Characteristics of mushroom *Phellinus baumii* extracts with enzyme pretreatment

Eun Ji Son¹ · Eun-Ah Ryu¹ · Sang-Han Lee^{1,2} · Young-Chan Kim³ ·
In-Wook Hwang⁴ · Shin-Kyo Chung^{1,2}

효소 전처리에 의한 상황버섯 β -glucan 추출물의 특성

손은지¹ · 류은아¹ · 이상한^{1,2} · 김영찬³ · 황인욱⁴ · 정신교^{1,2}

Received: 1 February 2018 / Accepted: 19 March 2018 / Published Online: 31 March 2018
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2018

Abstract This study was conducted to establish optimized β -glucan extraction method through enzymatic hydrolysis from *Phellinus baumii* and investigate β -glucan contents and physico-chemical properties. The optimal condition was obtained with the enzyme concentration of 0.66% (v/v), reaction time of 6.08 h ($R^2=0.9245$) and the β -glucan contents from the *Phellinus baumii* extracts under the optimized condition was 1.9594 g/100 g. β -Glucan yield (0.76-16.40%) of enzyme beta-glucan extract (EBE) was three fold higher than that of non-enzyme beta-glucan extract (NEBE). β -Glucan purity (11.15-59.05%) of non-enzyme beta-glucan (NEB) and that of enzyme beta-glucan (EB) were higher than that of NEBE and that of EBE. β -Glucan purity of EB (59.05%) and β -glucan contents of EB (3.38 g/100 g) showed higher than those of others. Total sugar contents (0.61-1.17 mg/

mL) showed that NEB and EB were higher than that of NEBE and EBE, EB had the highest total sugar content as 1.17 mg/mL, respectively. Protein contents (0.44-11.73 mg/mL) of NEBE and that of EBE were higher than that of NEB, that of EB. In FT-IR spectrum, the band at 890 cm^{-1} of microcapsule was attributed to a β -1,3-glucan. The toxicities of β -glucan from *Phellinus baumii* in both melanoma cell lines was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay and β -glucan from *Phellinus baumii* has no toxicity until $30\text{ }\mu\text{g/mL}$. The effects of β -glucan from *Phellinus baumii* on inhibition of cancer cell proliferation were detected by using a wound healing assay. The effect of NEB and EB were higher than NEBE and EBE, especially $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ of EB had the highest in both melanoma cell lines.

Shin-Kyo Chung (✉)
E-mail: kchung@knu.ac.kr

¹School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

²Food and Bio-industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

³SME Solution Center, Korea Food Research Institute, Jeollabuk-do 55365, Republic of Korea

⁴Department of Food Science and Nutrition, Dong-A University, Busan 49315, Republic of Korea

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.

Keywords β -glucan · 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay · Enzymatic hydrolysis pretreatment · *Phellinus baumii* · Wound healing assay

서론

상황버섯은 뽕나무 줄기 등에 자생하는 진흙버섯속의 백색 부후균으로, 갓 표면을 제외한 모든 부분에서 황색을 띠어 상황이라 불린다(Shin 등, 2008). 상황버섯은 전 세계적으로 약 220 여종이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 국내에서는 *Phellinus baumii*, *Phellinus linteus*가 주로 재배 및 유통되고 있다(Bae 등, 2003). 최근 대량재배가 가능해지고, 암세포 증식 억제 활성(Rhee 등, 2000), 면역 증강(Maja 등, 2011) 및 항산화 효과

(Kim 등, 2011) 등의 다양한 생리활성이 보고되어 건강식품 및 의약품의 소재로 주목받고 있다. 이와 같은 상황버섯의 약리 기능 중 항암 활성, 면역 증강 및 항염증 작용은 $\beta(1\rightarrow3)$ 주결합에 $\beta(1\rightarrow6)$ 결합의 곁가지를 갖는 β -glucan에 의한 것이다 (Shiao 등, 1994). β -Glucan은 비특이적 면역반응으로 인간의 정상 세포의 면역 기능을 활성화 시켜 암세포의 증식과 재발을 억제하고 혈당강하 및 혈중 콜레스테롤 감소 효과가 우수하며, 지질대사를 개선하여 체지방의 축적을 억제함으로써 항 비만효과를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Cho 등, 2013).

