

## 엄나무 발효물의 항산화 및 항아밀로이드 활성

강정훈<sup>†</sup>

청주대학교 바이오메디컬학과  
(2018년 5월 29일 접수: 2018년 6월 22일 수정: 2018년 6월 27일 채택)

### Antioxidant and Anti-amyloid Activities of Fermented *Kalopanax pictus*

Jung Hoon Kang<sup>†</sup>

Department of Biomedical Science, Cheongju University, Chungbuk 28160, Korea

(Received May 29, 2018; Revised June 22, 2018; Accepted June 27, 2018)

**요약** : 본 연구는 노루궁뎅이버섯 균사체로 발효시킨 엄나무 추출물의 항산화 및 항아밀로이드 활성을 알아보려고 하였다. 항산화 활성은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) radical, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) radical 소거 측정법을 사용하여 관찰하였다. 엄나무 추출물(KP), 노루궁뎅이버섯 균사체 추출물(HE), 엄나무 발효물(KP-HE)에서 모두 라디칼 소거활성이 관찰되었다. 그러나 KP-HE가 KP와 HE에 비해서 더 높은 소거 활성을 갖는 것으로 관찰되었다. KP-HE는 peroxy radical에 의한 DNA의 산화적 손상을 억제하였다. 알츠하이머병 (Alzheimer's disease: AD)과 관련 있는  $A\beta_{1-42}$ 의 응집에 KP, HE, KP-HE가 어떤 영향을 미치는 지를 알아보았다. KP와 HE는  $A\beta_{1-42}$ 의 응집에 거의 영향을 미치지 않았고 KP-HE는  $A\beta_{1-42}$ 의 응집을 효과적으로 억제하였다. 또한  $A\beta_{1-42}$ 에 의한 신경세포 사멸에 엄나무 발효물을 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 전 처리한 세포생존율은 20.3% 높게 증가되었다. 또한 엄나무 발효물을 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리했을 경우 세포 내 ROS의 축적이 유의적으로 감소되었다. 결론적으로 본 연구에서 관찰된 결과들을 통해 엄나무 발효물은 항산화 및 항아밀로이드 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 따라서 엄나무 발효물은 알츠하이머병과 같은 퇴행성 뇌질환을 예방할 수 있는 식품소재로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

**주제어** : 산화적 변형, 항산화 활성, 항아밀로이드 활성, 활성산소, 알츠하이머병

**Abstract** : This study was to investigate the antioxidant and anti-amyloid activities of the extract (KP-HE) from *Kalopanax pictus* (KP) fermented with *Hericium erinaceum* (HE) mycelium. Antioxidant activity was evaluated based on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical(ABTS) scavenging assays. In all assays, the extracts from KP, HE and KP-HE had the potential for antioxidant activities. However, antioxidant activity of KP-HE significantly scavenged DPPH radical as compared to the KP and

---

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: jhkang@cju.ac.kr)

HE. The result suggested that the antioxidant component was increased in the process of KP fermented with HE. KP-HE was shown to significantly inhibit peroxyl radical-mediated DNA strand breakage whereas KP and HE did not inhibit DNA strand breakage. The aggregation of the amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) peptide is involved in the pathological process of Alzheimer's disease(AD). In this study, the effects of KP, HE and KP-HE on the aggregation of  $A\beta_{1-42}$  were investigated. KP and HE had little effect on  $A\beta$  aggregation and KP-HE effectively inhibited  $A\beta$  aggregation. KP-HE effectively inhibited  $A\beta$  induced cell death and significantly increased of the 20.3% cell survival at 300  $\mu\text{g/mL}$  concentration. KP-HE also decreased intracellular reactive oxygen specie levels in  $A\beta$ -treated cells. The results suggested that KP-HE had antioxidant and anti-amyloid activities. Therefore, KP-HE could potentially be used as a valuable functional food ingredient to prevent neurodegenerative disorders such as AD.

*Keywords* : oxidative modification, antioxidant activity, anti-amyloid activity, reactive oxygen specie, Alzheimer's disease.

## 1. 서론

퇴행성 신경질환의 하나인 알츠하이머병 (Alzheimer's disease: AD)은 고령화 사회에 따라 그 발병률이 증가되고 있다. AD의 주요 원인 중 하나는 뇌 세포에 amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) 단백질의 아밀로이드화에 의한 침착이다[1].  $A\beta$ 는 정상인의 경우에도 인체 내에서 소량으로 만들어지나 빠르게 분해되어 인체 내에 쌓이지 않는 반면 AD 환자의 경우  $A\beta$ 가 비정상적으로 생성되어 대뇌피질 (Cortex)과 해마(Hippocampus) 부위에 과다 축적됨으로써 신경원섬유성의 덩어리가 나타난다. 축적된  $A\beta$ 는 신경세포를 죽이는 신호 체계를 가동시키는 자유라디칼(free radical)을 많이 만든다[2]. 또한 자유라디칼들은 뇌 조직 중의 뇌세포 파괴 및 지질과산화물의 축적과 밀접한 관련이 있다고 보고되었다[3,4]. 이에 많은 연구자들은 오래전부터 치매 치료제의 개발을 위해 약용 식물로부터 항산화 효과를 나타내는 성분을 분리하는 연구를 진행하고 있다[5].

