J East Asian Soc Diet Life
26(5): 418~426 (2016)
http://dx.doi.org/10.17495/easdl.2016.10.26.5.418

상황버섯 균사체를 이용한 찰수수 발효 추출물의 항산화 활성 및 암세포에 대한 세포 독성 연구

장매위 · 박미혜 · 김미라†

경북대학교 식품영양학과

Study on Antioxidant Activity and Cytotoxicity in Cancer Cells of Extract from Waxy Sorghum fermented with *Phellinus linteus* Mycelium

Mei-Wei Zhang, Mi-Hye Park and Meera Kim†

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

ABSTRACT

Studies have been conducted on fermentation products known to increase biological activity through bioconversion of mycelium. In this study, ethanol extract of waxy sorghum (WS) and ethanol extract of waxy sorghum fermented with *Phellinus linteus* mycelium (WSPM) were prepared, and functional component contents, antioxidant activity, and cytotoxicity were analyzed. Total polyphenol contents and total flavonoid contents of WSPM were higher than those of WS. In addition, the β-glucan content of WS was higher than that of WSPM. DPPH and ABTS radical scavenging activities showed that WSPM had higher antioxidant activity than WS at all concentrations. Analysis of SOD-like activity also showed higher antioxidant activity in WSPM. MTT assay demonstrated that WSPM exhibited high inhibitory activity in all cancer cells, and in particular, in HeLa cells with the highest inhibition. A concentration-dependent increase in anticancer activities of WS and WSPM was detected in all cancer cells, which was identical to the SRB assay result. MTT and SRB assay showed the increased cytotoxicity of WSPM in cancer cells. Therefore, it is expected that WSPM can be used as a functional food material.

Key words : *Phellinus linteus* mycelium, waxy sorghum, antioxidant activity, cytotoxicity

서 론

수수(*Sorghum bicolor* L. Moench)는 한해살이 화본과에 속하는 식물로 고온 다습한 환경에서 생장하고 내건성이 강한 잡곡이다. 수수의 단백질, 탄수화물, 식이섬유 함량은 다른 잡곡에 비해 상대적으로 높고, 지방 함량은 낮은 것으로 알려져 있다(Hulse JH 등 1980). 수수에는 tannins, phenolic acids, anthocyanins, phytosterols, policosanols 등과 같은 페놀성 화합물이 다른 잡곡보다 많이 함유되어 있으며(Dykes L & Rooney LW 2006), 수수에 함유된 폴리페놀 화합물은 항암활성, 항산화 활성, 면역증진 효과(Awika JM 등 2009, Kim KO 2004)가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 수수의 플라보노이드에서 분리된 apigenin은 자궁경부암 세포인 HeLa, 대장암 세포인 HCT116 및 HT29에 대해 우수한 항암 효과를 나타내는 것으로 보고되었다(Kim JS 등 2011).

한편, 버섯은 담자균에 속하는 고등균류로서 칼로리는 낮고 특유의 향과 식감을 가지고 있어 다양한 음식의 식재료로 이용되고 있다. 뿐만 아니라 버섯은 예로부터 한의학에서 약재로 이용되어 왔으며, 항산화 활성, 항암 활성 및 항염증 활성이 높은 것으로 알려지면서 다양한 기능성 식품으로 이용되고 있다. 대표적인 약용버섯인 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 소나무 비늘버섯과(Hymenochaetaceae) 진흙버섯속(*Phellinus*)으로 분류되고, 항암 활성, 면역증강 효과 및 항바이러스 활성이 뛰어나며(Sin OS 2004), 그밖에도 항산화 활성, 항염증 활성, 항진통 효과와 같은 다양한 생리활성을 가진 것으로 알려져 있다(Kim SH 2002).

이와 같이 다양한 생리활성을 가지는 상황버섯은 자실체뿐만 아니라, 균사체에도 우수한 생리활성 성분이 함유되어 있다고 보고되면서 균사체를 이용한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 상황버섯 균사체의 생리활성을 연구한 Chung KS 등(1993)은 상황버섯 균사체에서 분리된 단백다당체는 Sarcoma 180 복강암을 효과적으로 억제시켰을 뿐만 아니라 면역증진 효과도 우수하다고 하였다(Lee BE 등 2012). 상황버섯 균사체를 다른 기질에 접종시켜 발효물의 생리활성 변화를 분석한 연구들도 수행되었는데, 장수 상황버섯 균사체

† **Corresponding author :** Meera Kim, Tel: +82-53-950-6233, Fax: +82-53-950-6229, E-mail: meerak@knu.ac.kr

를 36종 한약재에 접종시켜 생리활성을 확인한 Shin YK 등(2008)의 연구에서는 장수 상황버섯 균사체로 배양시킨 한약재의 항산화 활성이 증가되었다고 하였다. 또한, Hong JY (2014)는 상황버섯 균사체를 이용하여 발효한 수삼이 마우스의 중성지방과 혈중 콜레스테롤을 낮추었다고 하였으며, Kim H 등(2010)은 상황버섯 균사체로 발효한 수삼의 면역 활성이 발효 전보다 증가되었다고 보고하였다.

지금까지 수행된 연구들은 대부분 한약재를 이용한 균사체 발효 연구들로 우리가 일상적인 식생활에서 이용하고 있는 곡물을 이용하여 균사체를 발효한 발효물에 대한 연구는 미흡한 형편이다. 더욱이 상황버섯은 약리적 효과가 높은 버섯으로 알려져 있으며, 찰수수도 항산화성, 항암성 등이 높은 것으로 알려져 있어, 본 연구에서는 이들을 함께 발효시켜 생물학적 전환을 통해 생리활성이 증대된 기능성 식품소재를 탐색하고자 하였다. 이를 위해 본 연구에서는 상황버섯 균사체를 찰수수에 접종하여 발효시킨 다음, 발효 전과 발효 후의 유용 성분, 항산화 활성 및 암세포에 대한 세포 독성을 분석하여 발효물의 기능성에 대해 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 찰수수(waxy sorghum)는 농협에서 구입하였으며, 상황버섯 균사체(*Phellinus linteus* mycelium. KFRI 318)는 국립산림과학원에서 분양받아 4℃에서 냉장 보관하여 사용하였다.

