



## 겉보리에서 배양한 영지버섯 추출물의 항산화 및 항염증 효능 평가

서경희<sup>1</sup> · 김연화<sup>1</sup> · 이영민 · Mithun Ghosh · 박강민 · 박동현 · 김진성 · 임병우<sup>†</sup>

건국대학교 응용생화학과

### Evaluation of Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Activities of *Ganoderma lucidum* Cultured on Hulled Barley

Kyoung Hee Seo<sup>1</sup>, Yeon Hwa Kim<sup>1</sup>, Young Min Lee, Mithun Ghosh, Kang Min Park, Dong Hyun Park, Jin Seong Kim and Beong Ou Lim<sup>†</sup>

Department of Applied Biochemistry, Konkuk University, Chungju 27478, Korea.

#### ABSTRACT

**Background:** *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley was investigated as a potential natural source of antioxidants and anti-inflammatory agents.

**Methods and Results:** The yields from *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley water and ethanol extract were 17.69% and 25.77%, respectively. The antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley extracts was confirmed by various methods including assays of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), nitrite radical scavenging, and Fe<sup>3+</sup> to Fe<sup>2+</sup> reducing power activity. The ethanol extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley showed improved DPPH, ABTS and nitrite radical scavenging activity compared with the water extract. After treatment of RAW264.7 cells with *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley ethanol extracts, the cell viability compared with the control was 92.82%, even at a concentration of 3,000 µg/ml. The ethanol extract inhibited reactive oxygen species (ROS) generation in RAW264.7 cells stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, even at low concentrations. In addition, the ethanol extract showed an inhibitory effects on the production of lipopolysaccharide-induced nitric oxide (NO) in RAW264.7 cells.

**Conclusions:** This study suggests that the extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley is a potential source of natural antioxidants and anti-inflammatory agents.

**Key Words:** *Ganoderma lucidum*, Anti-Inflammatory, Anti-Oxidant, Hulled Barley, Lipopolysaccharide

#### 서 언

최근 서구화된 식습관과 생활환경의 변화는 비만, 당뇨, 심혈관계 및 퇴행성 노인질환 등과 같은 만성질환의 증가를 초래하고 있다. 또한, 영양소 공급을 위한 식품의 1차적 기능을 넘어서 다양한 생리 활성을 갖는 천연물 유래 식의약품 소재에 대한 관심이 증가하고 있다 (Park *et al.*, 2013).

산소는 화학물질이나 공해 등과 같은 물리·화학적 요인이거나 생체 내 대사과정의 불균형으로 인하여 생성되는 부산물로

hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide 등과 같은 반응성이 강한 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)으로 전환된다 (Bohr, 2002; Seitz and Stickel, 2006). 활성산소가 생체 내에서 과도하게 발생되면 강한 산화력으로 인하여 생체막의 지질을 산화시키고 단백질의 변성을 일으킨다. 이로 인해 세포나 조직의 손상을 초래함으로써 세포노화, 동맥경화, 당뇨병, 뇌졸중 및 암과 같은 질병이 발생하게 된다 (Jun *et al.*, 2013). 따라서, 활성산소에서 비롯되는 산화스트레스를 억제하고 조절할 수 있는 항산화 소재의 개발과 인체 적용에 관

<sup>1</sup>Kyoung Hee Seo and Yeon Hwa Kim are contributed equally to this paper

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-43-840-3570 (E-mail) beongou@kku.ac.kr

Received 2016 November 15 / 1st Revised 2016 December 13 / 2nd Revised 2017 January 19 / 3rd Revised 2017 February 7 / Accepted 2017 February 7

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한 연구 분야가 많은 주목을 받고 있다. 생체 내 염증반응은 대식세포나 호중구와 같은 면역 세포들의 활성화를 유도하고 이로 인해 활성 산소가 다량 생성된다. 이처럼 산화스트레스와 염증 반응은 매우 밀접한 관련이 있으며, 따라서 항산화 활성이 있는 소재는 항염증 소재로 개발할 수 있을 것으로 사료된다 (Delanty and Dichter, 1998).

보리 (*Hordeum vulgare* L.)는 1960 - 1970년대에는 쌀 다음으로 중요한 작물로 여겨졌으나, 최근에 이르러 국민 소득 향상과 식생활 변화로 인해 수요 및 재배 면적이 감소하는 양상을 보였다. 그러나 최근 소비자의 관심도 증가에 따른 보리차, 엿기름, 보리쌀 등과 같은 가공 보리제품의 개발이 이루어지고 있다 (Hyun *et al.*, 2008). 보리는 쌀이나 밀 등의 일반 곡류가 갖지 않는  $\beta$ -glucan, arabinoxylan, hydrocyanic acid 등의 기능성 영양 성분들을 많이 함유하고 있으며, 체내 혈중 콜레스테롤 수치 저하를 통한 심장 질환의 예방, 체지방 축적 억제를 통한 비만 합병증 완화 등 성인병 예방에 효과적이다 (Kalra and Jood, 2000; Song *et al.*, 2005). 더욱이, 겉보리는 까락이 길며 껍질이 얇고 매우 밀착되어 있어 껍질이 잘 분리되지 않는 보리로서, 보통 껍질을 벗기지 않은 보리를 의미한다. 껍질이 잘 분리되어 식용으로 주로 이용되는 쌀보리와는 달리 사료로 이용되는 경우가 많지만, 우수한 항산화력 및 활성산소 소거활성을 지닌 폴리페놀 추출물이 보리의 내부 배유조직 보다는 껍질을 포함하는 외층부 및 배아부위에 더 많이 함유되어 있다는 것이 알려지면서 겉보리 자체의 기능성 소재로서 연구가 이루어지고 있다 (Jo *et al.*, 2013; Tamagawa *et al.*, 1997).

