과로 인해 새로운 생리활성 성분의 창출에 기인한 생리활성 증진효과를 기대하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출방법

음성 인삼 연구소에서 2008년에 재배된 4년근 파삼을 지원받아 음지의 서늘한 곳에서 자연 건조시켜 수분함량을 70%로 조절한 후 균사의 생육 영양원 5~15%를 첨가하여 고압멸균하였다. 상황버섯 액체 종균을 상기 제조된 인삼 기질 표면에 5~10% 고르게 분무하여 접종시킨 다음 22~23℃, 습도 70%에서 30일 동안 발효시킨 고체 발효물을 충주대학교로부터 지원받았다. 제공받은 발효인삼을 적당한 크기로 자른 후 추출에 사용하였다. 본 연구에서 시행된 열수 추출은 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 플라스크에 시료 중량의 10배수 증류수를 용매로 100℃에서 60분 추출을 3회 반복하여 추출하여 회전감압 농축기 (Rotary vaccum evaporator N-N series, Eyela, Tokyo, Japan)로 여과 후 감압 농축과 동결건조를 거쳐 용매를 완전히 제거한 파우더 상태의 추출물을 실험에 사용하였다.

2. 시약 및 세포주

본 연구의 세포배양 시 사용되는 RPMI1640 (Roswell park memorial institute medium)배지와 FBS (Fetal bovine serum)은 GIBCO (Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하였으며, Hepes buffer, Gentamycin sulfate, Trypsin-EDTA는 SIGMA (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Ginsenoside 분석에 사용한 Standard는 아름사이언스 (Yongin, Korea)로부터 구입하여 사용하였다.

정상세포에 대한 독성은 인간 신장세포인 HEK293 (Human embryonic kidney cell, ATTC, Manassas, USA)을 통해 측정하였으며, 항암활성을 평가하기 위한 암세포주로는 인간 유래 위암세포인 AGS (Human stomach adenocarcinoma, ATTC, Manassas, USA), 대장암세포인 Caco-2 (Human epithelial adenocarcinoma, ATTC, Manassas, USA), 유방암세포인 MCF-7 (Human breast adenocarcinoma, ATTC, Manassas, USA), 폐암세포인 A549 (Human lung carcinoma, ATTC, Manassas, USA)를 이용하였다. 상기의 인간 전과립 세포의 배양은 37℃, 5% CO_2 조건하에서 10% heating inactivated FBS를 포함한 RPMI1640 배지를 이용하여 4~5세대 계대 배양 후 실험에 사용하였다.

3. 정상세포 독성 및 항암활성 측정

SRB assay (Doll and Peto, 1983)는 세포의 단백질 염색을 통해 세포 증식 및 독성 정도를 평가하는 방법으로 실험에 앞서 상기 세포의 농도를 $4\sim5 \times 10^4$ cells/㎖가 되도록 조절하여 96 well plate의 각 well에 100 ㎕ 씩 분주한 후 24시간 동안 배양 (37℃, 5% CO_2 incubator)하였다. 상황버섯 균사체에 의해 발효된 파삼과 일반 파삼 추출물의 최종 농도를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ㎎/㎖로 조절하여 각각 100 ㎕ 씩 첨가한 후 48시간 배양하였다. 상등액을 제거하고 4℃, 10% (w/v) TCA (Trichloroacetic acid) 100 ㎕을 가하여 4℃에서 1시간 동안 정치한 후 증류수로 5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온 건조하였다. 건조된 plate의 각 well에 1% (v/v) acetic acid로 녹인 0.4% (w/v) SRB 용액을 100 ㎕ 씩 첨가하여 상온에서 30분 동안 염색시킨 후 결합되지 않은 SRB 염색액 제거를 위해 1% acetic acid로 4~5회 세척한다. 실온에서 완

전히 건조한 후 10 mM Tris buffer 100 ㎕를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 ㎚에서 Microplate reader (THERMO max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하여 정상세포에 대한 독성 및 암세포에 대한 생육억제 활성을 계산하고, 각각의 시료 농도에서 정상세포에 대한 세포독성에 대한 암세포 생육 억제 활성비를 Selectivity로 나타내었다.