엄나무 (*Kalopanax pictus*)는 두릅나무과 (Araliaceas)에 속하는 활엽수로서 기생충제거, 혈액순환촉진, 근육통 요통, 부스럼, 옴 등과 같은 피부질환의 치료제로 사용한다. 또한 각종 비타민과 무기질, 사포닌 등이 함유되어 있으며 체내에 침입한 풍을 없애는 거풍습, 활혈, 소종 작용이 있다. 그밖에 위액 분비 항진, 거담 작용이 있으며 진통 소염작용이 있어 신경통, 근육마비, 근육통, 당뇨, 관절염, 요통, 암 예방 등의 예방에 널

리 사용하고 있다. 최근에는 엄나무 햇순의 데침에 따른 영양학적 특성변화, 잎 추출물의 항산화 효과와 줄기로부터 항산화 활성 물질의 분리동정 등 많은 연구가 보고되고 있다[6,7].

한편 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*)은 동남아시아, 유럽, 일본 등에 분포되어 가을철 활엽수의 고목이나 생목에서 주로 발생한다. 노루궁뎅이버섯은 다양한 생리활성이 있다고 보고된 바 있으나[8,9] 최근에는 버섯균사체를 이용한 발효 물질에 효과적인 생리활성물질이 나타난다는 보고가 있다[10,11]. 현재까지 엄나무의 여러 생리활성에 관한 연구가 보고되었으며, 노루궁뎅이버섯의 생리활성에 관한 연구도 진행되었으나 버섯균사체를 이용한 엄나무 발효물의 생리활성에 대한 연구는 아직 이루어지고 있지 않다. 따라서 엄나무 및 버섯균사체의 생리활성을 토대로 발효에 의한 새로운 생리활성 증가가 기대됨으로 본 연구에서 엄나무 발효물의 항산화 기능과 항아밀로이드 활성을 관찰하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험 재료 및 시약

본 연구에 사용한 엄나무(*Kalopanax pictus*: KP)는 2013년 7월에 충청북도 제천에서 채취한 가지를 사용하였으며, 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*: HE)균사체는 충북농업 기술원 (Chungbuk, Korea)으로부터 분양받아 potato

dextrose agar(PDA, Difco, Detroit, MI, USA) 사면배지에서 25°C에서 10일간 배양한 후 4°C에서 보존한 노루궁뎅이 버섯균사체를 사용하였다.

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), thioflavin-T 등은 Sigma 사의 제품을 사용하였다. sodium dodecyl sulfate(SDS)는 Bio-Rad (Hercules, California, USA)로부터 구입하였고, Amyloid  $\beta_{1-42}$ (A $\beta_{1-42}$ )는 Anaspec(Fremont, California, USA)의 제품을 사용하였다. 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)는 Wako(Chuo-Ku, Osaka, Japan)에서 구입한 시약을 사용하였고 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)는 Boehringer Mannheim GmbH(Mannheim, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖에 실험에 사용한 모든 시약은 시중에서 구입한 특급을 사용하였다.

## 2.2. 엄나무 발효

엄나무 1 kg에 1.5 L 정제수를 첨가하여 4시간 동안 침지 시킨 후 고온고압멸균기에 121°C에서 2시간 동안 멸균한 후 10%의 노루궁뎅이버섯균사체를 접종하여 25°C에서 30일간 배양한 후 60°C에서 2일간 건조시켜 엄나무 발효물을 제조하였다. 이 발효물의 열수 추출물을 제조하기 위하여 엄나무 발효물 100 g에 2 L 증류수를 첨가하고 homogenizer(Ultra-turrax T-50, KG-IKA-Labortechnik, Staufen, Germany)로 5,000 rpm에서 10분간 분쇄한 후 열수 추출하였으며, 여과지(No. 2, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 잔사와 추출액을 분리하고 잔사는 다시 반복 추출 하였다. 3회 반복 추출하였으며 총 열수 추출액을 4°C에서 30분 동안 7,600 X g로 원심분리하여 불용성 침전물을 제거하고 상층액을 농축 및 동결건조 하여 실험에 사용하였다.

## 2.3. DPPH radical 소거활성

안정된 free radical을 갖는 화합물인 DPPH는 glutathione과 같은 황함유 아미노산과 tocopherol, ascorbic acid 등에 의해 환원되어 보라색이 탈색되는 특성을 이용, 항산화 물질의 활성을 측정하는 편리한 방법이다. DPPH radical 활성을 Brand-Williams 등[12]의 방법을 변형하여 측정하였다. DPPH(0.1 mM, ethanol) 900  $\mu$ l에 DMSO 50  $\mu$ l와 각각 KP, HE, KP-HE 50

$\mu$ l을 첨가하여 실온에서 20분간 반응 시킨 후 centrifuge (10,000 Xg, 5 min)를 통해 불순물을 제거하고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 다음 식(1)을 사용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} \\ = \{1 - (\text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{Control}})\} \times 100 \quad (1)$$