최근 녹차추출물, 마늘, 감귤농축액, 한약재 등의 다양한 천연물을 버섯 재배의 배지로 활용하여 기존 버섯 및 천연물의 활성보다 증가된 생리활성을 갖는 새로운 기능성 식품 소재의 탐색에 대한 연구가 진행되고 있다 (Cho *et al.*, 1999). Kim 등 (2008)은 감귤농축액에 상황버섯, 운지버섯 및 꽃송이버섯을 배양하였을 때 기존 일반배지보다 인체유래 암세포에 대한 항암 효과가 높게 나타났다고 보고하였다. 또한, 한약재를 배지로 하여 장수상황버섯 균사체를 배양한 경우, 항산화 활성이 증진되는 것으로 보고되었다 (Shin *et al.*, 2008).

따라서, 본 연구는 다양한 생리활성 기능을 가진 겉보리와 영지버섯의 생물전환 (bioconversion)과 추출 용매에 따른 항산화 활성과 항염증을 평가하여 기능성 식의약품 신소재로서의 가능성을 제시하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 추출물 제조

본 실험에 사용된 겉보리 (*Hordeum vulgare* L.)는 충청북

도 충주시에서 생산되었으며, 영지버섯 균사체 (KTCT No. 26193)는 한국미생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, Jeongup, Korea)에서 구입하였다. 고압증기멸균기를 이용하여 가열 및 소재화한 겉보리를 배지로 하여 영지버섯 균사체를 접종시킨 후 온도 28°C, 습도 60%에서 40일간 배양하였다. 그 후 열풍건조기를 이용하여 40°C에서 3일간 건조 후 열수추출물은 시료 무게 10배의 증류수를 넣고 50°C에서 2시간, 3회 반복 추출하였다. 에탄올추출물은 시료 무게 10배의 70% 에탄올을 넣고 7일간 실온에서 침지추출을 하였다. 추출액은 Whatman 여과지 (Whatman No.1 filter paper, Whatman Co., Maidstone, England)를 사용하여 2회 감압 여과하고 회진 감압농축기 (EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 농축하여 동결건조 (Martin christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Germany) 한 뒤, 완전건 건조된 시료는 -20°C에 보관하여 사용하였다.

### 2) 시약

Gallic acid, D-catechin, ascorbic acid, Folin-Ciocalteu reagent, sodium nitrite, metaphosphoric acid, 2,6-dichloroindophenol sodium salt hydrate, citric acid, sodium citrate, acetic acid, anhydrous sodium phosphate (monobasic), 2,2-azino-bis (3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), potassium persulfate, ferrous sulfate heptahydrate (FeSO<sub>4</sub>) 등 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하여 사용하였다.

### 3) 세포배양

마우스 대식 세포주인 RAW264.7은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 구입하였고 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin (P/S) 등은 Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)사의 제품을 사용하여 세포를 배양하였다. 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM 배지로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에서 3일 간격으로 계대 배양하였다.

세포 실험을 위한 시약인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였고 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA)는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)사에서 구입하여 실험에 이용하였다.

### 2. 총 phenolic compound, flavonoid 및 ascorbic acid 함량 측정

총 phenolic compound 함량은 Folin-Ciocalteu's 방법으로 측정하였다 (Seo *et al.*, 2016). 시료 40  $\mu$ l에 1 M Folin-Ciocalteu (FC) reagent 20  $\mu$ l, 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 60  $\mu$ l을 혼합하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader (Soft Max Pro 5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 이용하여 표준 검량선을 작성하고 총 phenolic compound 함량을 시료 100 g 기준 mg·gallic acid equivalent (mg·GAE)으로 나타내었다.

Flavonoid 함량은 Kim 등 (2013)의 방법으로 측정하였다. 시료 25  $\mu$ l에 증류수 125  $\mu$ l로 희석한 후 5% NaNO<sub>2</sub> 8  $\mu$ l를 첨가한 후 5분간 상온에서 반응시켰다. 그 후 10% AlCl<sub>3</sub> 15  $\mu$ l를 넣고 6분간 반응 후 1 M NaOH 50  $\mu$ l와 증류수 27  $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 catechin를 이용하여 표준 검량선을 작성하고 flavonoid 함량을 시료 100 g 기준 mg·catechin equivalent (mg·CE)으로 나타내었다.