약용버섯류의 활용에 있어 가장 기본적인 처리공정은 재료로부터 우수한 기능성과 생리활성을 가진 유효 성분을 분리하는 추출공정이다(Kim 등, 2007). 그러나 기존의 열수 추출 방법의 경우 추출 시간이 길고 추출 효율이 낮은 단점이 있어 이를 기본으로 하며 유효 성분을 효과적으로 분리해낼 수 있는 적절한 전처리 기술이 필요하다(Kim 등, 2007). 약용버섯의 기능성 증대를 위해 원적외선 처리(Kim 등, 2007), 초음파 처리(Kim 등, 2012), 가열 전처리(Park과 Kim 2008) 등에 대한 연구는 진행되어 왔으나, 이러한 전처리 기술들은 적합한 장비가 요구되고, 저수율과 불안정성 때문에 상업적 사용이 제한된다(Chung과 Youn 2005). 이에 비하여, 효소 처리는 간편하며, 추출 수율이 높음에도 불구하고(Lee 등, 2014) 비교적 연구가 부족한 실정이다. 본 연구에서는 상황버섯 β -glucan의 추출 효율을 높이기 위한 전처리 공정으로 효소 가수분해를 이용하였으며, 반응표면 분석법을 통해 효소 가수분해 조건을 최적화하였다. 최적화된 조건으로 효소 가수분해한 추출물을 열수 추출한 후 에탄올로 정제해 효율적인 추출 공정을 확립하였다. 이후 추출물의 β -glucan 함량 및 암세포 증식 억제 활성을 기존의 단순한 열수 추출 방법과 비교하여 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 상황버섯(*Phellinus baumii*)은 경상북도 안동시 임하면 류충현 약용버섯에서 2016년 6월에 공여받은 2년산 상황버섯을 사용하였다. 2년산 상황버섯을 절단한 후 분쇄하여 25 mesh 이상의 상황버섯 분말을 제조하였다.

반응표면분석에 의한 효소 전처리 조건 최적화

상황버섯 β -glucan 추출 조건의 최적화를 위하여 viscozyme의 첨가량(X_1 , % (v/v))과 반응 시간(X_2 , h)을 독립 변수(independent variable)로 하여 실시하였다. 반응표면분석법 중 중심합성계획법(central composite design)을 이용하였으며, 실험 범위에 따라 부호화된 독립변수와 부호화되지 않은 독립변수는 Table 1과 같다. 추출 조건과 순서는 임의의 10구간으로 정하여 진행하였다

(Kwon 등, 2003). 최적화하려는 β -glucan 함량을 종속 변수(dependent variable, Y_i)로 하였고, 독립변수와 종속변수간의 관계를 조사하였다. 상황버섯의 viscozyme을 이용한 추출 조건에 따른 β -glucan의 특성은 statistical analysis system (SAS, version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 반응표면 회귀분석으로 통계 처리하였다. 또한, SAS program을 통하여 예측된 최적 추출 조건을 바탕으로 실증 시험하여 예측된 최적 값에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

상황버섯 β -glucan 추출 및 정제

상황버섯 활성 다당체의 추출 공정은 Fig. 1과 같다. 상황버섯 분말 50 g과 증류수 1 L (pH 4)를 혼합한 후 0.66% (v/v)의 viscozyme을 첨가하고 진탕배양기를 이용하여 50 °C, 회전속도 130 rpm의 조건에서 6.08시간 동안 반응시킨 후 24시간 동안 90 °C에서 환류 추출하였으며(enzyme beta-glucan extract, EBE), 여기에 1 L의 에탄올을 가해 4 °C에서 6시간 방치하고 1 L의 에탄올을 다시 한 번 가하여 24시간 방치한 후 여과하였다. 여과액에 1 L의 에탄올을 가하여 24시간 방치한 후 1/4로 농축하고 원심분리하여 정제하였다(enzyme beta-glucan, EB). 대조구로 상황버섯 분말과 추출 용매인 증류수의 비를 1:20으로 하여 24시간 동안 90 °C에서 환류 추출하고(non-enzyme beta-glucan extract, NEBE), 이를 약 3배량의 에탄올로 24시간 동안 정제하였다(non-enzyme beta-glucan, NEB). 각 시료는 동결건조하여 실험에 사용하였다.