$$\text{Selectivity} = \frac{\text{암세포 생육 억제 활성}}{\text{정상 세포의 세포 독성}}$$

4. DPPH free radical 소거 활성 측정

항산화 활성 측정법 중의 하나인 DPPH 전자공여능 자유라디칼 소거 활성측정 방법을 통해 발효삼 추출물의 항산화 효과를 평가하였다 (Blois, 1958). DPPH는 안정한 free radical로서 이 홀전자로 인해 상자성 (Paramagnetism)을 띄게 되며 전자나 hydrogen radical을 받아들여 안정화시키기 쉽다. 또한 그 홀전자 때문에 517 ㎚ 근처에서 강한 흡수가 일어나기 때문에 용액은 짙은 보라색을 띈다. DPPH (α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl) radical에 대한 소거활성은 Blois 등의 방법을 약간 변형하여 실험하였다. 용매를 Ethanol로 하여 제조한 0.1 mM DPPH 용액 1 ㎖과 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ㎎/㎖의 농도로 조절된 상황버섯 균사체에 의해 발효된 파삼과 일반 파삼 추출물을 0.5 ㎖ 혼합하여 25℃에서 20분 동안 암실에 방치 한 후 525 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 대조구에 대한 시료 첨가구의 흡광도를 비교하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\textit{DPPH radical sacavening activity (\%)} = \frac{\textit{Control O.D} - \textit{Sample D.D}}{\textit{Control O.D}} \times 100$$

5. 파삼의 Ginsenosdie 분석

상황버섯 균사체에 의해 발효된 파삼과 일반 파삼 추출물의 Ginsenosdie 성분을 HPLC (High performance liquid chromatography)를 이용하여 분석하였다. HPLC 분석을 위해 시료를 수포화 부탄올 추출법을 통해 전처리한 후 Methanol에 충분히 용해시켜 0.45 ㎛ Filter로 여과한 다음 시료 주입량을 20 ㎕로 하여 ginsenosdie를 분석하였다. Ginsenoside 분석에 사용된 HPLC는 Alltech binary gradient HPLC system model 627 (Alltech associateds, Inc., USA)이며, Column은 Prevail carbohydrate ES 5 μ, 250 × 4.6 ㎜, detector는 ELSD 2000ES (203 ㎚)을 사용하였다. 이동상으로는 Acetonitrile, Water, Isopropylalcohol를 사용하여 Solvent A는 acetonitrile : water : isopropylalcohol을 80 : 5 : 15로 solvent B는 67 : 21 : 12의 비율로 solvent B의 비율을 10%, 85%, 80%, 90%, 100%, 25% 그리고 10%로 순차적으로 조절하여 전개를 진행하였으며, 0.8 ㎖/min의 유속으로 흘려주었다 (Han *et al*., 2005).

6. 총 페놀 측정

총 페놀의 함량은 Folin-Denis 방법에 의하여 비색정량하여 측정하였다. 분말형태의 상황버섯 균사체에 의해 발효된 파삼과 일반 파삼 추출물을 메탄올에 10 ㎎/㎖로 용해한 용액 1 ㎖과 Folin 시약을 1 ㎖을 혼합한 뒤 3분간 정치하여 발색시킨 후 1 ㎖의 10% Sodium carbonate 용액을 서서히 가하였다. 이 혼합액을 90분간 정치한 후 Microplate reader를 사용하여 760 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량을 측정하기 위해 Gallic acid를 사용하여 구한 검량선을 이용하여 당량으로 환산하여 시료 중의 총 페놀 함량을 구하였다 (Cicco *et al*., 2009).

7. 통계처리

Microsoft excel의 student *t*-test에 의해 유의성을 검정하였다. 또한 각 실험 결과는 triplicate determinations에 의한 Mean ± standard deviation (SD)로 표시하였으며, 각 평균치 간의 차이는 student *t*-test에 의해 $P < 0.001$, $P < 0.005$, $P < 0.01$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 정상세포에 대한 세포독성

상황버섯 균사체로 발효시킨 발효삼의 인간 신장 세포 HEK293을 이용한 정상세포에 대한 세포독성을 측정한 결과는 Fig. 1에 나타냈다. 수삼 및 발효삼 추출물의 첨가로 인해 세포독성은 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 최고농도인 1.0 ㎎/㎖에서 일반 수삼 추출물이 30.09 ± 0.15%의 세포독성을 나타낸 반면, 상황버섯 균사체로 발효시킨 발효삼은 25.83 ± 0.21%를 나타내었으며 일반 수삼에 비하여 발효삼의 세포독성이 전 농도에 걸쳐 2.0~4.3% 낮게 나타났다 ($P < 0.05$). 이러한 결과를 통해 균사체를 통한 발효가 세포독성을 유발하는 성분을 분해 및 파괴함으로써 파삼의 세포독성을 저감시키는데 기여한다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 상기 두 가지 추출물 모두 최대 농도인 1.0 ㎎/㎖에서 정상세포 생존율을 70% 이상 유지시키는 것으로 확인된 바, 이는 발효삼 추출물이 인간 유래 정상세포에 대한 안정성을 유지한다고 할 수 있다.