Ascorbic acid 함량은 Klein과 Perry (1982)의 방법으로 측정하였다. 시료 10 mg에 10 mg/ml metaphosphoric acid 1 ml을 넣고 상온에서 45분간 반응 후 여과하였다. 여과액 100  $\mu$ l에 0.05 mM 2,6-dichloroindophenol 900  $\mu$ l를 혼합하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 ascorbic acid를 이용하여 표준 검량선을 작성하고 ascorbic acid 함량을 시료 100 g 기준 mg·ascorbic acid으로 나타내었다.

### 3. DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical 소거능은 Lee 등 (2015)의 방법을 변형하여 측정하였다. 농도 별로 제조한 시료 80  $\mu$ l에 DPPH 용액 (0.2 mM in methanol) 80  $\mu$ l을 혼합한 후 암실에서 30분간 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. ABTS radical 소거활성 측정

ABTS radical 소거활성은 Yoon 등 (2016)의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS 수용액과 2.45 mM potassium persulphate를 혼합하여 암실상태에서 실온에 12-16시간 반응 시킴으로써 안정적인 ABTS 양이온 용액을 만들었다. 준비한 ABTS 양이온 용액을 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)를 이용하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02이 되도록 희석하였다. 농도 별로 제조한 시료 200  $\mu$ l에 ABTS 양이온 용액 800  $\mu$ l를 혼합한 후 5분간 실온에서 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. Nitrite 소거활성 측정

Nitrite 소거활성은 Choi 등 (2008)의 방법을 이용하여 측정하였다. 농도 별로 제조한 시료 1 ml에 1 mM NaNO<sub>2</sub> 1 ml,

0.2 M citrate buffer (pH 3.0) 8 ml를 넣고 혼합한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 혼합물 1 ml에 2% acetic acid 2 ml과 Griess reagent 400  $\mu$ l를 넣고 혼합하여 15분 동안 실온에서 반응 시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6. 환원력 측정

환원력 측정은 Chung 등 (2005)의 방법을 변형하여 측정하였다. 농도 별로 제조한 시료 1 ml에 0.2 M PBS (pH 6.6) 2.5 ml, 10 mg/ml potassium ferricyanide 2.5 ml 혼합시킨 후 50°C에서 20분 반응시켰다. 혼합물 5 ml에 100 mg/ml TCA (trichloroacetic acid) 용액 2.5 ml를 첨가하여 centrifuge 에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액 5 ml에 증류수 5 ml, 0.1% FeCl<sub>3</sub> 1 ml을 첨가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 7. 세포 내 ROS 측정

세포 내 ROS 형성은 fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)가 산화된 H<sub>2</sub>DCF-DA probe로 검출하였다 (Yeon *et al.*, 2013). RAW264.7 세포를 96 well plate에 5 × 10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 24시간 후 농도 별로 제조한 시료를 처리하여 24시간 배양하였다. 10 mM H<sub>2</sub>DCF-DA를 처리하고 40분 후 600  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 1시간 후 fluorescence microplate readers (Soft Max Pro 5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였다.

### 8. 세포생존율 측정

세포생존율은 RAW264.7 세포를 96 well plate에 5 × 10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 24시간 후 농도 별로 제조한 시료와 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 24시간 배양하였다. MTT 용액 (2 mg/ml) 50  $\mu$ l를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에서 2시간 반응하였다. 이후 배지를 제거하고 DMSO 150  $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 15분간 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 9. NO 생성 평가

활성 질소종인 nitric oxide (NO)의 생성량은 Green 등 (1982)의 방법으로 측정하였다. RAW264.7 세포를 96 well plate에 5 × 10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 24시간 후 농도 별로 제조한 시료와 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 상층액 80  $\mu$ l와 Griess reagent 80  $\mu$ l를 혼합하여 상온에서 15분 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 10. 통계분석

모든 측정값은 3회 이상 반복하여 평균값과 표준편차

(means ± SD)로 나타내었고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 Prism 5 GraphPad software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 이용 하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 Two-way ANOVA를 통해 bonferroni posttests로 유의성을  $p < 0.05$ 로 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 겉보리 영지버섯 추출물의 총 phenolic compound, flavonoid 및 ascorbic acid 함량

식물체내의 페놀화합물은 2차 대사산물이며 항산화, 항균 등 다양한 생리활성을 나타낸다. 특히 항산화 활성은 페놀성 화합물이 작용하는 것으로 보고되어 식물체가 가지는 페놀화합물의 함량을 측정하면 항산화능을 판단하는 기본적인 자료로 이용할 수 있다 (Sato *et al.*, 1996). 항산화제로 알려져 있는 ascorbic acid는 인체에 중요한 필수적인 성분 중 하나로서 성인이 하루에 필요한 ascorbic acid의 양은 남자는 70 mg이고 여성은 60 mg이다. 하지만 ascorbic acid는 인체내부에서 직접 만들어지지 않고 외부에서 섭취를 해야만 하는 성분이다 (Huang *et al.*, 2007).