β -glucan 함량 측정

추출 수율은 각 공정을 거쳐 추출한 상황버섯 추출물을 여과, 농축, 동결건조 한 후 무게를 측정하여 계산하였다. 수율은 건조된 추출 물질이 상황버섯의 무게 중에서 차지하는 비율(%)로 나타내었다.

β -glucan 함량은 Mushroom and Yeast β -glucan assay kit (Megazyme, Wicklow, Ireland)를 이용하여 측정하였다. 20 mg의 시료에 12 M sulphuric acid 2 mL를 가하여 섞은 후 ice-water bath에서 2시간 동안 교반하며 반응시켰다. 이후 증류수 10 mL를 가하고 100 °C에서 2시간 동안 반응시킨 반응액을 식힌 후 10 M potassium hydroxide 6 mL를 가하였다. 이후 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)로 100 mL로 정용하였다. Whatman GF/A glass microfiber filter (GE Healthcare, Amersham, UK)를 이용해 여과하고, 여과액 0.1 mL에 exo-1,3- β -glucanase (20 U/mL)+ β -glucosidase (4 U/mL) 0.1 mL를 혼합하였다. 40 °C water bath에서 1시간 동안 반응시킨 후 반응액에 glucose oxidase/peroxidase mixture (GOPOD) 3 mL를 가해 40 °C에서 20분간 반응시켰다. 이후 UV-visible Spectrometer (UV 1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)을 이용해 510 nm에서 흡광도를 측정하여 total glucan 함량을 측정하였다. 또한 20 mg의 시료에 2

Table 1 Coded level for independent variables used in developing data for preparation of glucan extraction from *Phellinus baumii*

Independent variable	Units	Coded X_i	Coded levels				
			-2	-1	0	1	2
Enzyme concentration	% (v/v)	X_1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Enzyme reaction time	hours	X_2	2	4	6	8	10

Fig. 1 Scheme of β -glucan extraction from *Phellinus baumii*.

M potassium hydroxide 2 mL를 가하여 20분 동안 ice-water bath에서 반응시켰다. 이후 1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8) 8 mL와 amyloglucosidase (1630 U/mL)+invertase (500 U/mL) 0.2 mL를 가하여 40 °C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응액을 1500 g로 10분간 원심분리 후 상등액 0.1 mL에 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 0.1 mL와 GOPOD 3 mL를 가해 40 °C에서 20분간 반응시켰다. 이후 510 nm에서 흡광도를 측정하여 α -glucan 함량을 측정하였다. β -Glucan 함량은 total glucan 함량에서 α -glucan 함량을 제외한 값으로 하여 계산하였다.

총당 및 단백질 함량 측정

총당 함량은 페놀-황산법으로 측정하였다(Dubois 등, 1956). 시료 1 g에 5% phenol 1 mL와 95% sulfuric acid 5 mL를 가하여 30분간 상온에서 반응시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 표준물질 glucose 검량선의 회귀식을 이용하여 mg/mL로 환산하여 나타내었다.

단백질 함량은 bicinoninic acid (BCA) assay를 이용하여 측정하였다(Smith 등, 1985). 시료의 조추출물(1 mg/mL) 10 μ L에 BCA solution (Cooper II sulfate:bicinoninic acid = 1:50) 90 μ L를 가해 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 표준물질 bovine serum albumin 검량선의 회귀식을 이용하여 mg/mL로 환산하여 나타내었다.