## 2.4. ABTS radical 소거활성

ABTS radical 소거활성을 Brand-Williams 등 [12]의 방법을 변형하여 측정하였다. 2.5 mM potassium persulfate에 7 mM ABTS를 1:1로 혼합하여 암실에서 37°C 12시간 동안 반응 시킨 후 흡광도 값이 0.7이하가 되도록 10배 희석하여 사용하였다. ABTS 900  $\mu$ l를 DMSO 50  $\mu$ l와, KP, HE, KP-HE 50  $\mu$ l을 각각 혼합하여 실온에서 10분간 반응 시킨 후 734 nm에서 흡광도 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 다음 식(2)을 사용하여 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} \\ = \{1 - (\text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{Control}})\} \times 100 \quad (2)$$

## 2.5. DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

Peroxy radical에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용 관찰은 Kang과 Kim[13]의 방법을 이용하였다. DNA는 pUC19 0.1 mg/mL을 사용하고 DNA의 산화적 손상을 유발시키기 위해 10 mM AAPH를 사용하여 유도하였다. 반응 혼합물에 KP, HE, KP-HE를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응 시킨 후 agarose gel electrophoresis를 통해 산화적 손상에 대한 보호 효과를 확인하였다.

## 2.6. Thioflavin-T에 의한 Amyloid $\beta$ (A $\beta$ ) 응집 측정

Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) 응집은 Kim등[14]의 방법을 이용하였다. Potassium phosphate(pH 7.4)의 buffer에 20  $\mu$ M A $\beta_{1-42}$ 와 각각 KP, HE, KP-HE를 넣고 37°C에서 24 시간 동안 반응시킨 후 sodium phosphate(pH 6.0) 50 mM buffer에 녹인 thioflavin T(Th-T) 5  $\mu$ M을 반응액에 첨가하였다. 각 반응액을 spectrofluorometer를 이용하여 excitation spectrum 440 nm, emission spectrum 470-570

nm 영역에서 형광광도를 측정하였다.

## 2.7. 세포배양 및 세포생존율 측정

세포배양을 위해 SH-SY5Y 세포를 직경 100 mm culture dish에서 10% bovine calf serum, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin을 함유한 DMEM 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기(MCO 17AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 37°C로 배양하여 사용하였다. 세포를 96 well plate에 분주하고 12시간 배양 한 후 50  $\mu$ M A $\beta$ 를 처리하여 세포사멸을 유도 하였다. 세포의 생존율은 MTT assay를 통해 ELISA reader(Labsystems Multiskan MCC/340)을 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다[15].

## 2.8. ROS 생성 관찰

세포내 ROS 생성 관찰은 DCF-DA염색법을 이용하여 측정하였다[15]. 세포를 3 $\times$ 10<sup>4</sup> 크기로 cover glass위에 깔아준 후 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 배양기를 통해 12시간 배양한 후 50  $\mu$ M A $\beta$ 를 24시간 처리하여 ROS 생성을 유도하였으며, 2~3회 세척 후 20  $\mu$ M DCF-DA을 1시간 동안 반응 시킨 후 형광현미경(Nikon Eclipse 80i, Tokyo, Japan)을 통해 확인하였다.

## 2.9. 통계처리

실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 통계프로그램 (Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험값은 3회 이상 반복 실시한 결과를 평균  $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 각 군 간의 측정치 비교는 95% ( $P < 0.05$ )의 유의수준에서 student's t-test를 통해 구간의 유의적 차이를 검증하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. DPPH radical 소거활성

DPPH를 이용한 전자공여능 측정법은 지질과 산화 반응의 연쇄반응에 관여하는 산화성 자유라디칼에 전자를 제공하여 연쇄반응을 정지하고 산화를 억제시킨다. 인체 내에서 free radical은 지질, 단백질 등과 결합하여 각종 질병 및 노화를 일으키는 척도가 되므로 자유라디칼을 제거할 수 있는 식물 추출물의 항산화 활성을 간단히 측정

할 수 있어 많이 사용되고 있다. 였나무 추출물(KP), 노루궁뎅이버섯 균사체 추출물(HE) 및 노루궁뎅이버섯 균사체를 이용한 였나무 발효물(KP-HE)이 항산화 활성이 있는 지를 확인하기 위하여 DPPH radical 소거활성을 측정하였다. KP의 경우 500  $\mu$ g/mL 농도에서 46.71%의 활성을 나타내었고 HE는 500  $\mu$ g/mL 농도에서 60.15%로 나타났으며 KP-HE는 같은 농도에서 84.42%의 활성을 나타냈다(Fig. 1).