2. 시약

실험에 사용된 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl(DPPH), 2-2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt (ABTS), tirs(hydroxymethyl)amino-methane, hydrochloric acid, ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), pyrogallol, dimethyl sulfoxide(DMSO), L-ascorbic acid, thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT), sulforhodamine B(SRB), trichloroacetic acid (TCA), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, quercetin, potassium hydroxide, sodium chloride, potassium chloride, trizama base는 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하였다. 세포배양에 사용한 fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin solution, trypsin 0.25% EDTA solution, Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium(DMEM/high glucose), roswell park memorial institute medium(RPMI-1640 with L-glutamin), minimum essential medium(MEM)은 Hyclone Co. (USA)에서 구입하였다. 균사체 배양에 사용한 potato dextrose agar(PDA)와 potato dextrose broth(PDB)는 Acumedia Co(USA)에서 구입하였다.

3. 균사체 배양 및 상황버섯 균사체 찰수수 발효물 제조

상황버섯 균사체를 직경 5 mm 크기로 취하여 PDA에 접종하고, 25℃에서 7일 동안 배양하였으며, 4주마다 계대 배양하여 사용하였다. 배양된 균총은 cork borer(∅: 8 mm)로 절취하여 멸균된 PDB에 5개의 disk를 접종한 뒤 25℃에서 7일 동안 100 rpm으로 진탕 배양하였다. 찰수수는 증류수에 침지시킨 후, 121℃에서 15분 동안 autoclave로 고압 멸균하였다. 그 후 PDB에서 배양한 균총을 멸균된 찰수수에 접종한 뒤, 25℃의 배양기에서 7일 동안 정치 배양하여 상황버섯 균사체 찰수수 발효물을 제조하였다.

4. 에탄올 추출물 제조

80% 에탄올 1 L에 멸균한 찰수수 및 상황버섯 균사체 찰수수 발효물 100 g을 첨가하여 25℃에서 24시간 동안 교반하며 추출하였다. 추출물은 여과지(Toyo No. 2, Advantec, Japan)를 이용하여 여과하고, 감압농축기(LABOROTA 4000-efficient, Heidolph Instruments GmbH & Co., KG, Germany)를 이용하여 농축한 후 동결건조기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Japan)에서 건조하여 실험에 사용하였다.

5. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 법(Re R 등 1998)으로 측정하였다. 희석된 시료 1 mL에 증류수 5 mL를 혼합한 후, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL를 가하고, vortex로 혼합하여 8분간 반응시키고, 여기에 7% Na_2CO_3 10 mL를 첨가하였다. 증류수를 이용하여 최종 부피를 25 mL로 맞춘 후 상온의 암소에서 2시간 동안 방치한 다음 UV/Vis spectrophotometer(DU 800, Beckman, USA)로 750 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 사용하여 검량곡선을 작성하고 총 폴리페놀 함량을 구하였다. 총 폴리페놀 함량은 시료 g당 gallic acid 당량의 mg(mg GAE/g)으로 표시하였으며, 3회 반복 측정한 후 평균값으로 나타내었다.

6. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno MI 등(2000)의 방법을 이용하여 측정하였다. 희석된 시료 500 μL를 취한 후 10% aluminum nitrate 1 mL와 1 M potassium acetate 100 μL, 80% 에탄올 4.3 mL를 순서대로 첨가한 후 암소에서 40분 동안 반응시킨 다음, UV/Vis spectrophotometer로 510 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 quercetin을 사용하여 검량곡선을 작성하고 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량은 시료 g당 quercetin 당량의 mg(mg QE/g)으로 표시하였으며, 3회 반복 측정한 후 평균값으로 나타내었다.

7. β-Glucan 함량 측정

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

8. DPPH Radical 소거 활성 측정

DPPH radical에 대한 소거 효과 측정은 Blois MS(1958)의 방법을 이용하여 측정하였다. 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)를 이용하여 희석된 시료 1 mL에 7.5×10^{-5} M DPPH 용액 2 mL를 첨가하여 교반한 후, 37℃ 암소에서 30분간 반응시켰다. 이것을 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, positive control로는 L-ascorbic acid를 사용하였다. DPPH radical 소거 활성은 아래 공식을 이용하여 백분율을 구하였으며, 3회 반복 측정한 후 평균값으로 나타내었다.

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

9. ABTS Radical 소거 활성 측정

ABTS radical 소거 활성 측정은 Re R 등(1999)의 방법을 이용하여 측정하였다. 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate 용액을 혼합하고 30℃ 암소에서 12시간 방치하여 ABTS 양이온을 형성시켰다. 그 후 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 413 nm에서 흡광도가 0.7이 되도록 0.005 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 4 mL에 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)로 희석된 시료 40 μL를 가하여 1분간 반응시킨 후 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 413 nm에서 흡광도를 측정하였으며, positive control로는 L-ascorbic acid를 사용하였다. ABTS radical 소거 활성은 DPPH radical 소거 활성 측정 공식과 동일한 식을 이용하여 구하였으며, 3회 반복 측정한 후 평균값으로 나타내었다.