2. 암세포에 대한 항암 활성

상황버섯 균사체로 발효시킨 발효삼의 항암활성을 평가하기 위해 인간 유래 위암 세포주인 AGS, 대장암 세포주인 Caco-

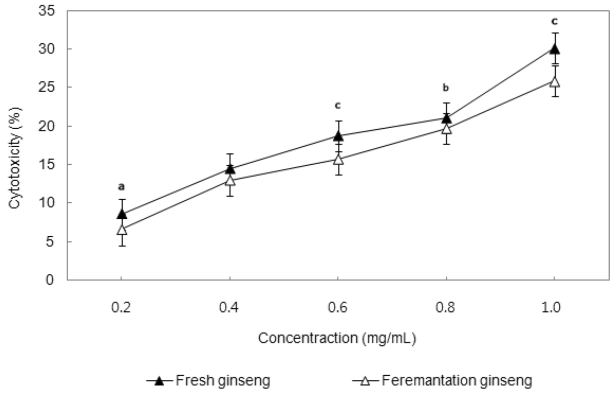

Fig. 1. Cytotoxicity of the extracts from fresh ginseng and *P. linteus* mycelium fermented ginseng on human embryonic kidney cell, HEK293. *Each value were compared with control at $^{a}P < 0.001$, $^{b}P < 0.005$, $^{c}P < 0.01$ by student t-test. *Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown.

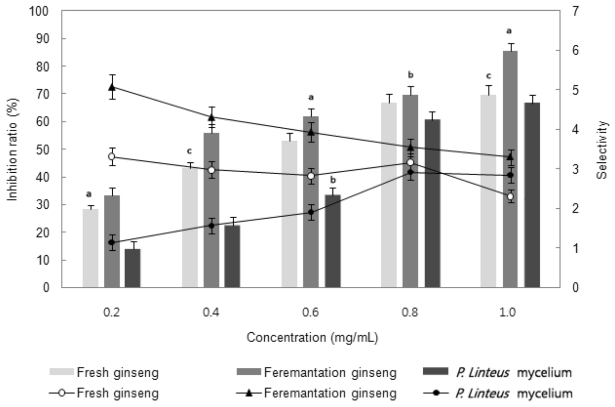

Fig. 2. Inhibition effects (bar chart) of fresh ginseng and *Plinteus* mycelium fermented ginseng extracts on human stomach adenocarcinoma cell (AGS) and there selectivities (line chart). *Each value were compared with control at $^{a}P < 0.001$, $^{b}P < 0.005$, $^{c}P < 0.01$ by student t-test. *Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown.

2, 폐암 세포주인 A549와 자궁암 세포주인 MCF-7을 이용하여 농도별 추출물 첨가에 따른 암세포 저해 활성 및 선택적 사멸도를 측정하였다.