본 연구 결과 겉보리 (*Hordeum vulgare* L.) 영지버섯 추출물의 총 phenolic compound, flavonoid 및 ascorbic acid 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 겉보리 영지버섯 열수 및 에탄올 추출물의 총 phenolic compound 함량은 각각 29.84 mg · GAE/100 g과 53.43 mg · GAE/100 g이고 flavonoid 함량은 각각 10.32 mg · CE/100 g과 13.31 mg · CE/100 g이며, ascorbic acid 함량은 각각 7.96 mg/100 g과 19.33 mg/100 g으로 나타났다. 비교적 높은 수율을 나타낸 겉보리 영지버섯 에탄올 추출물이 전반적으로 높은 총 phenolic compound, flavonoid 및 ascorbic acid 함량을 나타내었다.

Jo 등 (2013)은 보리가 도정이 진행될수록 보리의 총 phenol 함량이 감소한다고 보고하였으며, 보리 열수 추출물의

총 phenolic compound 함량은 5.67 mg/100 g으로 보고하였다. 이에 비해 겉보리에 영지버섯 균사체를 이용하여 생물전환한 겉보리 영지버섯 추출물은 높은 수율과 총 phenolic compound, flavonoid 및 ascorbic acid 함량을 나타내어 생물전환으로 인한 유효성분 증대로 판단된다.

### 2. 겉보리 영지버섯 추출물의 DPPH radical, ABTS radical, nitrite 소거활성

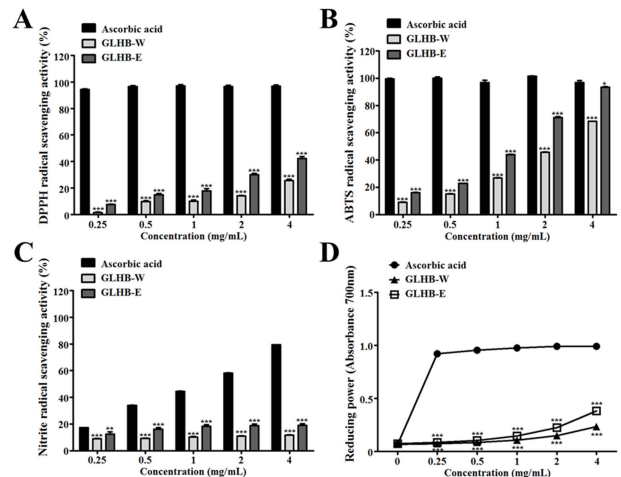
DPPH 라디칼 소거능은 DPPH가 비교적 안정한 자유 라디칼로 항산화 물질과 반응하면 산화성 자유 라디칼이 억제되어 안정한 형태로 전환되는 원리를 이용하여 다양한 화합물의 항산화 활성을 평가하기 위해 널리 사용된다 (Hu and Kitts, 2000). 겉보리 영지버섯 물 또는 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 그래프로 나타낸 것으로, 농도 2 mg/ml에서 14.07% (GLHB-W), 30.15% (GLHB-E)로 나타났다. 대조군으로 사용한 ascorbic acid는 2 mg/ml에서 101.5% 소거능을 나타냈다 (Fig. 1A).

ABTS 라디칼 소거능 측정은 ABTS가 산화 유도제인 potassium persulfate와 반응하여 청록색의 ABTS 양이온을 형성하고 항산화 물질의 전자공여능으로 인한 탈색반응을 통해 항산화능을 측정하는 방법이다 (Adedapo *et al.*, 2008). 겉보리 영지버섯 추출물의 ABTS 라디칼 소거능을 그래프로 나타낸 것으로, 농도 2 mg/ml에서 45.65% (GLHB-W), 71.24% (GLHB-E)로 나타났다. 대조군으로 사용한 ascorbic acid는

**Table 1.** Total phenolic compound, flavonoid, ascorbic acid content and yield of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley (GLHB) extracts.

Extract	Total phenolic compound (mg · GAE <sup>1</sup> )/100 g of dry mass	Flavonoid (mg · CE <sup>2</sup> )/100 g of dry mass	Ascorbic acid (mg/100 g of dry mass)	Yield (%)
GLHB-W	29.84 ± 1.40	10.32 ± 0.51	07.96 ± 0.88	17.69
GLHB-E	53.43 ± 1.30	13.31 ± 0.74	19.33 ± 1.29	25.77

The values are the means ± SD from triplicate independent experiments. GLHB-W; Water extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley, GLHB-E; Ethanol extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley. <sup>1</sup>GAE; Gallic acid equivalent. <sup>2</sup>CE; Catechin equivalent.



**Fig. 1.** Anti-oxidative activities of the extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley (GLHB). A; DPPH radical scavenging activity, B; ABTS radical scavenging activity, C; nitrite scavenging activity, D; reducing power. The values are the means ± SD from triplicate independent experiments (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). GLHB-W; Water extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley, GLHB-E; Ethanol extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley.