10. Superoxide Dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund S & Marklund G(1974)의 방법을 이용하여 측정하였다. 각 농도별로 희석된 시료 0.2 mL에 tris-HCl buffer(pH 8.5) 3 mL를 가하여 혼합시켰다. 여기에 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 첨가하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 산화된 pyrogallol의 생성량은 UV/Vis spectrophotometer을 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였으며, positive control로는 L-ascorbic acid를 사용하였다. SOD 유사활성은 아래 공식을 이용하여 백분율을 구하였으며, 3회 반복 측정한 후 평균값으로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성(\%)} = \left(\frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구의 흡광도}}\right)\times 100$$

11. 세포주 배양

실험에 사용한 인체 세포는 위암 세포(AGS), 유방암 세포(MCF-7), 간암 세포(Hep 3B), 자궁경부암 세포(HeLa) 및 정상 자궁 세포(HeLa 229)이며, 세포는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, KCLB, Korea)에서 분양받아 사용하였다. AGS, MCF-7 및 HeLa 229는 RPMI- 1640 배지, Hep 3B는 DMEM 배지, HeLa는 MEM 배지를 사용하여 배양하였다. 각 배지에 10%(w/v) FBS 및 1%(w/v) penicillin streptomycin을 첨가한 복합배지를 조제하여 배양에 사용하였으며, 37℃, 5% CO_2 incubator에서 4일 간격으로 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

12. MTT Assay

MTT assay는 Carmichael J 등(1987)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 선배양한 암세포를 1×10^5 cells/mL의 농도로 맞춘 후 96 well plate에 180 μL씩 첨가하고, 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지 80 μL를 제거하고, 각 well에 시료를 농도별로 100 μL씩 첨가하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 well에 5 mg/mL의 MTT 용액을 20 μL씩 첨가하여 4시간 동안 배양한 후 96 well plate 바닥에 형성된 formazan이 분산되지 않도록 주의하면서 well의 배양액을 제거하였다. 배양액을 제거한 후 DMSO와 ethanol을 1:1 비율로 혼합한 용액을 150 μL씩 각 well에 첨가하여 30분간 흔들어 반응시킨 뒤, ELISA reader(Versamax, Molecular Device, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 무첨가구는 시료 대신 PBS를 첨가하여 위와 동일한 방법으로 실험하였다. 세포 독성은 암세포에 대한 시료 무첨가구와 시료 첨가구의 세포 독성을 비교하여 구하였으며, 3회 반복 측정한 후 평균값으로 나타내었다.

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

13. SRB Assay

SRB assay는 Doll R & Peto R(1981)의 방법을 이용하여 측정하였다. 암세포를 5×10^4 cells/mL의 농도로 맞춘 후 96 well plate에 100 μL씩 첨가하고, 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 각 well에 시료를 농도별로 100 μL씩 첨가하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 48시간 동안 선배양하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음, 각 well에 10% TCA 100 μL를 첨가하여 4℃에서 반응시켰다. 1시간 후 TCA를 제거하고 96 well plate를 멸균수로 5회 세척하여 실온에서 건조한 후, 각 well에 1% acetic acid에 용해한 0.4%(w/v) SRB 용액을 100 μL씩 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. SRB로 염색된 96 well plate를 1% acetic acid로 5회 세척한 뒤 상온에서 건조시켰다. 건조된 96 well plate에 10 mM tris buffer (pH 10.5) 100 μL를 각 well에 첨가한 다음 ELISA reader를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 시료 무첨가구는 시료대신 멸균수를 이용하여 위와 동일한 방법으로 실험하였다. 세포 독성은 암세포에 대한 시료 무첨가구와 시료 첨가구의 세포 독성을 비교하여 MTT assay와 같은 식을 이용하여 구하였으며, 3회 반복 측정한 후 평균값으로 나타내었다.

14. 통계분석

모든 측정한 값은 평균값±표준편차로 표시하였으며, 통계처리는 SPSS program(version 22, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분산분석(ANOVA, analysis of variance) 및 *t*-test로 분석하였다. 측정한 각 시료들 간의 유의성 검증을 실시하였고, 사후검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 함량

본 연구에서 찰수수의 에탄올 추출물(WS)과 찰수수와 상황버섯 균사체 발효물의 에탄올 추출물(WSPM)의 총 폴리페놀 함량은 각각 48.60 mg GAE/g, 67.80 mg GAE/g으로, 찰수수가 발효과정을 거치면서 총 폴리페놀 함량이 유의적으로 증가된 것으로 나타났다(Table 1). 이러한 결과는 상황버섯 균사체로 발효된 홍삼의 폴리페놀 함량이 발효 전에 비해 유의적으로 증가하였다고 보고한 Ryu JS(2011)의 연구와 장수진흙버섯 균사체로 발효한 유색미 추출물의 총 폴리페놀 함량이 발효 전의 유색미 추출물보다 유의적으로 높았다고 보고한 Kim S(2012)의 결과와 일치하였다. 이와 같이 발효과정을 거친 찰수수의 총 폴리페놀과 함량이 증가된 것은 상황버섯 균사체와의 발효과정에서 폴리페놀 성분이 합성이 되되었 때문인 것으로 사료된다.

Table 1. Contents of total polyphenol, total flavonoid, and β-glucan of ethanol extracts from waxy sorghum and waxy sorghum fermented with *Phellinus linteus* mycelium

Sample[1)]	Total polyphenols (mg GAE/g)[2)]	Total flavonoids (mg QE/g)[3)]	β-glucan (%)
WS	48.60±0.05	17.14±0.75	7.69±0.18
WSPM	67.80±0.06[***4)]	28.91±0.72[***]	12.24±0.31[***]

[1)] WS: Ethanol extract from waxy sorghum, WSPM: Ethanol extract from waxy sorghum fermented with *Phellinus linteus* mycelium.
[2)] mg of gallic acid equivalents/g of sample.
[3)] mg of quercetin equivalents/g of sample.
[4)] Star marker indicates significant difference between WS and WSPM by Student's *t*-test ([***] $p<0.001$).