인간 유래 소화기계 암세포 주에 대한 농도별 발효삼 추출물의 항암활성을 평가하기 위해 인간 유래 위암 세포인 AGS에 대한 항암활성을 평가였다. 위암 세포에 대한 생육저해 활성과 selectivity를 측정한 결과 (Fig. 2) 전반적으로 추출물의 첨가를 통해 암세포 생육 억제활성은 농도 의존적으로 증가하는 데 반해 selectivity는 감소하는 경향을 나타내었다 ($P < 0.05$). 일반 수삼 추출물이 최고농도 1.0 ㎎/㎖에서 69.62 ± 1.39%의 암세포 생육 억제 활성을 나타낸 반면, 발효삼 추출물이 동일한 농도에서 85.37 ± 1.71%로 약 16% 증가한 활성을 나타내었다. 또한 selectivity 또한 전 농도에 걸쳐 발효삼 추출물이 높았으며 0.2 ㎎/㎖ 에서 5.08로 가장 높은 selectivity를 나타내었다. 반면 상황버섯 균사체 추출물은 최고농도 1.0 ㎎/㎖에서 66.51 ± 1.33%의 암세포 생육억제 활성과 최고 2.92의 selectivity를 나타내며, 수삼 및 발효삼 추출물에 비해 비교적 낮은 항암활성을 나타내었다 ($P < 0.05$). 이를 통해 발효삼의 활성이 균사체 자체에 기인한 활성이 아닌 수삼과 균사체 발효를 통해 그 활성이 증진된 것임을 확인할 수 있다. 최근 소화기계 위장관암의 한 종류인 인간 유래 위암세포 (AGS)를 포함한 많은 종양세포가 정상세포에 영향을 주지 않으면서 암세포와 같은 형질변형 세포의 apoptosis를 유도하는 TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)에 대한 저항성을 획득하고 있는 것으로 보고됨에 따라 효율적인 암치료 방법을 요구되는 동시에 정상세포에 대한 세포독성을 지니지 않는 천연물의 이용이 해결방안으로 제시되고 있다 (Lee *et al*., 2008). 따라서 상기 연구 결과 특정 암에 대한 높은 항암활성을 가지는 동시에 암세포에 대한 선택적 사멸율이 높은 발효삼이 항암 기능성 소재로서 높은 부가가치를 갖을 수 있을 것으로 사료된다.

Table 1은 발효삼 추출물의 첨가를 통해 전반적으로 높은 항암활성을 나타낸 특정 농도 범위에서의 대표적인 소화기, 호흡기, 순환기계 인간 유래 암세포에 대한 항암활성을 나타낸 것이다. 소화기계 암세포주인 AGS에 대하여 일반 수삼 추출물이 0.8 ㎎/㎖의 농도에서 66.68%의 암세포 생육 억제 활성과 3.17의 selectivity를 나타낸 것에 비교하여 발효삼이 동일한 농도에서 69.78%의 더 높은 암세포 생육 억제 활성과 3.54의 selectivity를 나타내었다. 또한 발효삼 추출물의 경우 0.6 ㎎/㎖의 농도에서 3.94의 매우 높은 selectivity를 나타내어 수삼 추출물에 비해 더 낮은 농도에서 더 효과적인 항암활성을 확인할 수 있었다. 호흡기계 암세포주인 A549에 대하여 일반 열수 추출물이 0.8 ㎎/㎖의 농도에서 50.61%의 암세포 생육저해 활성과 2.40의 selectivity를 나타낸 반면, 발효삼의 경우 동일 농도에서 56.27%의 암세포 생육저해 활성과 2.86의 selectivity를 나타내었으며 0.6 ㎎/㎖ 의 농도에서 3.17의 selectivity를 나타내어 저농도에서 높은 암세포 선택적 사멸율과 동시에 수삼 추출물에 비해 낮은 농도에서도 효과적인 항암활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 순환기계 암세포주인 MCF-7에 대하여 일반 수삼 추출물이 0.8 ㎎/㎖ 의 농도에서 60.63%의 암세포 생육 억제 활성과 2.88의 selectivity를 나타내었다. 발효삼이 동일한 농도에서 66.33%의 더 높은 암세포 생육 억제 활성을 나타내었지만 상기 농도에서의 selectivity는 2.53으로 수삼의 selectivity에 미치지 못하는 것으로 나타났다. 하지만 0.6 ㎎/㎖ 의 농도에서 비교하였을 경우 수삼 추출물의 암세포 생육 억제 활성과 동시에 selecitvity도

Table 1. Inhibition of several cancer cell growth by adding 0.6 and 0.8 ㎎/㎖ of the extracts fresh ginseng, *P. linteus* mycelium fermented ginseng.

Cell line	Sample	Fermented ginseng		Fresh ginseng	
	Conc. (㎎/㎖)	0.6	0.8	0.6	0.8
AGS	Inhibition ratio (%)	61.83 ± 1.73*	69.78 ± 3.03***	53.05 ± 2.66**	66.68 ± 3.49****
	Selectivity	3.94 ± 0.88*	3.54 ± 0.82	2.84 ± 0.67*	3.17 ± 0.59
Caco-2	Inhibition ratio (%)	50.11 ± 1.73	70.37 ± 3.07***	28.77 ± 1.54**	51.26 ± 2.10
	Selectivity	2.49 ± 0.40	2.69 ± 0.47	2.09 ± 0.32	2.44 ± 0.61**
A549	Inhibition ratio (%)	49.74 ± 1.70*	56.27 ± 2.01	34.87 ± 1.64	50.61 ± 1.78
	Selectivity	3.17 ± 0.77	2.86 ± 0.61	1.86 ± 0.30*	2.40 ± 0.59
MCF-7	Inhibition ratio (%)	52.34 ± 1.94	66.33 ± 2.15*	34.53 ± 2.11	60.63 ± 3.02**
	Selectivity	2.60 ± 0.44**	2.53 ± 0.46	2.51 ± 0.57*	2.88 ± 0.56***