2 mg/ml 에서 101.5% 소거능을 보였다 (Fig. 1B).

Nitrite는 식품의 발색, 풍미증진, 항균작용 및 산패 방지를 위해 첨가제로 사용되고 있지만 amine류를 함유하고 있는 식품을 섭취 시 인체 내에서 니트로화 반응으로 인해 발암물질인 nitrosamine이 생성될 가능성이 매우 높으며 특히 산성조건에서 쉽게 발생한다 (Kim *et al.*, 2013). 또한 nitrite는 체내에서 신체기능의 조절에 관여하여 염증질환을 유도하기도 한다 (Hong *et al.*, 2003). 겉보리영지버섯 추출물의 nitrite 소거능을 그래프로 나타낸 것으로, 농도 2 mg/ml 에서 10.92% (GLHB-W), 18.74% (GLHB-E)로 나타났다. 대조군으로 사용한 ascorbic acid는 2 mg/ml 에서 58.27% 소거능을 보였다 (Fig. 1C).

높은 수율과 총 phenolic compound, flavonoid 및 ascorbic acid 함량을 나타내었던 겉보리 영지버섯 에탄올추출물은 열수 추출물에 비해 높은 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성을 나타내었다. Ku 등 (2009)과 Park 등 (2016)이 보고한 총 phenolic compound 함량이 높을수록 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보이며, flavonoid 성분과 ABTS 라디칼 사이에도 높은 연관관계가 있다는 것을 확인하였다. 또한 에탄올 추출물은 nitrite 소거능 또한 저농도에서 비교적 높은 소거능을 보였는데 이는 ascorbic acid는 nitrosamine의 형성을 억제하여 ascorbic acid 함량이 높을수록 높은 nitrite 소거능을 보인다는 연구결과와 일치하였다 (Lee and Ahn, 1997).

### 3. 겉보리 영지버섯 추출물의 환원력

환원력을 평가는 ferric-ferricyanide ( $Fe^{3+}$ )혼합물이 수소를 공여하여 자유 라디칼을 안정화시켜 ferrous ( $Fe^{2+}$ )로 전환하는 환원력을 흡광도 값으로 나타낸 것으로, 이  $Fe^{3+}$ 의 감소는 페놀 화합물로부터 수소 원자의 보냄으로써 일어난다 (Gülçına *et al.*, 2003). 겉보리 영지버섯 추출물의 환원력 측정된 결과 농도 0.25 mg/ml에서 ascorbic acid 다음으로 겉보리 영지버섯 에탄올추출물이 높은 환원력을 나타냈다 (Fig. 1D). Ascorbic acid 같은 reductone의 항산화 반응은 hydrogen atom을 제공하여 자유 라디칼 연쇄를 변환하여 일어나며, 또한 과산화의 일정한 전구물질과 반응하여 과산화의 형성을 방해한다. Flavonoid에 속하는 flavonoid는 free radical과 반응하거나 전자를 제공하여 자유 라디칼의 연쇄반응을 종료한다고 보고되었다 (Wettasinghe and Shahidi, 1999). 따라서 겉보리 영지버섯 에탄올 추출물에서 비교적 높은 flavonoid 및 ascorbic acid 함량을 나타내어 비교적 높은 환원력이 있는 것으로 판단된다.

### 4. 겉보리 영지버섯 추출물의 $H_2O_2$ 로 유도된 세포 내 ROS 생성 억제 효과

겉보리 영지버섯 열수 및 에탄올 추출물을 세포생존율을 측

정한 결과, 열수 추출물은 50  $\mu$ g/ml에서 86.55%의 세포 생존율을 보였으며, 100  $\mu$ g/ml 농도 이상에서는 농도가 높아짐에 따라 생존율이 낮아짐을 확인하였다. 반면 에탄올 추출물은 고농도인 3,000  $\mu$ g/ml에서도 92.82%의 생존율을 보임으로써 겉보리 영지버섯 에탄올추출물이 세포에 미치는 영향이 낮은 것으로 나타났다 (data not shown).

세포 내에서 산화 스트레스에 의해 발생하는 ROS에 대한 겉보리 영지버섯 추출물의 억제활성을 알아보기 위해 RAW264.7에  $H_2O_2$ 로 산화 스트레스를 유도한 뒤 DCFH-DA probe를 이용하여 ROS의 양에 따른 형광발생 정도를 측정하였다.  $H_2$ DCF-DA는 세포 내 활성산소 (ROS) 표지자 등으로 사용하는 fluorescein이 화학적으로 환원된 형태로서 세포막을 통과하여 확산할 수 있다. 세포막을 통과한 DCFH-DA는 세포질에서 세포 내 esterase에 의해 비형광물질인 DCFH로 가수분해된다. ROS 존재 시에 DCFH는 산화되어 형광도가 높은 DCF로 전환된다. 따라서 세포 내 ROS의 양이 많을수록 측정되는 형광값이 커지므로, 추출물 내에 항산화 물질이 존재하는 경우 ROS 생성이 억제되어 DCF 형광도가 감소되는 것을 이용하여 측정한다 (Choi *et al.*, 2006; Kim and Park, 2011).