2. 총 플라보노이드 함량

WS와 WSPM의 총 플라보노이드 함량은 Table 1과 같이 각각 17.14 mg QE/g, 28.91 mg QE/g으로 분석되어, 발효 전보다 발효 후에 총 플라보노이드 함량이 유의적으로 높게 나타났는데, 이는 총 폴리페놀 측정 결과와 동일한 양상이었다. Lee JY 등(2013)의 연구에서도 영지버섯 균사체를 이용하여 발효한 더덕차는 비 발효 더덕차보다 플라보노이드 함량이 유의적으로 높게 나타났다고 하였으며, Jeong 등(2010)도 균사체로 배양된 인삼이 원료인 인삼보다 페놀성 물질의 함량이 증가되었다고 하여 발효 과정을 통하여 플라보노이드 함량이 증가된 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 상황버섯 균사체를 이용하여 발효한 찰수수의 플라보노이드 함량이 증가된 것은 발효 과정에서 균사체의 생물전환 능력을 통하여 플라보노이드의 생성이 증가된 것으로 보인다.

3. β-Glucan 함량

WS와 WSPM의 β-glucan 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같이 각각 7.69%와 12.24%로 나타나 찰수수와 상황버섯 균사체의 발효과정 동안 β-glucan 함량이 증가한 것으로 나타났다. Lee HD & Lee KS(2009)는 청풍느타리버섯, 상황버섯 및 표고버섯 균사체를 이용하여 배양된 보리의 β-glucan 함량이 각각 11.24%, 16.35% 및 16.25%로 배양 전 보리에 비해 약 2~3배 정도 증가되었다고 보고하여 본 실험 결과와 같은 양상을 나타내었다. β-Glucan은 세포의 면역 기능을 활성화시켜 암세포 증식을 억제시킬 뿐만 아니라, 면역기능을 담당하고 있는 B세포와 T세포도 활성화시킨다고 보고되었다(Hwang YJ 등 2003). 따라서 본 연구에서도 찰수수와 상황버섯 균사체의 발효과정 동안 증가한 β-glucan은 암세포 증식 억제에 영향을 줄 수 있을 것으로 기대되었다.

4. DPPH Radical 소거 활성

WS와 WSPM의 DPPH radical 소거 활성 측정 결과는 Fig. 1에 나타나있다. WS와 WSPM은 농도가 증가함에 따라 유의적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였으며, 210 μg/mL에서 WS는 71.40%, WSPM은 80.40%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었고, 발효 후 추출물이 발효 전 추출물보다 DPPH radical 소거 활성이 유의적으로 높은 것으로 나타났다. Ryu JS(2011)는 비 발효 홍삼과 상황버섯 균사체로 발효한 홍삼의 항산화 활성을 비교한 결과, 발효 홍삼의 IC_{50} 값이 비 발효 홍삼보다 낮게 나타나 균사체 발효과정을 거치면서 항산화 활성이 증가되었다고 하였다. 또한 복령과 후박을 버섯 균사체로 발효시킨 추출액의 항산화 활성을 측정한 Shon MY(2007)도 균사체 발효 추출액이 원료 후박 및 복령 추출물에 비하여 항산화 활성이 증가하였다고 보고하였으며, Kim S(2012)의 연구에서도 상황버섯 균사체를 이용하여 배양한 적미와 흑미가 배양 전보다 유의적으로 높은 항산화 효과를 나타내었다고 보고하였다. 본 실험에서도 WSPM이 WS보다 DPPH radical 소거 활성이 유의적으로 높게 나타나, 이들 선행연구와 유사한 결과를 보였다.

5. ABTS Radical 소거 활성

WS와 WSPM의 ABTS radical 소거 활성 측정 결과는 Fig. 2와 같이 WS와 WSPM 모두 시료 농도가 증가함에 따라 ABTS radical 소거 활성이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났으며, 모든 실험 농도에서 WSPM이 WS에 비해 높은 ABTS radical 소거 활성을 나타내어 DPPH radical 소거 활성 측정 결과와 유사한 양상을 보였다. 시료 농도 210 μg/mL에서 WS는 72.42%의 ABTS radical 소거 활성을 나타내었으며, WSPM은 90.17%의 높은 소거 활성을 나타내었다. 버섯 균사체를 이용하여 발효한 한약재의 항산화 활성을 측정한 Park MJ(2011)의 연구에서 발효한 한약재가 비 발효 한약재보다 ABTS radical 소거 활성이 증가되었다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 상황버섯 균사체를 이용하여 발효한 수삼의 생리활성을 연구한 Hong JY(2014)는 버섯 균사체의 생육과정에서 생물전환 능력에 의해 수삼의 항산화 활성이 증가

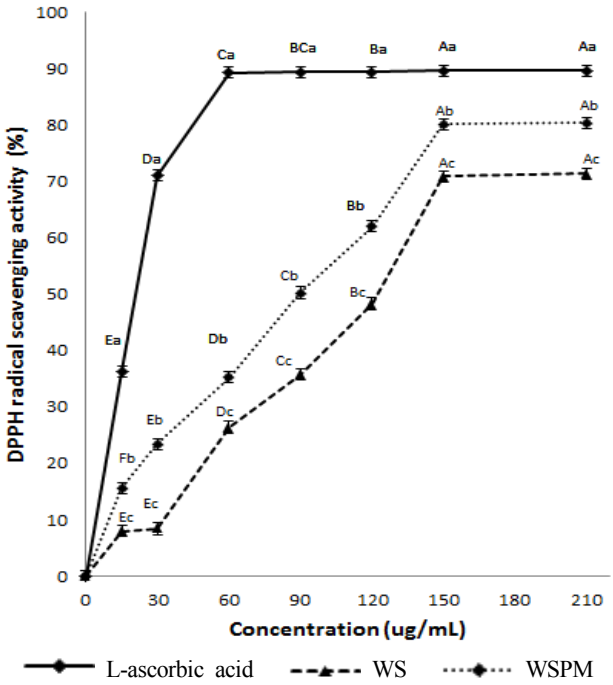

Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of waxy sorghum and waxy sorghum fermented with *Phellinus linteus* mycelium.