*Each value were compared with control at $^{*}P < 0.001$, $^{**}P < 0.005$, $^{***}P < 0.01$ by student t-test. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown.

높은 것을 확인할 수 있었다. 인간 유래 암세포주들에 대한 항암활성을 기관별로 비교하였을 경우 호흡기계, 순환기계에 비해 소화기계 암세포주에 대해서 높은 암세포 생육 억제 활성을 나타내었으며, selectivity 또한 약 3~4 이내로 가장 높은 항암 활성을 확인할 수 있었다. 인삼박을 기질로 배양한 상황, 영지버섯 등의 균사체가 간암세포에 대한 생육 억제활성을 가지며 Sarcoma-180 고형암의 성장을 65%까지 억제한다고 보고된 바와 같이, 본 연구의 균사체를 통한 파삼 발효물의 높은 항암 활성이 인삼 성분과 버섯 균사체의 시너지 효과에 기인한 것임을 짐작 할 수 있다 (Park *et al*., 2005).

3. DPPH free radical 소거 활성

생체 내의 대사 활동에 의한 활성 산소의 과잉 생성은 인체의 효소 및 단백질, DNA 등의 손상을 가져오고 최근 연구에 의하면 이러한 과잉 공급된 활성 산소로 인해 유전자를 손상시키는 암의 개시 단계뿐만 아니라 촉진 단계에서도 작용하여 발암의 원인이 되는 것으로 알려졌다 (Park and Kim, 1998). 따라서 이러한 활성 산소를 조절하여 암 예방에 중요한 방어기작으로 작용할 수 있는 항산화 소재에 대한 연구가 필요하다고 사료된다. DPPH 전자 공여능 측정에 사용된 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)은 짙은 자색을 띄는 비교적 안정한 free radical로 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여 환원되는데 이러한 radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 radical에 대한 소거 활성을 기대할 수 있다. 이에 상황버섯 균사체로 배양시킨 발효삼의 DPPH radical 소거활성을 농도별로 측정하여 일반 수삼 추출물 및 상황버섯 균사체와 비교한 결과, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 수삼 열수 추출물이 최고 농도 1.0 ㎎/㎖에서 49.69 ± 0.45%의 활성을 나타낸 것과 비교하여 발효삼 추출물이 동일한 농도에서 66.39 ± 0.60%로 더 높은 DPPH 전자 공여능을 나타내었다

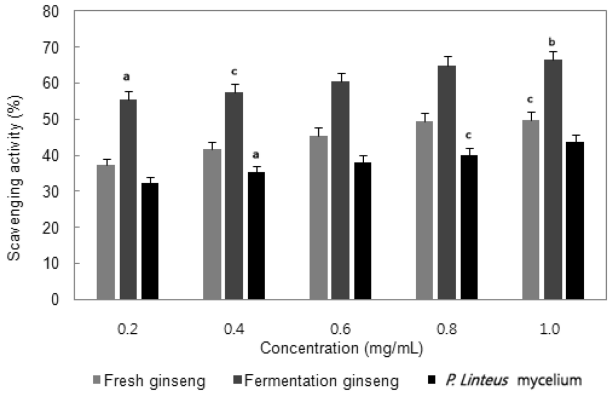

Fig. 3. Comparison of DPPH electron donating ability of *P. linteus* mycelium, fermented ginseng and fresh ginseng extracts. *Each value were compared with control at $^{a}P < 0.001$, $^{b}P < 0.005$, $^{c}P < 0.01$ by student t-test. *Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown.