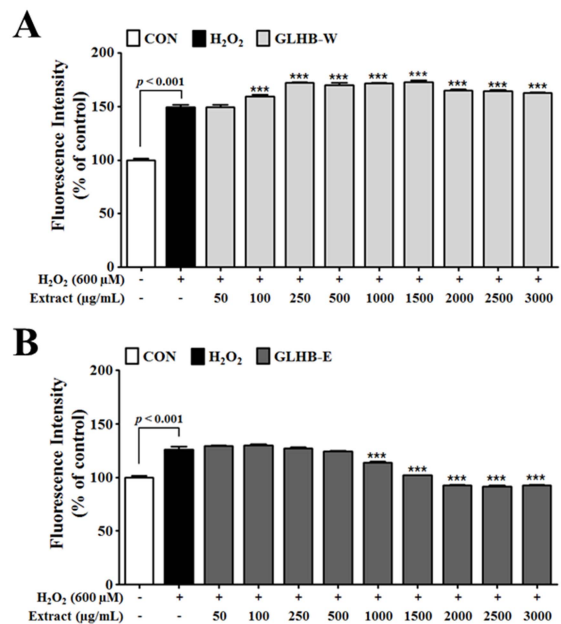


Fig. 2.  $H_2O_2$ -induced generation of intracellular ROS levels on the extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley (GLHB). A; GLHB-W, B; GLHB-E. The values are the means  $\pm$  SD from triplicate independent experiments. Two-way analysis of variance followed by Dunnett's *t*-test ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ). GLHB-W; Water extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley, GLHB-E; Ethanol extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley.



대조군에 비해 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 1시간 처리한 negative control의 intercellular ROS 생성은 약 1.2 - 1.5배 증가하였으며, 결보리 영지버섯 추출물을 50 - 3,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 전처리한 경우 열수 추출물은 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도부터 ROS 생성이 증가하는 경향을 보였다. 이는 세포생존율의 감소로 인해 활성산소의 생성을 억제할 수 있는 능력이 상실되거나 미토콘드리아의 기능이상 등의 문제로 생겨난 활성산소의 증가로 인한 결과로 판단된다. 에탄올 추출물은 negative control (125.85%) 대비 농도의존적으로 92.26%까지 ROS 생성이 저해 되는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 이상의 결과는 결보리 영지버섯 에탄올추출물의 polyphenol 성분의 항산화 활성이  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 유도한 세포 내 ROS 소거능과 상관관계를 갖고 있는 것으로 사료된다.

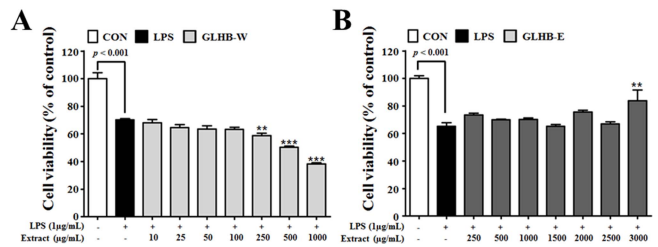
### 5. 결보리 영지버섯 추출물의 LPS로 유도된 세포생존율과 NO 생성 억제효과

세포손상에 따른 세포사멸은 특히 염증성 질환과 밀접한 관계를 갖고 있는데 염증반응은 이러한 자유라디칼에 의하여 생체 내의 조직 손상을 유발하고 그 외 감염에 의해 발생한다 (Jin *et al.*, 2010). 대표적인 요인으로 인체의 대식세포 (macrophage)가 외부의 자극이나 침입한 병원체에 반응하여 염증유발인자인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6와 같은 cytokine을 생성하고 또한 iNOS와 COX-2를 합성하여 NO 및 PGE<sub>2</sub>를 생성한다 (Nguyen *et al.*, 2013). LPS는 내독소 중 하나로 대식세포인 RAW264.7에 대해 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키고, NO, PGE<sub>2</sub>등의 염증매개물질을 분비한다 (Kim and Son, 2014). 이러한 LPS를 통해 RAW264.7에 염증을 유도한 후, 추출물의 각 농도에 대한 세포생존율 및 NO 생성에 대한 억제효과를 평가하였다. 특히 염증과 관련된 실험에서는 추출물 자체의 세포생존율을 참고하여 열수 및 에탄올 추출물의 농도를 다르게 처리하였다.