L-ascorbic acid: positive control group, WS: ethanol extract from waxy sorghum, WSPM: ethanol extract from waxy sorghum fermented with *Phellinus linteus* mycelium. Values with the different small letters (a~c) are significantly different at the same concentration by Duncan's multiple range test (p<0.05). Values with the different capital letters (A~F) are significantly different at the same sample by Duncan's multiple range test (p<0.05).

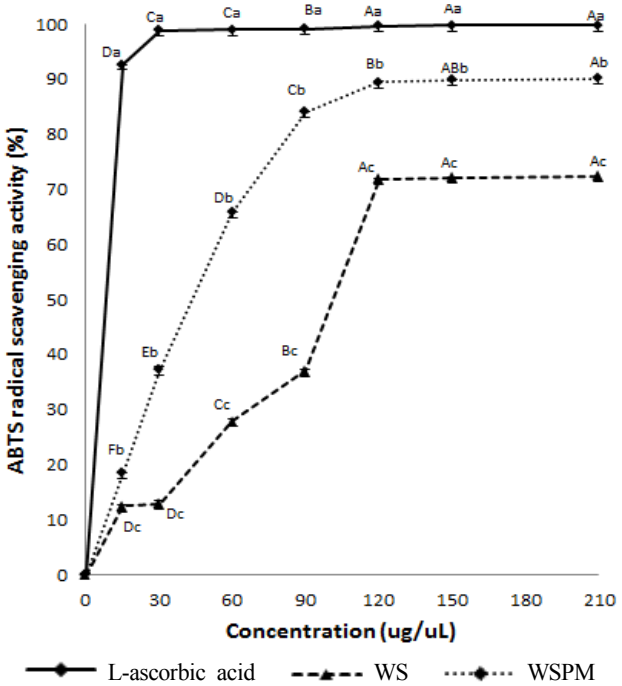

Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of waxy sorghum and waxy sorghum fermented with *Phellinus linteus* mycelium.

L-ascorbic acid: positive control group, WS: ethanol extract from waxy sorghum, WSPM: ethanol extract from waxy sorghum fermented with *Phellinus linteus* mycelium. Values with the different small letters (a~c) are significantly different at the same concentration by Duncan's multiple range test (p<0.05). Values with the different capital letters (A~F) are significantly different at the same sample by Duncan's multiple range test (p<0.05).

되었거나, 항산화 활성과 관련된 영양물질이 유출되어 항산화 활성이 증가되었다고 하였는데, 본 연구에서도 찰수수 발효물의 항산화 활성이 증가된 것은 균사체의 생물전환 능력과 관련이 있을 것으로 생각된다.

6. SOD 유사활성

WS와 WSPM의 SOD 유사활성 측정 결과는 Fig. 3과 같다. 100 ppm에서 SOD 유사활성은 WS가 7.83%, WSPM이 19.13%로 나타났으며, 500 ppm에서 WS는 23.22%, WSPM이 30.74%로 나타났다. 또한 가장 높은 시료 농도인 1,000 ppm에서 WS는 35.48%, WSPM은 43.49%의 SOD 유사활성을 나타내어 시료의 농도가 증가할수록 SOD 유사활성이 증가하였고, WSPM은 WS에 비해 SOD 유사활성이 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 영지버섯 균사체를 이용하여 발효한 감잎차가 비 발효 감잎차에 비해 SOD 유사활성이 더 높다고 보고한 Lee JJ(2009)의 연구결과와 일치하였다.

본 연구에서 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능 및 SOD 유사활성 측정을 통해 추출물의 항산화 활성을 측정한 결과를 종합적으로 살펴볼 때, WS에 비해 WSPM이 더 높은 항산화 활성을 보여 찰수수가 상황버섯 균사체와의 발효과정을 통해 항산화 활성이 증가되는 것으로 나타났으며, 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량도 증가한 것으로 나타났다. 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량은 항산화 활성과 양의 상관관계를 나타낸다고 보고되었는데(Jin SY 2007), 본 연구에서도 상황버섯 균사체와의 발효과정 중 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 증가되어 항산화 활성 증가의 근거를 뒷받침해 주었다.

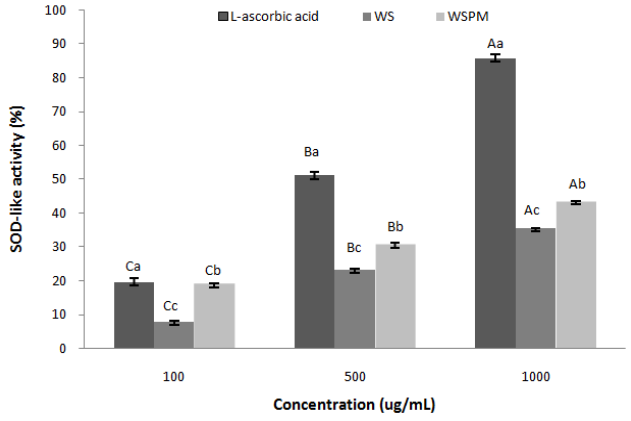

Fig. 3. Superoxide dismutase-like activity of extracts from waxy sorghum and waxy sorghum fermented with *Phellinus linteus* mycelium.

L-ascorbic acid: positive control group, WS: ethanol extract from waxy sorghum, WSPM: ethanol extract from waxy sorghum fermented with *Phellinus linteus* mycelium. Values with the different small letters (a~c) are significantly different at the same concentration by Duncan's multiple range test (p<0.05). Values with the different capital letters (A~C) are significantly different at the same sample by Duncan's multiple range test (p<0.05).