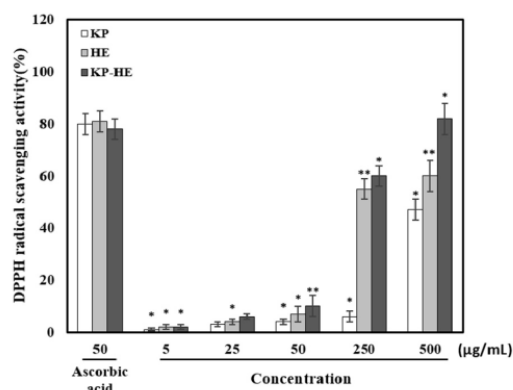


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of fermented *Kalopanax pictus* with *H. erinaceum* mycelium(KP-HE), *Kalopanax pictus*(KP), and *H. erinaceum*(HE). The reaction mixture contained 0.1 mM DPPH in the presence or absence of various concentrations of KP, HE and KP-HE at 37°C for 20 min. The values represent the mean  $\pm$  S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the ascorbic acid treated group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

DPPH radical 소거활성의 측정 결과, KP, HE, KP-HE는 모두 농도에 비례해서 유의적으로 활성이 증가였다. 또한 KP-HE는 KP 및 HE 보다 더 높게 활성을 나타냈다. Kim 등[16]은 였나무 수피의 열수 추출물이 500  $\mu$ g/mL 농도에서 32%, 였나무 근피 열수 추출물은 같은 농도에서 37%의 DPPH 소거활성을 나타내었다고 보고하였다.

폴리페놀, 페놀산, 플라보노이드 등의 페놀성 화합물들의 경우 전자공여능이 크고, 특히 식물계

에 분포되어있는 페놀성 물질의 경우 항산화, 항균, 항암 등의 생리활성을 나타내며 페놀 화합물은 •OH radical을 통한 수소 공여 및 페놀 고리 구조의 공명 안정화에 의해 항산화 능력을 가지는 것으로 보고되었다[17]. 약용식물의 경우 총 폴리페놀 함량이 30 mg/g 이상일 경우 뛰어난 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[18]. KP의 총 폴리페놀의 함량과 총 플라보노이드 함량도 30mg/g 이상 인 것으로 보고되어 있다[19]. 본 연구 결과에서 KP-HE가 KP와 HE에 비해 상대적으로 높은 radical 소거활성을 띄는 것은 노루궁뎅이버섯 균사체에 의한 엄나무 발효 시 자유라디칼을 소거할 수 있는 폴리페놀과 플라보노이드계 물질들이 증가하기 때문인 것으로 사료된다.

### 3.2. ABTS radical 소거활성

ABTS radical 분석은 항산화 물질에 의하여 radical의 짙은 청록색이 투명색으로 탈색되는 것을 이용하여 측정하는 방법으로 hydrophilic antioxidant와 lipophilic antioxidant 및 chain breaking antioxidant를 측정할 수 있고 aqueous phase 및 organic phase 모두에 적용이 가능하다는 점이 특징이며, DPPH radical 소거활성과는 유의적인 상관성을 보이는 것으로 알려져 있다 [20]. 본 연구에서 KP는 radical 소거활성이 거의 나타나지 않았으며 HE의 경우 100  $\mu$ g/mL 농도에서 81.12%의 활성을 나타냈고 KP-HE의 경우 같은 농도에서 90.34%의 활성이 관찰되었다 (Fig. 2).

ABTS radical 소거활성은 HE와 KP-HE의 경우 농도가 증가함에 따라 활성이 유의하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 결과를 통해 KP-HE는 KP와 HE에 비해 ABTS radical 소거 능력이 뛰어난 것으로 판단되었으며 이는 DPPH radical 소거활성 능력과 비슷한 결과를 나타내었다. Jun 등[21]은 엄나무 잎의 열수 추출물이 125  $\mu$ g/mL 농도에서 42% ABTS 소거활성을 나타내었는데 이는 추출물에 포함되어 있는 다량의 폴리페놀에 의한 것으로 예상하였다.

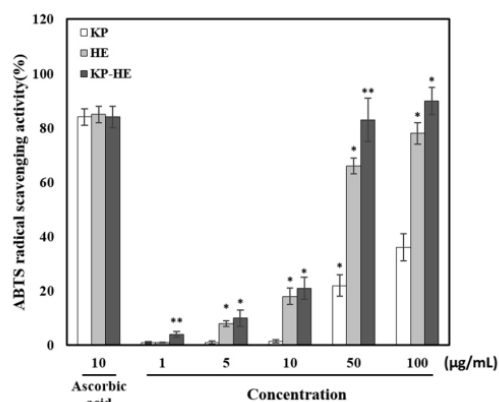


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of fermented *Kalopanax pictus* with *H. erinaceum* mycelium(KP-HE), *Kalopanax pictus*(KP), and *H. erinaceum*(HE). mycelium(SBT-HE). The reaction mixture contained 7 mM ABTS and 2.5 mM potassium persulfate in the presence or absence of various concentrations of KP, HE and KP-HE at 37°C for 10 min. The values represent the mean  $\pm$  S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the ascorbic acid treated group. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.

### 3.3. DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

Peroxy radical은 지질이나 DNA와 반응하여 산화적 손상을 유도한다. pUC19 DNA(0.1 mg/mL)에 10 mM AAPH를 가하여 산화적 손상을 유도하고 반응액을 agarose gel electrophoresis 한 후 gel 상의 DNA를 관찰하였다. pUC19 DNA는 supercoil form(I)으로 나타났다(Fig. 3, lane 1), DNA가 산화적 손상된 경우 strand breakage가 일어나 nicked circular form(II)이 관찰되었다(Fig. 3, lane 2). 이와 같은 산화적 손상 조건에 50, 100, 500, 1000  $\mu$ g/mL의 농도로 KP와 HE를 처리했을 때, DNA의 산화적 손상이 보호되지 못하였다 (Fig. 3, A, B). 반면 KP-HE를 처리했을 때는 농도가 증가함에 따라 strand breakage가 억제되었고, 500  $\mu$ g/mL에서부터 DNA 산화적 손상을 뚜렷하게 보호하는 것으로 나타났다(Fig. 3. C).