구성당 분석

구성당 분석은 Prominence Modular HPLC system (Shimadzu Co.)를 이용하여 측정하였다. 구성당 분석을 위하여 시료 10 mg을 6 N hydrochloric acid로 가수분해한 후 증발건조하였다. 이를 증류수에 용해시켜 0.45 μ m membrane filter (DISMIC-25HP, Advantec Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하였다. Sugar-Pak I column (10 μ m, ϕ 6.5 $\times$ 300 mm, Waters Corporation, Milford, CT, USA)을 사용하여 0.01 M Ca-EDTA buffer를 이동상으로 하여 0.5 mL/min으로 RI detector로 분석하였다.

FT-IR 분석

β -Glucan의 작용기를 확인하기 위해서 FT-Infrared spectrophotometer (FT-IR, Frontier, PerkinElmer, MA, USA)을 이용하여 spectrum을 분석하였다.

Cell culture

암세포주 B16F10 murine melanoma cell과 SK-MEL-5 human melanoma cell은 한국세포주은행에서 분양받았다. 10% fetal bovine serum, 14% antibiotic (100 unit/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium과 Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640)를 이용하여 5% CO₂ 및 37 °C의 조건에서 배양하였다.

세포 독성

세포 독성을 알아보기 위해 B16F10 murine melanoma cell과 SK-MEL-5 human melanoma cell을 이용하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하였다(Mossmann 1983). B16F10 murine melanoma cell과 SK-MEL-5 human melanoma cell을 96 well plate에 5.0×10^4 cell/mL로 분주한 후 부착 및 안정화를 위하여 37 °C의 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 시료의 농도는 100 µg/mL로부터 희석하였고, 희석된 시료를 배양된 세포에 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 10% MTT (Thiazolylblue tetrazolium bromide) solution (5 mg/mL in phosphate-buffered saline) 100 µL를 가하여 다시 1시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고, DMSO 100 µL를 가하여 생성된 formazan을 용해시킨 후 multiplate counter (Victor3 1420, PerkinElmer Inc.)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 대조구와 비교하여 나타내었다.

Wound healing assay

세포의 운동성 억제효과를 확인하기 위한 *in vitro* wound healing assay를 실시하였다(Heo 등, 2005). B16F10 murine melanoma cell과 SK-MEL-5 human melanoma cell을 6 well plate에 3×10^5 cells/well로 분주한 후 37 °C의 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 yellow pipette tip을 이용하여 cell의 표면에 wound를 형성시키고 배양액을 교체하였다. 시료를 3, 10, 30 µg/mL의 농도로 처리하여 37 °C의 CO₂ incubator에서 배양하면서 0, 6, 12시간 간격으로 healing 정도를 현미경 (ECLIPSE TE2000-U, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. Wound healing 비율은 wound의 거리를 측정하여 억제활성의 정도를 대조구와 비교하였다.

통계 처리

모든 실험은 3회 반복하여 결과값을 평균과 표준편차로 나타내었고(mean ± SD), Statistical analysis system (SAS, version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)에 의하여 유의차를 검정하였다(Duncan's multiple range test, $p < 0.05$).

결과 및 고찰

반응표면분석에 의한 효소 전처리 조건 최적화

상황버섯 β-glucan 추출조건의 최적화를 위해 반응표면분석을 실시하였으며, 그에 따라 종속변수인 β-glucan 함량을 측정한다. Table 2와 같다. 추출 조건 별 β-glucan 함량은 1.0093–2.0440 g/100 g의 범위로 나타났으며, 0.6 g/100 mL의 효소를 6

Table 2 Experimental order of central composite design used for response surface methodology with two independent variables for *Phellinus baumii* extraction

Standard order	Independent variables		Response variables
	Enzyme concentration (X ₁ , % (v/v))	Enzyme reaction time (X ₂ , hours)	β-glucan contents (g/100 g)
1	0.8 (1)	8 (1)	1.6650
2	0.8 (1)	4 (-1)	1.6065
3	0.4 (-1)	8 (1)	1.5736
4	0.4 (-1)	4 (-1)	1.5281
5	0.6 (0)	6 (0)	1.9868
6	0.6 (0)	6 (0)	2.0440
7	1.0 (2)	6 (0)	1.5709
8	0.2 (-2)	6 (0)	1.0093
9	0.6 (0)	10 (2)	1.4832
10	0.6 (0)	2 (-2)	1.4816

Table 3 β-Glucan contents of *Phellinus baumii* extracts at the optimal condition

Variables	Critical value		β-glucan (g/100 g)	
	Coded	Uncoded	Predicted	Experimental
X ₁	0.1553	0.6621	1.9708	1.9594
X ₂	0.0198	6.0792		

시간 동안 반응시켰을 때 가장 높은 함량을 보였다.