($P < 0.05$). 이러한 높은 DPPH radical 소거능을 보이는 물질 중 DPPH radical과 최적의 반응을 보이는 폴리페놀 성분과 같은 hydroxyl group을 포함하는 화합물이 존재한다는 연구결과 (Chen and Ho, 1997)에 비추어 보아, 상황버섯 균사체를 이용한 발효 공정 중 수삼 중의 폴리페놀류와 플라보노이드 화합물이 증가되어 항산화 활성에 기여한 것으로 사료된다. 또한 상황버섯 균사체 추출물이 동일한 농도에서 43.68%의 활성을 나타내는 것으로 미루어 보아, 이러한 항산화 활성이 기존의 상황버섯 균사체에서 기인되는 것이 아닌, 균사체를 통한 수삼 발효 공정의 시너지 효과라 결론지을 수 있다.

4. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 단백질

Table 2. Total phenol compound contents in *P. linteus* mycelium, fermented ginseng and fresh ginseng extracts.

	Total phenol compound (㎎/g)
Phelinus linteus mycelium	5.24 ± 0.33**
P. linteus fermented ginseng	6.96 ± 0.42**
Fresh ginseng	6.28 ± 0.49**

*Each value were compared with control at *$P < 0.001$, **$P < 0.005$, ***$P < 0.01$ by student t-test. *Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown.

등의 거대분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화 효과 등의 생리활성 기능을 가지고 있다고 알려져 있다 (Lee *et al*., 2008). 지금까지 인삼에서 확인된 페놀성 성분들에서는 salicylic acid, vanilic acid, cinnamic acid, ρ-hydroxybenzoic acid, vallic acid, gentisic acid, maltol, caffeic acid 등이 보고되고 있으며, 이들 페놀성 성분들은 인체 대사에 있어 생체 중 지질, 단백질 및 핵산 등의 성분의 산화를 방지하는 항산화 활성 즉 지질 과산화 억제에 관련이 높은 것으로 알려져 있으며 그 밖에 인삼의 약리 효능을 이해하는데 도움을 준다 (Han *et al*., 1981). 따라서 상황버섯 균사체로 발효된 수삼의 페놀 함량 변화가 생리활성에 기초적인 요인이 될 수 있으므로 일반 수삼과 발효삼의 총 페놀 함량을 측정하여 Table 2에 비교하였다. 일반 수삼의 경우 6.28 ㎎/g, 발효삼의 경우 6.96 ㎎/g로 발효삼이 일반 수삼에 비해 약 10.83% 총 페놀 함량이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한 상황버섯 균사체의 총 페놀 함량을 측정한 결과 5.24 ㎎/g으로 나타나 발효삼의 높은 페놀 함량이 상황버섯 균사체로부터 기인된 것이 아닌 균사체가 수삼을 발효하는 공정에서 증가한 것을 확인할 수 있었다.

5. Ginsenosdie 분석

Fig. 4는 상황 균사체를 이용한 수삼 발효물의 열수 및 초음파 추출 공정을 통한 추출물의 HPLC 분석 결과로, 수삼 열수 추출물을 대조군으로 정하여 상황 버섯을 이용한 발효삼을 일반 수삼 추출물과 비교함으로써 균사체 발효를 통한 수삼에 존재하는 유용성분의 증감 및 본래 수삼에 존재하지 않던 성분의 생성 유무를 알아보았다.

본 실험에서 분석한 ginsenoside는 Protopanaxadiol (PPD) 계열의 ginsenoside인 Re, Rf, Rg_1, Rg_2, Rh_1와 protopanaxatriol (PPT) 계열의 ginsenoside인 Rb_1, Rb_2, Rc, Rd, Rg_3, Rh_2 모두 총 12종의 ginsenoside로 수삼 추출물의 ginsenoside와 비교하여 상황 버섯 균사체를 이용하여 배양시킨 발효삼의 ginsenoside 중 Rh_2, Rh_1, Rg_3, Rf가 각각 205.89, 301.71, 209.91, 627.39 ppm을 나타내며 약 50~90% 증가하는 결과를 나타내었다.