7. MTT Assay

MTT assay는 세포의 효소작용으로 MTT가 환원되어 formazan crystal이 생성되는 정도를 흡광도로 측정하여 세포 독성을 측정하는 방법인 반면, SRB assay는 세포 단백질을 염색하여 세포 독성을 평가하는 방법으로(Jeon YH 등 2009), 본 연구에서는 두 가지 방법을 이용하여 세포 독성을 분석하였다. 먼저 MCF-7, AGS, Hep 3B, HeLa 및 HeLa 229에 대하여 MTT assay를 이용하여 세포 독성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. WS 및 WSPM을 800 ppm의 농도로 첨가하였을 때, HeLa에 대한 세포 독성은 WS가 86.20%, WSPM은 93.59%로 다른 암세포에 대한 세포 독성보다 유의적으로 높게 나타났다. Hep 3B의 경우, WS는 70.56%, WSPM은 82.38%의 세포 독성을 보여 다른 암세포에 비해 세포 독성이 낮았다. WS와 WSPM는 모두 농도 의존적으로 세포 독성이 증가하는 경향을 보였으며, 실험한 모든 암세포에 대해 WSPM이 WS보다 암세포 증식 억제효과가 높은 것으로 나타났다. 세포 독성은 암세포의 종류에 따라 차이가 있었으나, 800 ppm의 농도에서 WS는 70~86%의 세포 독성을 보였으나, WSPM은 82~93%의 높은 세포 독성을 보였다. 이를 통해 찰수수가 상황버섯 균사체를 이용한 발효과정을 거치면서 암세포 증식 억제 효과가 높아진 것을 확인할 수 있었다. 표고버섯 균사체를 이용하여 발효한 황기 추출물의 항암활성을 연구한 Bae MJ 등(2007)의 연구에서도 균사체 발효 황기 추출물은 MCF-7, Hep 3B 및 HeLa에 대해서 비 발효 황기 추출물보다 높은 세포 독성을 나타내었다고 하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 한편, 정상 세포에 대한 세포 독성을 알아보기 위하여 HeLa 229에 대한 WS와 WSPM의 세포 독성을 측정한 결과, 두 시료 모두 농도가 증가함에 따라 세포 독성이 증가하였으나, 최고 농도인 800 ppm에서 WS는 19.68%, WSPM은 26.16%의 세포 독성을 보여, 정상 세포에 대한 독성은 암세포에 대한 세포 독성보다 매우 낮은 것으로 나타났다. 이는 WS와 WSPM이 정상 세포에는 큰 영향을 주지 않으면서 암세포에 대한 세포 독성은 높은 것을 의미하는 것으로 WSPM이 암세포 증식을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다.

8. SRB Assay

WS 및 WSPM의 항암 활성을 SRB assay로 분석한 결과는 Table 3과 같다. HeLa에 대한 세포 독성은 WS가 10.23~84.54%, WSPM은 26.07~92.64%로 나타나, 다른 세포주에 비해 전반적으로 높은 세포 독성을 보였다. SRB assay에서

Table 2. Cytotoxicity of ethanol extracts from waxy sorghum and waxy sorghum fermented with *Phellinus linteus* mycelium on human cancer cell lines by MTT assay

Concentration (ppm)	WS[1]					WSPM[2]				
	AGS	MCF-7	Hep3B	HeLa	HeLa 229	AGS	MCF-7	Hep3B	HeLa	HeLa 229
100	28.34± 0.25$^{b3)E4)}$	30.55± 0.24^{aE}	29.76± 0.95^{aE}	24.09± 1.54^{cE}	7.82± 0.14^{dD}	31.04± 0.25$^{cE***5)}$	34.81± 1.06^{aE*}	32.22± 0.84^{bcE*}	32.72± 0.74^{bE**}	6.24± 0.38^{dE*}
200	31.04± 0.25^{dD}	40.04± 0.32^{bD}	48.57± 0.24^{aD}	36.91± 1.13^{cD}	9.81± 0.38^{eC}	33.25± 0.25^{dD***}	45.55± 0.63^{bD**}	52.38± 0.24^{aD***}	44.05± 1.12^{cD**}	12.38± 0.24^{eD**}
400	42.00± 0.51^{cC}	54.02± 0.72^{aC}	54.60± 0.14^{aC}	50.46± 1.48^{bC}	14.21± 1.01^{dB}	53.70± 0.14^{cC***}	59.18± 0.32^{aC**}	57.30± 0.60^{bC*}	54.41± 1.13^{cC*}	16.95± 0.63^{dC*}
600	64.09± 0.37^{bB}	71.64± 0.78^{aB}	65.07± 0.50^{bB}	65.50± 1.54^{bB}	18.86± 1.08^{cA}	78.73± 0.37^{aB***}	78.04± 0.24^{aB**}	66.83± 0.36^{cB*}	76.59± 0.43^{bB**}	19.10± 0.86^{dB}
800	79.88± 0.49^{bA}	73.71± 0.31^{cA}	70.56± 0.37^{dA}	86.20± 0.43^{aA}	19.68± 0.63^{eA}	90.02± 0.14^{bA***}	85.34± 0.21^{cA***}	82.38± 1.04^{dA**}	93.59± 0.43^{aA***}	26.16± 0.80^{eA**}

[1] WS: ethanol extract from waxy sorghum.
[2] WSPM: ethanol extract from waxy sorghum fermented with *Phellinus linteus* mycelium.
[3] Means with the different small letters (a~e) are significantly different at the same concentration by Duncan's multiple range test (p<0.05).
[4] Means with the different capital letters (A~E) are significantly different at the same kind of cell line by Duncan's multiple range test (p<0.05).
[5] Star marker indicates a significantly different between WS and WSPM at the same concentration by student's t-test (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Table 3. Cytotoxicity of ethanol extracts from waxy sorghum and waxy sorghum fermented with *Phellinus linteus* mycelium on human cancer cell lines by SRB assay