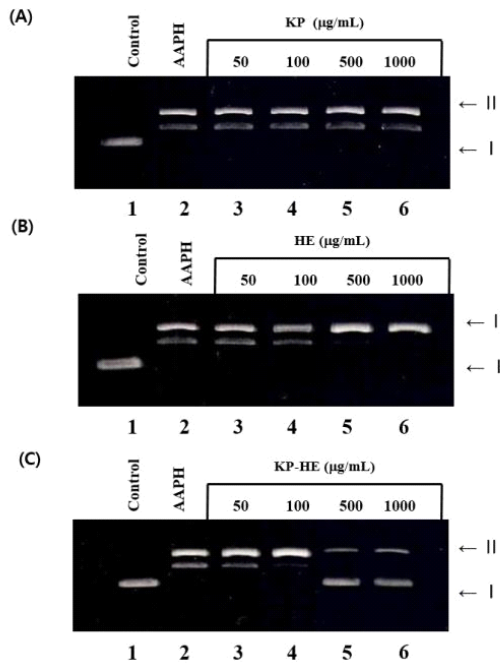


Fig. 3. Protective effects of fermented *Kalopanax pictus* with *H. erinaceum* mycelium (KP-HE), *Kalopanax pictus*(KP), and *H. erinaceum*(HE) on DNA strand breakage induced by peroxy radical. pUC 19 DNA was incubated with 10 mM AAPH in the presence of various concentrations of KP(A), HE(B) and KP-HE(C) at 37°C for 2 h.

생체 내에서 free radical에 의한 DNA의 손상은 DNA cleavage 또는 fragmentation 현상이 일어나며 deoxyguanosine 분자가 8-hydroxy deoxy-guanosine으로 변형되고 이것은 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 염증, 노화, 암 등과 같은 질병의 원인된다고 알려져 있다[22]. 따라서 염나무 발효물은 DNA의 산화적 손상을 보호함으로써 노화와 질병의 예방에 도움이 될 것으로 생각된다.

#### 3.4. A $\beta$ 응집에 대한 발효물의 보호작용

A $\beta$  단백질은 알츠하이머 병(Alzheimer's disease: AD)을 일으키는 원인 물질 중에 하나로 알려져 있다. AD는 서서히 진행되는 뇌 조직의

퇴행성 변화로서 A $\beta$  단백질의 응집이 뇌 속에 축적됨으로서 유발되는 것으로 알려져 있다. 이 변화는 AD 환자의 뇌 속에 A $\beta$  단백질이 senile plaque를 형성하여 microglia와 astrocyte들이 활성화되고 proinflammatory cytokine을 과다하게 발현시킴에 따라 중추 신경계 염증 반응을 일으킨다고 알려져 있다[23]. 신경세포에 독성을 일으키는 A $\beta$ 의 아미노산의 개수는 일반적으로 42개로 알려져 있다. 특히 뇌신경세포에 A $\beta_{1-42}$ 가 과량 생성되어 응집을 일으켜 plaque를 형성하여 병변을 유발한다는 결과가 보고되면서 A $\beta$ 의 응집 억제제는 새로운 AD의 치료제를 개발하는 데 있어 중요한 소재가 되었다[24]. 본 연구에서는

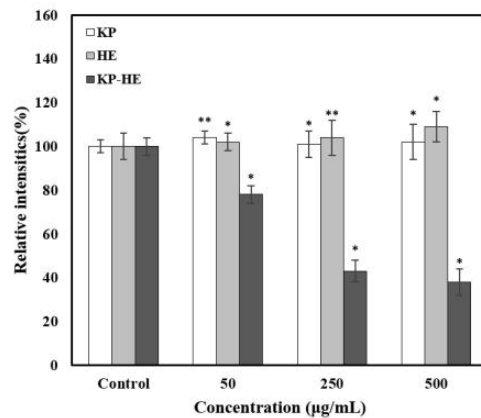


Fig. 4. Protective effects of fermented *Kalopanax pictus* with *H. erinaceum* mycelium (KP-HE), *Kalopanax pictus*(KP), and *H. erinaceum*(HE) on A $\beta_{1-42}$  aggregation. 20  $\mu$ M A $\beta_{1-42}$  was incubated in 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) with the presence of various concentrations of KP(A), HE(B) and KP-HE(C) at 37°C for 24 h. The Reaction mixture were performed in steps reacted with thioflavin-T. The fluorescence emission spectrum of the sample was then monitored between 470 and 570 nm(excitation, 440 nm) using CYT3MF spectrofluorometer(BioTek). The values represent the mean  $\pm$  S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