특히 Rh_2, Rh_1, Rg_3는 홍삼에 미량 존재하는 ginsenoside로

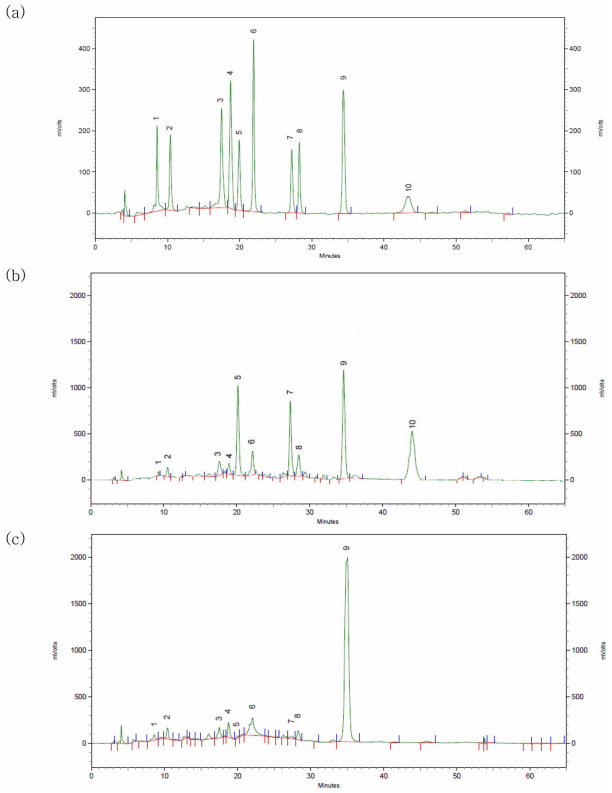

Fig. 4. Analysis for the fresh ginseng and *P. linteus* mycelium fermented ginseng extracts (1, Rh_2; 2, Rh_1; 3, Rg_2; 4, Rg_3; 5, Rg_1; 6, Rf; 7, Re; 8, Rd; 9, Rc+Rb_2; 10, Rb_1). (a) ginsenoside standard, (b) fresh ginseng extracts, (c) *P. linteus* fermented ginseng.

서 매우 높은 암세포 생육 억제 및 사멸 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다 (Lee *et al*., 2003; Lee *et al*., 1996; Cu *et al*., 2009). 특히 발효삼 추출물의 ginsenoside Rc+Rb_2가 13402.38 ppm으로 일반 수삼에 비해 약 3배 정도 증가되어 생성된 것을 확인할 수 있는데, 이러한 결과는 버섯 균사체를 이용한 발효삼의 연구 목적에 부합하는 결과로서 의미있는 결과이며 향후 이러한 발효를 통한 목적하는 유용 생리활성 성분의 증대 및 생성에 관한 연구가 계속적으로 진행되어야 한다고 사료된다. 그러나 이외의 ginsenosides에서는 발효를 통한 유의적인 증가를 확인할 수 없었으며 오히려 큰 폭으로 감소하는 결과를 보였다. 이를 통해 균사체 발효를 통해서 ginsenosides에 변화가 있었음을 미루어 짐작할 수 있다.나 이러한 결과가 ginsenosides의 구조적 변환으로 인해 다른 ginsenosides의 생성을 유도하는지 또는 다른 성분으로의 변환없이 분해되어 파괴되는지 향후 발효를 통한 각 개별 ginsenosides의 변환 기작에 대한 연구가 더욱 구체적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구논문은 2010년도 농촌진흥청에서 시행한 바이오그린21 (과제번호 : 20080401034)사업의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

Attele AS, Wu JA and Yuan CS. (1999). Ginseng pharmacology: Multiple constituents and multiple actions. Biochemical Pharmacology. 58:1685-1693.

Blois MS. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 181:1199-1200.

Chen JH and Ho CT. (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 45:2374-2378.

Cho EJ, Oh JY, Chang HY and Yun JW. (2006). Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. Journal of Biotechnology. 127:128-140.

Cicco N, T.Lanorte M, Paraggio M, Viggiano M and Lattanzio V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive folin-ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchemical Journal. 91:107-110.

Cu Y, Wang GJ, Sun JG, Jia YW, Wang W, Xu MJ, Lv T, Zheng YT and Sai Y. (2009). Pharmacokinetic characterization of ginsenoside Rh2, an anticancer nutrient from ginseng, in rats and dogs. Food and chemical Toxicology. 47:2257-2268.

Doll and Peto R. (1983). The cause of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United states today. Journal of the National Cancer Institute. 66:1191-1308.

Rivera E, Pettersson F.E, Inganas M, Paulie S and Gronvik KO. (2005). The Rb1 fraction of ginseng elicits a balanced Th1 and Th2 immune response. Vaccine. 23:5411-5419.

Genccelep H, Uzun Y, Tuncturk Y and Demirel K. (2009). Determination of mineral contents of wild-grown edible muchrooms. Food Chemistry. 113:1033-1036.

Han BH, Park MH and Han YN. (1981). Studies on the antioxidant compound of Korean ginseng (III). Identification of phenilic acid. Archives of Pharmacal Research. 4:53-58.