각 실험 구간에서 최대 반응값을 가지기 위한 조건으로 viscozyme 농도는 되었으며($R^2=0.9245$), 이 조건에서의 β-glucan 함량은 1.9708 g/100 g으로 예측되었다(Table 3). 이에 따라 최적 추출 조건에서 추출한 시료의 β-glucan 함량은 1.9594 g/100 g으로 측정되었으며, 이는 예측된 β-glucan 함량(1.9708 g/100 g)과 99.42% 유사하였다.

β-glucan 함량 측정

각 시료의 추출 수율 및 β-glucan 함량은 Table 4와 같다. 수율은 효소 전처리한 EBE (16.40%)가 NEBE (5.20%)보다 약 3배 높았으며, NEB가 0.76%, EB가 5.72%로 효소 전처리구와 대조구 모두 정제 과정을 거치며 수율은 크게 낮아졌다($p < 0.05$). β-glucan 순도는 NEBE (18.97±0.47%)가 EBE (11.15±0.04%)보다 높았으나($p < 0.05$), 정제를 할 경우 EB (59.05±0.63%)가 NEB (26.64±0.27%)에 비해 약 2.2배 높았다. 순도와 수율을 함께 고려한 상황버섯 100 g당 β-glucan의 함량(g)은 NEBE가 0.99±0.03 g/100 g, EBE가 1.83±0.01 g/100 g으로 EBE가 NEBE에 비해 약 1.8배 높았다. EB의 경우 3.38±0.04 g/100 g로 0.26±

Table 4 Yield and β-glucan contents of *Phellinus baumii* extracts with enzyme treatment

	NEBE ¹⁾	NEB	EBE	EB
Yield (%)	5.20±0.17 ^{c2)}	0.76±0.10 ^d	16.40±0.74 ^a	5.72±0.13 ^b
β-glucan purity (%)	18.97±0.47 ^c	26.64±0.27 ^b	11.15±0.04 ^d	59.05±0.63 ^a
β-glucan contents (g/100 g)	0.99±0.03 ^c	0.26±0.01 ^d	1.83±0.01 ^b	3.38±0.04 ^a

¹⁾NEBE, non-enzyme beta-glucan extract; NEB, non-enzyme beta-glucan; EBE, enzyme beta-glucan extract; EB, enzyme beta-glucan

^{2)abc} Means followed by the same letters within the row are not significantly different ($p < 0.05$). Values are expressed as the mean ± S.D.

Table 5 Total sugar and protein contents of the *Phellinus baumii* extracts with enzyme treatment

	NEBE ¹⁾	NEB	EBE	EB
Total sugar contents (mg/mL)	0.66±0.01 ^{c2)}	0.75±0.04 ^b	0.61±0.02 ^d	1.17±0.03 ^a
Protein contents (mg/mL)	5.02±0.26 ^b	0.44±0.05 ^d	11.73±0.95 ^a	0.78±0.02 ^c

¹⁾NEBE, non-enzyme beta-glucan extract; NEB, non-enzyme beta-glucan; EBE, enzyme beta-glucan extract; EB, enzyme beta-glucan

^{2)abc}Means followed by the same letters within the row are not significantly different ($p < 0.05$). Values are expressed as the mean±S.D.

Table 6 Sugar relative composition of the *Phellinus baumii* extracts with enzyme treatment

(Unit: %)

	Glucose	Galactose	Fructose	Arabinose	Mannitol
NEBE ¹⁾	84.03	10.52	0.01	0.96	4.42
NEB	87.13	10.70	ND ²⁾	2.09	0.01
EBE	51.90	45.62	0.23	0.20	2.05
EB	84.61	7.99	1.21	ND	1.66

¹⁾NEBE, non-enzyme beta-glucan extract; NEB, non-enzyme beta-glucan; EBE, enzyme beta-glucan extract; EB, enzyme beta-glucan

²⁾ND, not detected

0.01 g/100 g의 NEB보다 약 13배 높았기에 함량이 크게 높아진 것을 확인할 수 있었다.