$A\beta_{1-42}$ 의 응집에 KP, HE, KP-HE이 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. Potassium phosphate (pH 7.4)의 buffer에서  $A\beta_{1-42}$ 를 응집시키고 응집체를 thioflavin T(Th-T)로 염색시키는 방법을 통해 응집 정도를 측정하였다. 응집이 일어나는 조건에 KP, HE, KP-HE를 농도별로 처리하여 반응시킨 후, thioflavin T(Th-T)를 첨가하여 각 반응액을 spectrofluorometer로 측정한 결과 KP와 HE의 경우  $A\beta_{1-42}$ 만 넣은 control과 비교하여 거의 변화가 없었다. 반면 KP-HE의 경우는 농도가 증가함에 따라  $A\beta_{1-42}$  응집을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

이와 같은 결과를 통해 엄나무 발효물이  $A\beta_{1-42}$  응집으로 기인하는 아밀로이드의 생성을 억제할 수 있는 항아밀로이드 기능이 가질 수 있을 것으로 판단되었다. 앞으로 후속 연구를 통해 치매 예방 물질로 버섯 균사체를 이용한 엄나무 발효물이 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 3.5. 세포생존율 측정

$A\beta_{1-42}$ 에 의한 세포사멸에 엄나무 발효물이 어떤 영향을 미치는지를 관찰하였다.  $A\beta_{1-42}$ 를 처리하기 2시간 전에 KP-HE를 농도별로 처리하고  $A\beta_{1-42}$ 를 50  $\mu$ M 처리하여 배양한 결과  $A\beta_{1-42}$ 를 처리한 세포의 생존율은 45.16%로 정상세포보다 54.84% 감소하였으나 KP-HE를 10  $\mu$ g/mL 농도로 처리한 세포의 생존율은 50.80%였고 300  $\mu$ g/mL을 처리한 농도에서는 생존율이 65.35%로 나타남으로서  $A\beta_{1-42}$ 만을 처리한 것에 비하여 유의한 증가를 나타냈다( $p < 0.01$ )(Fig. 5).

기존 연구 결과에 의하면 치매환자의 뇌에서  $A\beta$ 가 증가하면 활성산소의 생성을 유도한다고 알려져 있으며 활성산소의 증가는 뇌세포의 손상과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다[25]. 또한 활성산소의 축적을 감소시키는 항산화물질들은 뇌에서  $A\beta$ 에 의한 세포 손상을 감소시킨다는 보고도 있다[26]. 따라서 엄나무 발효물에 의한 세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과는 뇌조직에서의 신경세포 사멸 억제에 영향을 줄 것으로 생각된다.

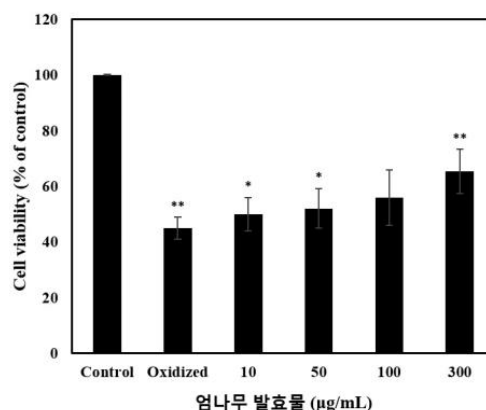


Fig. 5. Protective effects of fermented *Kalopanax pictus* with *H. erinaceum* mycelium (KP-HE) on cell death induced by  $A\beta_{1-42}$ . SH-SY5Y cells were treated with 50  $\mu$ M  $A\beta_{1-42}$  in the presence or absence of varying concentrations of KP-HE for 24 h, and cell viabilities were estimated by with a colorimetric assay using MTT. The values represent the mean  $\pm$  S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### 3.6. ROS 생성에 대한 영향

$A\beta_{1-42}$ 에 의한 세포사멸에서 ROS생성에 발효물이 미치는 영향을 관찰하였다. Fig. 6에서 Control 표시 부분의 상단에 나타나는 형광정도에 비해  $A\beta$  표시 상단에 나타나는 형광정도가 더 높게 나타났다. 이는  $A\beta_{1-42}$  처리 세포에서 ROS가 생성되었음을 나타낸 것이며 여기에 KP-HE를 500  $\mu$ g/mL 농도로 처리한 결과 형광정도가 현저히 감소됨을 알 수 있었다.  $A\beta_{1-40}$ 와  $A\beta_{1-42}$ 는 치매환자의 hippocampus와 cortex에 축적되면서 단백질, 지질, 핵산의 산화를 유도할 수 있다고 알려졌다[27]. 이는  $A\beta$ 가 활성산소를 생성함으로써 생체고분자들의 산화적 손상을 유발할 수 있으며 궁극적으로 세포의 사멸을 유도한다는 사실을 암시한다. 또한, ROS의 생성 증가는 뇌 해마에서의 항산화 수준 감소, MDA와 과산화수소 축적으로 인한 신경 손상과 사멸을 가속화 시킨다고 알려져 있다[28]. 이상과 같은 결과들을 통해 엄나무 발효물의 항산화 활성과 항

아밀로이드 활성은 세포 내 ROS 소거능과 상관 관계가 있으며, 이러한 활성이 ROS에 의해 야기 되는 노화 및 퇴행성 질환을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