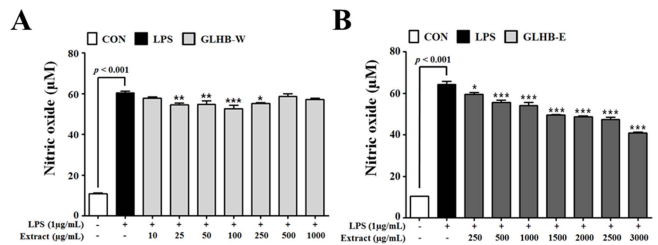
MTT를 이용하여 결보리 영지 열수추출물이 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리된 세포생존율에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, LPS 처리 군에서 약 65%로 세포수가 감소하였고 열수추출물은 농도가 높아질수록 세포생존율이 점점 감소하는 경향을 보였다. 반면 에탄올추출물 3,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포생존율이 유의적으로 증가하였다 (Fig. 3).

NO 생성은 아질산이나 아질산이온의 검출 및 정량에 사용되는 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 대조군에 비해 LPS 처리 시 NO는 약 5배 증가하였고, 결보리 영지 열수추출물은 농도가 높아짐에도 불구하고 NO 생성에는 차이가 없었다. 반면 에탄올추출물은 농도의존적으로 감소하는 경향을 보였으며 3,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 약 63%까지 저해되었다 (Fig. 4).

Park 등 (2013)은 균주별 영지버섯 균사체 추출물 100  $\mu\text{g}/$



**Fig. 3. Cell viability of the extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley (GLHB).** A; GLHB-W, B; GLHB-E. The values are the means  $\pm$  SD from triplicate independent experiments. Two-way analysis of variance followed by Dunnett's *t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). GLHB-W; Water extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley, GLHB-E; Ethanol extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley.



**Fig. 4. LPS-induced NO production of the extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley (GLHB).** A; GLHB-W, B; GLHB-E. The values are the means  $\pm$  SD from triplicate independent experiments. Two-way analysis of variance followed by Dunnett's *t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). GLHB-W; Water extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley, GLHB-E; Ethanol extract of *Ganoderma lucidum* cultured on hulled barley.

$\text{mL}$ 에서 LPS를 처리한 세포생존율에서의 영향은 없고 NO 생성을 50 - 80%까지 억제하였다고 보고하였다. 균주별로 차이는 있었지만 영지버섯 균사체추출물의 항염증 효능을 확인하였다. 따라서 결보리 영지버섯 에탄올추출물의 항염증 효과가 있음을 시사하는 바이다.