총당 및 단백질 함량

처리조건에 따른 상황버섯 추출물의 총당과 단백질 함량은 Table 5와 같다. 총당 함량은 대조구와 효소 전처리구 모두 정제한 것이 높았다. NEB (0.75±0.04 mg/mL)가 NEBE (0.66±0.01 mg/mL)보다, EB (1.17±0.03 mg/mL)가 EBE (0.61±0.02 mg/mL)보다 높았으며, EB가 가장 높게 나타났다($p < 0.05$).

단백질 함량은 대조구에서 정제한 NEB (0.44±0.05 mg/mL)가 NEBE (5.02±0.26 mg/mL)보다 약 11배 낮았으며, 효소 전처리구 역시 정제한 EB (0.78±0.02 mg/mL)가 EBE (11.73±0.95 mg/mL)보다 약 15배 낮았다($p < 0.05$).

Suh 등(2002)은 viscozyme L이 식물세포벽성분과 단백질을 분해하는 효소로서 세포벽의 다당체를 분해한 후 단백질을 저분자로 분해 제거하고 전분을 절단하는 효소 처리 과정을 거치면서 저분자 유용성분이 극대화된다고 보고하였다.

구성당 분석

구성당 함량은 Table 6과 같으며 glucose와 galactose, mannitol은 모든 시료에서 검출되었다. Glucose의 경우 대조구와 효소 처리구 모두 정제하지 않은 NEBE와 EBE보다 정제한 NEB와 EB의 구성 비율이 높았으므로 정제가 잘 이루어졌다고 판단하였다. Fructose는 NEB에서, mannitol은 EB에서 검출되지 않았다. 상황버섯에는 glucose, fructose, galactose, rhamnose, arabinose, mannose 등이 존재한다고 보고된 바 있다(Maja 등, 2011).

FT-IR 분석

FT-IR 분석 결과는 Fig. 2와 같다. 각 peak의 작용기는 3300-3400 cm^{-1} 영역에서 당 고리의 전형적인 O-H의 stretching peak가 수소결합에 의해 이동되어 나타났으며, EBE와 EB에서 크게 나타났다. 모든 시료에서 2900 cm^{-1} 부근의 C-H stretching 진동과 1630 cm^{-1} 의 C=O stretching 진동, 1000-1100 cm^{-1} 에서는 C-H와 C-O bending 진동이 나타났다. Vlasta 등(2001)의 표고, 영지, 느타리버섯 등 약 70여 종의 버섯에 대한 FT-IR 패턴 연

Fig. 2 FT-IR spectrum of *Phellinus baumii* extracts with enzyme pretreatment. NEBE, non-enzyme beta-glucan extract; NEB, non-enzyme beta-glucan; EBE, enzyme beta-glucan extract; EB, enzyme beta-glucan

Fig. 3 Effect of the *Phellinus baumii* extracts with enzyme treatment on cell viability of B16F10. NEBE, non-enzyme beta-glucan extract; NEB, non-enzyme beta-glucan; EBE, enzyme beta-glucan extract; EB, enzyme beta-glucan

Fig. 4 Effect of the *Phellinus baumii* extracts with enzyme treatment on cell viability of SK-MEL-5. NEBE, non-enzyme beta-glucan extract; NEB, non-enzyme beta-glucan; EBE, enzyme beta-glucan extract; EB, enzyme beta-glucan

구에서 890 cm^{-1} 영역은 β -glycosidic linkage를 나타내며, 930 cm^{-1} 영역은 α -glycosidic linkage를 나타낸다고 보고된 바 있다. 본 연구의 추출물 역시 890 cm^{-1} 부근에서 peak가 확인되었기에 β -glycosidic linkage를 가지고 있는 것으로 판단하였다.