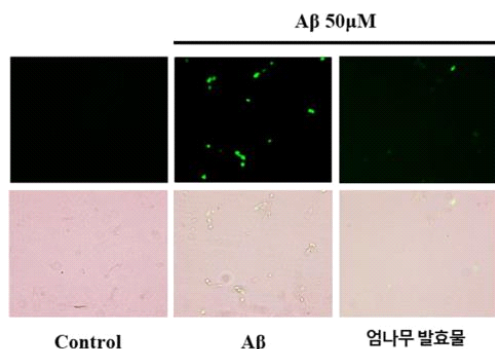


Fig. 6. Protective effects of fermented *Kalopanax pictus* with *H. erinaceum* mycelium (KP-HE) on the generation of ROS induced by  $A\beta_{1-42}$ .  $50 \mu M A\beta_{1-42}$  was added to the cells for 24 h, and then examined by fluorescence microscopy after staining with DCF-DA.

#### 4. 결론

본 연구는 노루궁뎅이버섯 균사체로 발효시킨 엄나무 추출물의 항산화 및 항아밀로이드 활성을 알아보고자 하였다. 항산화 활성은 radical 소거 활성과 DNA 손상 보호를 통해 관찰하였고 항아밀로이드 활성은  $A\beta_{1-42}$ 의 응집 억제를 통해 알아보았다.

1. 엄나무 추출물(KP), 노루궁뎅이버섯 균사체 추출물(HE), 엄나무 발효물(KP-HE)의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정된 결과 KP의 경우  $500 \mu g/mL$  농도에서 46.71%의 활성을 나타내었고 HE는  $500 \mu g/mL$  농도에서 60.15%로 나타났으며 KP-HE는 같은 농도에서 84.42%의 활성을 나타냈다. ABTS 라디칼 소거활성은 KP 경우 거의 나타나지 않았으며 HE의 경우  $100 \mu g/mL$  농도에서 81.12%의 활성을 나타냈고 KP-HE의 경우 같은 농도에서 90.34%의

활성이 관찰되었다.

2. Peroxyl radical에 의한 DNA가 산화적 손상에서 KP와 HE를 농도별로 처리했을 때, DNA의 산화적 손상이 보호되지 못하였으나 KP-HE를 처리했을 때는 농도가 증가함에 따라 strand breakage가 억제되었고,  $500 \mu g/mL$ 에서부터 DNA 산화적 손상을 뚜렷하게 보호하는 것으로 나타났다.
3. 알츠하이머병 (Alzheimer's disease: AD)과 관련 있는  $A\beta_{1-42}$ 의 응집에 KP, HE, KP-HE가 어떤 영향을 미치는 지를 알아본 결과. KP와 HE는  $A\beta_{1-42}$ 의 응집에 거의 변화가 없었고 KP-HE는  $A\beta_{1-42}$ 의 응집을 효과적으로 억제하였다. 또한  $A\beta_{1-42}$ 에 의한 신경세포 사멸에 엄나무 발효물을  $300 \mu g/mL$  농도로 전 처리한 세포생존율은 20.3% 높게 증가되었으며 엄나무 발효물을  $50 \mu g/mL$  농도로 처리했을 경우 세포 내 ROS의 축적이 유의적으로 감소되었다.

이와 같은 결과들을 통해 엄나무 발효물은 항산화 및 항아밀로이드 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 따라서 엄나무 발효물은 알츠하이머병과 같은 퇴행성 뇌질환을 예방할 수 있는 소재로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

#### References

1. A. Lorenzo, B. A. Yankner, "Amyloid fibril toxicity in Alzheimer's disease and diabetes", *Ann. N Y Acad. Sci.*, Vol.17, No.1 pp. 89-95, (1996).
2. C. Glabe, "Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease", *J. Mol. Neurosci.*, Vol.17, No.2 pp. 137-45, (2001).
3. P. Domenico, "Alzheimer's disease and oxygen radicals: new insights", *Biochemical Pharmacology*, Vol.63, No.6 pp. 563-567, (2002).
4. C. Behl, "Oxidative stress in Alzheimer's disease: implications for prevention and therapy", *Subcell. Biochem.*, Vol.38, pp. 65-78, (2005).