본 연구는 결보리에 영지버섯 균사체를 생물전환하여 결보리 영지버섯이라는 신소재를 개발하고 결보리 영지버섯 추출물의 항산화 및 항염증 효과를 알아보았다. 연구 결과 결보리 영지버섯 에탄올추출물에서 비교적 높은 항산화 활성을 나타내었고 RAW264.7에서  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 유도한 ROS 생성 억제활성 및 LPS로 유도한 NO 생성 억제효과를 보였다. 이상의 결과를 통해 신소재인 결보리 영지버섯 추출물에는 비극성 혹은 지용성의 기능성 성분이 있을 것으로 기대되며 추후 성분분석과 작용기전에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 따라서 결보리 영지버섯 에탄올추출물은 항산화 및 항염증 효과를 지닌 기능성 식의약품 신소재로서 가능성을 제시하였다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업(과제번호: 116007-03)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Adedapo AA, Jimoh FO, Koduru S, Masika PJ and Afolayan AJ.** (2008). Evaluation of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Halleria lucida*. *Bioresource Technology*. 99:4158-4163.
- Bohr VA.** (2002). Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 32:804-812.
- Cho SM, Park JS, Kim KP, Cha DY, Kim HM and Yoo ID.** (1999). Chemical features and purification of immunostimulating polysaccharides from the fruit bodies of *Agaricus blazei*. *The Korean Journal of Mycology*. 27:170-174.
- Choi DJ, Lee SJ, Kang MJ, Cho HS, Sung NJ and Shin JH.** (2008). Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 37:465-471.
- Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB and Lee J.** (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*. 99:381-387.
- Chung YC, Chen SJ, Hsu CK, Chang CT and Chou ST.** (2005). Studies on the antioxidative activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. *Food Chemistry*. 91:419-424.
- Delanty N and Dichter MA.** (1998). Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurologica Scandinavica*. 98:145-153.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS and Tannenbaum SR.** (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 126:131-138.
- Gülçına İ, Oktayb M, Kireççic E and Küfrevioğlu Öİ.** (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*. 83:371-382.
- Hong IJ, Park HG, Jew SS, Kim KT and Lee SH.** (2003). Functional characteristics from the barley leaves and its antioxidant mixture: Study on the nitrite scavenging effect. *Applied Biological Chemistry*. 46:333-337.
- Hu C and Kitts DD.** (2000). Studies on the antioxidant activity of *Echinacea* root extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:1466-1472.
- Huang HZ, Zhang CH, Yang EY, Lee SG, Choi KY and Yun HK.** (2007). Effect of nutrient solution for hydroponics of *Liliaceae* leaf vegetables on the amount of ascorbic acid in Chinese chive. *Journal of Bio-Environment Control*. 16:222-227.
- Hyun JN, Kweon SJ, Park DS, Ko JM, Han SI, Lim SG and Suh SJ.** (2008). A new high quality and yielding barley variety "Geungangbori" with lodging resistance. *Korean Journal of Breeding Science*. 40:474-478.
- Jin JH, Kim JS, Kang SS, Son KH, Chang HW and Kim HP.** (2010). Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of total flavonoids of the roots of *Sophora flavescens*. *Journal of Ethnopharmacology*. 127:589-595.
- Jo SH, Cho CY, Ha KS, Choi EJ, Kang YR and Kwon YI.** (2013). The antioxidant and antimicrobial activities of extracts of selected barley and wheat inhabited in Korean peninsula. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 42:1003-1007.
- Jun DH, Kim HY, Han SI, Kim YH, Kim SG and Lee JT.** (2013). Studies on antioxidant effect of mushroom complex. *Journal of Life Science*. 23:377-382.
- Kalra S and Jood S.** (2000). Effect of dietary barley  $\beta$ -glucan on cholesterol and lipoprotein fractions in rat. *Journal of Cereal Science*. 31:141-145.
- Kim DH, Park SR, Debnath T, Hasnat M, Pervin M and Lim BO.** (2013). Evaluation of the antioxidant activity and anti-inflammatory effect of *Hericium erinaceus* water extracts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 21:112-117.
- Kim MC, Kim JS and Heo MS.** (2008). Antibacterial, antioxidant and antitumor activities of mushroom mycelium mixed culture extracts. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*. 23:158-163.
- Kim MJ and Park EJ.** (2011). Feature analysis of different *in vitro* antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 40:1053-1062.
- Kim YJ and Son DY.** (2014). Inflammatory mediator regulation of the *Zizyphus jujube* leaf fractions in the LPS-stimulated RAW264.7 mouse macrophage. *Korean Journal of Food Preservation*. 21:114-120.
- Klein BP and Perry AK.** (1982). Ascorbic acid and vitamin a activity in selected vegetables from different geographical areas of the united states. *Journal of Food Science*. 47:941-945.
- Ku KM, Kim SK and Kang YH.** (2009). Antioxidant activity and functional components of corn silk (*Zea mays* L.). *Korean Journal of Plant Resources*. 22:323-329.
- Lee HJ, Lee SW, Park CG, Ahn YS, Kim JS, Bang MS, Oh CH and Kim CT.** (2015). Effects of white *Hibiscus syriacus* L. flower extracts on antioxidant activity and bone resorption inhibition. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 23:190-197.
- Lee JM and Ahn MS.** (1997). A study on nitrite scavenging ability of tea extracts. *Journal of the Korean Society of Food Culture*. 12:567-572.
- Nguyen TK, Shin DB, Lee SM, Im KH, Lee TS and Lee UY.** (2013). Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol and hot water extracts of *Pholiota nameko* fruiting bodies. *The Korean Journal of Mycology*. 41:97-103.
- Park MY, Yu CG and Park YH.** (2016). Effects of roasting and peeling process and extraction temperature on the antioxidant activity of burdock tea. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 24:351-359.
- Park YJ, Nam JY, Yoon DE, Kwon OC, Kim HI, Yoo YB, Kong WS and Lee CS.** (2013). Comparison of anti-inflammatory, antioxidant and anti-allergic effects of *Ganoderma* species mycelial extracts. *Journal of Mushroom*. 11:111-115.
- Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M and**

- Ochi H.** (1996). Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44:37-41.
- Seitz HK and Stickel F.** (2006). Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biological Chemistry*. 387:349-360.
- Seo KH, Lee JY, Debnath T, Kim YM, Park JY, Kim YO, Park SJ and Lim BO.** (2016). DNA protection and antioxidant potential of chestnut shell extracts. *Journal of Food Biochemistry*. 40:20-30.
- Shin YK, Jang HS, Kim JS, Ryu HY, Kim JK, Kwun IS and Sohn HY.** (2008). Solid fermentation of medicinal herb using *Phellinus baumii* mycelium and anti-thrombin and antioxidation activity of its methanol extract. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. 36:201-208.
- Song ES, Park SJ, Woo NRA, Won MH, Cho JS, Kim JG and Kang MH.** (2005). Antioxidant capacity of colored barley extracts by varieties. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 34:1491-1497.
- Tamagawa K, Iizuka S, Fukushima S, Endo Y and Komiyama Y.** (1997). Antioxidative activity of polyphenol extracts from barley bran. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*. 44:512-515.
- Wettasinghe M and Shahidi F.** (1999). Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage(*Borago officinalis* L.) seeds. *Food Chemistry*. 67:399-414.
- Yeon SH, Ham HM, Sung JH, Kim YH, Namkoong SG, Jeong HS and Lee JS.** (2013). Antioxidant activities of hot water extract from cornus walteri wanger against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide in HepG2 cells. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 42:1525-1532.
- Yoon KK, Moon KG, Kim SU, Um IS, Cho YS, Kim YG and Rho IR.** (2016). Analysis of growth and antioxidant compounds in deodeok in response to mulching materials. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 24:183-190.