Han ST, Whang WK, Kim IH, Yang BW, Cho SH and Ko SK. (2005). Analysis of ginsenosides of black ginseng. Yakhak Hoeji. 49:490-494.

Jang KH, Shin KO and Kim SD. (2005). Free amino acid and polysaccharide content of submerged mycelial culture of *Fomitopsis pinicola*. Korean Journal of Food Presuemation. 12:379-386.

Jeong SC, Jeong YT, Yang BK, Islam R, Koyyalamudi SR, Pang G, Cho KY and Song CH. (2010). White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lower blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. Nutrition Research. 30:49-56.

Kim DH, Moon YS, Lee TH, Jung JS, Suh HW and Song DK. (2003). The inhibitory effect of ginseng saponins on the stress-induced plasma interleukin-6 level in mice. Neuroscience Letters. 353:13-16.

Kim GY, Choi GS, Lee SH and Park YM. (2004). Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor mecrosis factor-α from peritoneal macrophages. Journal of Ethnopharmacology. 95:69-76.

Kim SH, Song YS, Kim SK, Kim BC, Lim CJ and Park EH. (2004). Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom *Phellimus linteus*. Journal of Ethnopharmacology. 93:141-146

Kim YK, Guo Q and Packer L. (2002). Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. Toxicology. 172:149-156.

Lau KM, He ZD, Dong H, Fung KP and But PPH. (2002). Anti-oxidant, anti-inflammatory and hepato-protective effects of *Ligustrum robustum*. Journal of Ethnopharmacology. 83:63-71.

Lee HB, Kim HJ, Chong MS, Cho HE, Choi YH, Lim KS and Lee KN. (2008). Physiological activity of extracts from mixed culture of medical herbs and mycelia of *Tricholoma matsutake* and *Cordyceps militaris* by fermetation. Korean Journal of Herbology. 23:1-8.

Lee JJ, Shin DH, Park SE, Kim WI, Park DI, Choi YH and Hong SH. (2008). Euphorbiae humifusae sensitizes apoptosis of TRAIL-resistant human gastric adenocarcinoma AGS. Journal of Life Science. 18:120-128.

Lee KY, Park JA, Chung EA, Lee YH, Kim SI and Lee SK. (1996). Ginsenoside-Rh2 blocks the cell cycle of SK-HEP-1 cells at the G1/S boundary by selectively inducing the protein expression of p27kip1. Cancer Letters. 110:193-200.

Lee SJ, Sung JH, Lee SJ, Moon CK and Lee BH. (1999). Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. Cancer Letters. 144:39-43.

Lee YJ, Jin YR, Lim WC, Ji SM, Choi SH, Jang SY and Lee SK. (2003). A ginsenoside-Rh1, a component of ginseng saponin, activates estrogen receptor in human breast carcinoma MCF-7 cells. Journal of steroid Biochemistry & Molecular Biology. 84:462-468.

Liu F, Ooi VEC and Fung MC. (1999). Analysis of immunomudulating cytokine mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharides. Life Sciences. 64:1005-1011.

Manzi P, Marconi S. Aguzzi A and Pizzoferrato L. (2004). Commercial mushrooms : nutritional quality and effect of cooking. Food Chemistry. 84:201-206.

Park EM, Kim SJ, Ye EJ, Bae MJ and Jo KC. (2005). Effect of mycelia extracts of mushroom-cultured ginseng by-product on proliferation in cancer cell lines. Journal of Korean Society Food science and Nutrition. 34:323-329.

Park JG and Kim SW. (1998). Molecular study of aging by free radical. Journal of Basic Science. 9:103-114.

Ronald Han SS, Cho CK, Lee YW and Yoo HS. (2009). Antimetastatic and immunomodulating effect of water extracts from various mushrooms. Journal of Acupuncture and Meridian Studies. 2:218-227.

Song YS, Kim SH, Sa JH, Jin CB, Lim CJ and Park EH. (2003). Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. Journal

of Ethnopharmacology. 88:113-116.

Wang Y, Jiang RS, Li GR, Chen YH, Luo HM, Gao Y and Gao QP. (2010). Structural and enhanced memory activity studies of extracts from *Panax ginsen*g root. Food Chemistry. 119:969-973.

Wong JY and Chye FY. (2009). Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. Journal of Food Composition and Analysis. 22:269-277.