Concentration (ppm)	WS[1]					WSPM[2]				
	AGS	MCF-7	Hep3B	HeLa	HeLa 229	AGS	MCF-7	Hep3B	HeLa	HeLa 229
100	22.32± 0.26$^{c2)E3)}$	25.13± 0.61^{bE}	29.43± 0.80^{aE}	10.23± 0.37^{dE}	3.92± 0.25^{eD}	35.23± 0.26$^{bE***4)}$	34.60± 0.74^{bE***}	36.74± 0.21^{aE**}	26.07± 0.86^{cE***}	5.31± 0.28^{dE**}
200	29.80± 0.68^{bD}	29.14± 0.59^{bD}	38.36± 0.32^{aD}	30.03± 1.82^{bD}	7.76± 0.37^{cC}	39.78± 0.40^{cD***}	38.21± 0.29^{dD***}	57.62± 0.42^{aD***}	43.04± 0.37^{bD**}	12.58± 0.79^{eD**}
400	50.71± 0.26^{abC}	51.98± 0.59^{aC}	50.59± 0.88^{bC}	42.29± 0.57^{cC}	13.07± 0.99^{dB}	53.46± 0.15^{cC***}	58.03± 0.45^{bC***}	63.38± 0.44^{aC***}	48.89± 0.86^{dC**}	17.16± 0.25^{eC*}
600	60.17± 0.65^{cB}	69.06± 1.22^{aB}	59.16± 0.80^{cB}	64.73± 1.31^{bB}	19.85± 0.65^{dA}	74.37± 0.15^{bB***}	75.60± 0.74^{abB**}	71.32± 0.92^{cB***}	75.86± 0.87^{aB**}	19.85± 0.65^{dB**}
800	71.35± 0.26^{bA}	72.57± 1.38^{bA}	71.96± 0.42^{bA}	84.54± 1.18^{aA}	19.93± 0.1^{cA}	83.82± 0.79^{bA**}	81.06± 1.03^{cA**}	80.88± 0.44^{cA***}	92.64± 0.57^{aA**}	27.70± 0.65^{dA**}

[1] WS: ethanol extract from waxy sorghum.
[2] WSPM: ethanol extract from waxy sorghum fermented with *Phellinus linteus* mycelium.
[3] Means with the different small letters (a~e) are significantly different at the same concentration by Duncan's multiple range test (p<0.05).
[4] Means with the different capital letters (A~E) are significantly different at the same kind of cell line by Duncan's multiple range test (p<0.05).
[5] Star marker indicates a significantly different between WS and WSPM at the same concentration by student's t-test (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

도 WS와 WSPM는 농도 의존적으로 암세포에 대하여 세포 증식 억제 효과가 증가하였으며, 모든 농도에서 WSPM이 WS보다 유의적으로 높은 암세포 증식 억제 효과를 가진 것으로 나타나, 앞선 MTT assay 결과와 일치하였다. 따라서 상황버섯 균사체를 이용하여 발효한 찰수수는 발효과정을 통하여 암세포에 대한 세포 독성이 증가된 것을 확인할 수 있었다. Shon MY(2007)는 팽이버섯 균사체를 이용하여 발효한 복령과 후박의 항암 활성이 비 발효 복령과 후박보다 간암세포에 대해 약 2배 높은 암세포 증식 저해 활성을 가졌다고 보고하여 본 실험 결과와 유사한 양상을 보였다. 한편, 영지버섯 균사체에서 분리된 β-glucan을 이용하여 Sarcoma 180에 대한 항암 활성을 측정한 Han MD 등(2014)의 연구에서는 양성대조군인 polysaccharide-K보다 β-glucan이 더 높은 항암 활성을 나타내었다고 하여 β-glucan의 우수한 항암 활성을 보고하였는데, 본 연구에서도 상황버섯 균사체를 이용하여 찰수수를 발효하는 과정에서 β-glucan 함량이 증가하여 암세포 증식억제에 영향을 주었을 것으로 생각한다.

결론 및 요약

본 연구에서는 찰수수를 상황버섯 균사체로 발효시켜 에탄올로 추출한 추출물의 생리활성 및 성분 변화를 분석하였다. WS와 WSPM의 총 폴리페놀 함량은 각각 48.60 mg GAE/g, 67.80 mg GAE/g으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 각각 17.14 mg QE/g, 28.91 mg QE/g으로 나타나, WSPM의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 WS보다 유의적으로 높게 나타났다. 항산화 활성을 검증하기 위하여 DPPH radical 소거 활성, ABTS radical 소거 활성 및 SOD 유사활성을 측정한 결과, DPPH radical 소거 활성은 모든 시료 농도에서 WSPM이 WS보다 유의적으로 높게 나타났으며, 210 μg/mL에서 WSPM은 80% 이상의 radical 소거능을 나타내었다. ABTS radical 소거 활성은 DPPH radical 소거 활성과 유사한 양상을 보였으며, WSPM은 210 μg/mL에서 90% 이상의 높은 radical 소거 활성을 나타내었다. SOD 유사활성 측정에서도 WSPM는 WS에 비해 유의적으로 높은 항산화 활성을 보여 이들 결과를 종합적으로 볼 때, 상황버섯 균사체를 이용하여 찰수수를 발효하는 과정에서 항산화 활성이 증가하는 것으로 나타났다. MTT assay로 측정한 세포 독성에서는 실험한 모든 암세포에 대해서 WSPM이 WS보다 높은 세포 독성을 나타내었으며, 농도 의존적으로 암세포에 대한 세포 독성이 증가하였다. 이러한 양상은 SRB assay도 동일하게 나타나 상황버섯 균사체를 이용한 발효과정에서 암세포에 대한 세포 독성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이들 결과를 볼 때, 상황버섯 균사체와 찰수수 발효물의 에탄올 추출물은 발효가 용이하고 대량생산할 수 있으며 자실체보다 가격도 저렴하여 항산화 활성 증가 및 암세포 증식 억제를 위한 기능성 식품소재로 이용 가능성이 높은 것으로 사료된다.

REFERENCES

Awika JM, Yang L, Browning JD, Faraj A (2009) Comparative antioxidant, antiproliferative and phase II enzyme inducing potential of sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties. LWT-Food Sci Technol 42(6): 1041-1046.