5. H. Kim, S. J. Yoon, K. H. Lee, H. J. Kwon, S. S. Chun, T. W. Kim, Y. J. Cho, "Screening of biological activities of the extracts from Basil (*Ocimum basilicum* L.)", *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, Vol.48, No.2 pp. 173-177, (2005).
6. H. J. Im, H. L. Jang, Y. J. Jeong, K. Y. Yoon, "Chemical properties and antioxidant activities of the sprouts of *Kalopanax pictus*, *Cedrela sinensis*, *Acanthopanax cortex* at different plucking times", *Korean J. Food Preserv.*, Vol.20, No.3 pp. 356-364, (2013).
7. J. D. Hwang, J. S. Choi, J. B. Kim, S. L. Yang, "Antioxidant activities of bark extracts from *Kalopanax pictus*", *J. Invest. Cosmet.*, Vol.7, No.4 pp. 329-337, (2011).
8. H. Kawagishi, A. Shimada, K. Shizuki, H. Mori, H. Sakamoto, S. Furukawa, E. F. "Erinacines, Stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Herichium erinaceum*", *Tetrahedron Lett.*, Vol.41, No.2 pp. 7399-7402, (1996).
9. S. H. Park, J. S. Chang, K. R. Lee, "Effect of *Herichium erinaceus* extract on cancer cell growth and expression of cell cycle associated proteins", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.32, No.6, pp. 931-936, (2003).
10. Y. S. Kim, M. Y. Joung, B. S. Ryu, P. J. Park, J. H. Jeong, "Anti-inflammatory activities of extracts from fermented *Taraxacum platycarpum* D. leaves using *Herichium erinaceum* mycelia", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.45, No.1 pp. 20-26, (2016).
11. H. Kim, J. Y. Shin, A. R. Lee, J. H. Hwang, K. W. Yu, "Physiological activity of the fermented small atate culture of the bearded tooth mushroom (*Herichium erinaceum*) mycelia" *Korean J. Food Nutr.*, Vol.30, No.6 pp. 1348-1356, (2017).
12. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *Food Sci. Tech.*, Vol.28, No.1 pp. 25-30, (1995).
13. J. H. Kang, S. M. Kim, "DNA cleavage by hydroxyl radicals generated in the Cu, Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system", *Mol. Cells*, Vol.7, No.6 pp. 777-782, (1997).
14. K. S. Kim, S. Y. Choi, H. Y. Kwon, M. H. Won, T. C. Kang, J. H. Kang, "Aggregation of alpha-synuclein induced by the Cu,Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system", *Free Radic. Biol. Med.*, Vol.15, No.6 pp. 544-550, (2002).
15. E. H. Ahn, D. W. Kim, M. J. Shin, Y. N. Kim, H. R. Kim, S. J. Woo, S. M. Kim, D. S. Kim, J. Kim, J. Park, W. S. Eum, H. S. Hwang, S. Y. Choi, "PEP-1-ribosomal protein S3 protects dopaminergic neurons in an MPTP-induced Parkinson's disease mouse model", *Free Radic. Biol. Med.*, Vol.55, pp. 36-45, (2013).
16. S. H. Kim, Y. Park, Y. S. Jang, J. Han, H. G. Chung, "Oxidative stress in the cell and antioxidant activity of *Kalopanax pictus* extracts", *J. Korean Wood Sci. Tech.*, Vol.35, No.6 pp. 26-143, (2007).
17. K. Hermann, "Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods", *Critical Rev. Food Sci. Nut.*, Vol.28, No.4 pp. 315-347, (1989).
18. S. I. Heo, H. J. Jung, M. K. Kim, M. H. Wang, "Antioxidative activities and tyrosinase inhibitory effects of Korean medicinal plants", *J. Appl. Biol. Chem.*, Vol.50, No.3 pp. 115-119, (2007).
19. M. H. Kim, S. Y. Park, Y. J. Jeong, K. Y. Yoon, "Sensory properties of *Kalopanax pictus* and *Cedrela sinensis* shoots under different blanching conditions and with different thawing methods", *Korean J. Food Preserv.*, Vol.19, No.2 pp. 201-208, (2012).
20. Y. M. Lee, J. H. Bae, H. Y. Jung, J. H. Kim, D. S. Park, "Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean

- edible wild plants”, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.40, No.1 pp. 29-36, (2011).
21. D. H. Jun, J. T. Lee, S. J. Cheon, C. E. Lee, T. H. Kim, D. H. Lee, J. Han, S. Y. Kim, “Polyphenol and anti-oxidant effects of *Kalopanax septemlobus* Koidz. leaf extracts”, *Korean J. Plant Res.*, Vol.22, No.4 pp. 343-348, (2009).
22. B. Halliwell, J. M. Gutteridge, “Roles of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overreview”, *Methods Enzymol.*, Vol.186, pp. 1-85, (1990).
23. D. J. Selkoe, “Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease”, *Nature*, Vol.399, pp. A23-A31, (1999).
24. Y. Gong, L. Chang, K. L. Viola, P. N. Lacor, M. P. Lambert, C. E. Finch, G. A. Krafft, W. L. Klein, “Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A-beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Vol.100, No.18 pp. 10417-10422, (2003).
25. C. Behl, “Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches”, *Prog. Neurobiol.*, Vol.57, No.3 pp. 301-429, (1999).
26. C. B. Pocernich, D. A. Butterfield, “Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease”, *Biochem. Biophys. Acta*, Vol.1822, No.5 pp. 625-630, (2012).
27. D. A. Butterfield, C. M. Lauderback, “Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress”, *Free Radic. Biol. Med.*, Vol.32, No.11 pp. 1050-1060, (2002).
28. O. Vergun, A. I. Sobolevsky, M. V. Yelshansky, J. Keelan, B. I. Khodorov, M. R. Duchon, “Exploration of the role of reactive oxygen species in glutamate neurotoxicity in rat hippocampal neurones in culture”, *J. Physiol.*, Vol.531, No.1 pp. 147-163, (2001).