Bae MJ, Kim KJ, Kim SJ, Ye EJ (2007) Effect of mycelia extracts from *Lentinus edoeds* mushroom cultured *Astragalus membranceus* Bunge on anticancer and antiallergy activities. J Korean Soc Food Sci Nutr 36(1): 8-13.

Blois MS (1958) Antioxidant determination by use of a stable free radical. Nature 181(4617): 1199-1200.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res 47(4): 936-942.

Chung KS, Kim SS, Kim HS, Kim KY, Han MW (1993) Effect of Kp, an antitumor protein polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor bearing ICR mice to sheep red blood cells. Arch Pharm Res 16(4): 336-338.

Doll R, Peto R (1981) The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J Natl Cancer Inst 66(6): 1191-1308.

Dykes L, Rooney LW (2006) Sorghum and millet phenols and antioxidants. J Cereal Sci 44(3): 236-251.

Han MD, Kim YH, Kim WJ (2014) *In vivo* growth inhibition of Sarcoma-180 cells by a β-glucan from the mushroom *Ganoderma lucidum*. J Life Sci 24(7): 721-727.

Hong JY (2014) Lipid lowering effect of solid fermented *Panax ginseng* by *Phellinus linteus* mycelium. MS Thesis Pusan National University, Pusan. pp. 38, 55, 57.

Hulse JH, Laing EM, Pearson OE (1980) Sorghum and the Millets: Their Composition and Nutritive Value. Pittsburgh, USA.

Hwang YJ, Noh GW, Kim SH (2003) Effect of *Inonotus obliquus* extracts on proliferation and caspase-3 activity in human gastrointestinal cancer cell lines. J Korean Nutr Soc 36(1): 18-30.

Jeon YH, Choi SW, Kim MR (2009) Antimutagenic and cyto-

toxic activity of ethanol and water extracts from *Rubus coreanum*. Korean J Food Cookery Sci 25(3): 379-386.

Jin SY (2007) Antioxidant activity in pomegranate and development of the *maejakgwa* added pomegranate extract. Ph D Dissertation Sookmyung Women's University, Seoul. pp. 68-69.

Jeung EM, Kim HY, Hwang IG, Jeong JH, Yu KW, Lee JS, Jeong HS (2010) Changes of antioxidant activities on cultured ginseng with mushroom mycelia during cultivation. J Korean Soc Food Sci Nutr 39(9): 1346-1352.

Kim H, Yoon HS, Jeong JH, Jeong HS, Hwang J, Yu KW (2010) Enhancement of immunostimulation by fractionation of active polysaccharide from fermented ginseng with *Phellinus linteus* mycelium in solid culture. Korean J Food Sci Technol 42(2): 223-232.

Kim JS, Jung HJ, Yang JF, Eun YC, Sa YJ, Yu CY, Heo SI, Pack DS, Chung IM, Kim MJ (2011) Anticancer Activity of Apigenin isolated from Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). Abstract No Ⅱ-60 presented Korean Society of Medicinal Crop Science, Eumseong, CB, Korean.

Kim KO (2004) Effect of *Sorghum bicolor* L. Moench (Sorghum, su-su) extracts on mouse immune cell activation. MS Thesis Sookmyung Women's University, Seoul. pp. 78-80.

Kim S (2012) The physiochemical characteristics and whitening and antioxidant effects of colored rice cultured with the mycelium of *Phellinus baumii* Pilst. MS Thesis Chonnam National University, Gwangju. p. 30.

Kim SH (2002) Pharmacological activities of *Phellinus linteus*. MS Thesis Sookmyung Women's University, Seoul. pp. 58, 60.

Lee BE, Ryu SY, Kim EH, Kim YH, Kwak KA, Song HY (2012) Immunostimulating effect of mycelium extract of *Phellinus linteus*. Kor J Pharmacog 43(2): 157-162.

Lee HD, Lee KS (2009) β-Glucan and glucosamine contents in various cereals cultured with mushroom mycelia. Kor J Mycol 37(2): 167-172.

Lee JJ (2009) Persimmon leaf pan fired tea and *Ganoderma lucidum* mushroom mycelia fermented persimmon leaf tea's elemental analysis and antioxidization effect. MS Thesis Daegu Haany University, Daegu. pp. 30-31.

Lee JY, Kim BK, Park HJ (2013) Antioxidant activities and quality characteristics of fermented *Codonopsis lanceolata* tea according to heating processes. Korean J Food Nutr 26 (4): 693-699.

Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of super oxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 47 (3): 469-474.

Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000) Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J Ethnopharmacol 71(1-2): 109-114.

Park MJ (2011) The effects of hangover cure and improve of liver function activity of mushroom mycelia cultured with medicinal plant as substrate. MS Thesis Andong National University, Andong. pp. 70-71.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice Evans C (1998) Screening of dietary carotenoids and carotenoid rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylene benzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. Meth Enzymol 299(1): 379-389.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Bio Med 26(9-10): 1231-1237.

Ryu JS (2011) Chemical composition and biological functions of red ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) fermented by *Phelinus linteus* mycelia. Ph D Dissertation Dankook University, Yongin. p. 65.

Shin YK, Jang HS, Kim JS, Ryu HY, Kim JK, Kwun IS, Sohn HY (2008) Solid fermentation of medicinal herb using *Phellinus baumii* mycelium and antithrombin and antioxidation activity of its methanol extract. Kor J Microbiol Biotechnol 36(3): 201-208.

Sin OS (2004) *In vitro* effect of extracts of *Phellinus baumii* and *Ganoderma lucidum* on antiviral and immuno activity. MS Thesis Korea University, Seoul. pp. 17-18.

Shon MY (2007) Antioxidant and anticancer activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* fermented with mycelial mushrooms. Food Indus Nutr 12(2): 51-57.

Date Received Aug. 4, 2016
Date Revised Sep. 20, 2016
Date Accepted Sep. 20, 2016