세포 독성

시료가 세포의 생존과 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 통해 B16F10과 SK-MEL-5에 대한 세포 독성을 측정된 결과는 Fig. 3, 4과 같다. 시료는 1, 3, 10, 30, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였다. B16F10의 경우 대조구의 세포 생존율을 100%로 하였을 때 1-100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포 생존율이 80% 이상으로 나타나 세포독성을 보이지 않았다. 반면 SK-MEL-5에서는 EBE를 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때

세포 생존율이 75.09%로 나타나 약간의 세포독성을 보였다. 치마버섯균 유래 β -glucan 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 를 Raw 264.7 세포에 처리한 Lee 등(2011)의 결과에서 저농도(50 $\mu\text{g/mL}$)부터 고농도(400 $\mu\text{g/mL}$)까지 세포 독성이 나타나지 않았다.

Wound healing assay

암의 전이는 암세포의 특징으로 전이에서 가장 중요한 요소로서 암세포의 운동성을 들 수 있다. 세포의 운동성은 세포의 형태가 바뀌면서 일정한 방향성과 함께 관찰할 수 있다(Park 등, 2009). 따라서 상황버섯 추출물의 B16F10과 SK-MEL-5에 대한 암세포 증식 억제 활성을 알아보기 위하여 wound healing assay를 실시한 결과는 Fig. 5, 6과 같다. SK-MEL-5 cell에 wound를 형성한 후 3 $\mu\text{g/mL}$ 의 EBE를 처리한 경우를 제외한

Fig. 5 Cancer cells (B16F10) migration inhibitory activity of *Phellinus baumii* with enzyme treatment by wound healing assay. NEBE, non-enzyme beta-glucan extract; NEB, non-enzyme beta-glucan; EBE, enzyme beta-glucan extract; EB, enzyme beta-glucan

Fig. 6 Cancer cells (SK-MEL-5) migration inhibitory activity of *Phellinus baumii* with enzyme treatment by wound healing assay. NEBE, non-enzyme beta-glucan extract; NEB, non-enzyme beta-glucan; EBE, enzyme beta-glucan extract; EB, enzyme beta-glucan

모든 경우에서 음성 대조구에 비해 암세포 증식 억제 활성이 높게 나타났다. 대조구와 효소 전처리구 모두 정제 과정을 거친 NEB, EB가 NEBE, EBE보다 높은 활성을 나타내었다. B16F10과 SK-MEL-5 모두에서 12시간 경과시 EB 30 µg/mL를 처리한 경우 가장 높은 활성을 나타내었으며, 특히 양성 대조구(resveratrol 10 µg/mL)에 비하여 높은 활성을 나타내었다. 팽이버섯 추출물 1000 µg/mL 처리시 약 70%의 억제활성을 나타냈다고 보고한 Lee 등(2009)의 결과와 비교 할 때, EB 30 µg/mL를 처리시 약 70%의 억제활성을 보여 더 낮은 농도에서 유사한 억제활성을 나타내었다.

감사의 글 본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(과제번호 314070-3).

초 록

본 연구에서는 국내산 상황버섯의 효소 가수분해 전처리를 통한 β-glucan의 최적 추출조건을 확립하고 그에 따른 활성을 알아보고자 추출 조건에 따른 생이화학활성을 측정하였다. 효소 가수분해 조건을 최적화하기 위해 실시한 반응표면분석법의 결

과 0.66%(v/v)의 viscozyme 농도에서 6.08시간 반응하는 것이 최적이라 예측되었으며($R^2=0.9245$), 이에 따라 최적 추출 조건에서 추출한 시료의 β -glucan 함량은 1.9594 g/100 g으로 측정되었다. 추출 수율(0.76-16.40%)은 EBE가 NEBE에 비해 약 3배 높았다. β -glucan 순도(11.15-59.05%)로 가장 높았으며, β -glucan 함량 또한 0.26-3.38 g/100 g으로 EB (3.38 g/100 g)가 가장 높았다. 총당 함량(0.61-1.17 mg/mL)은 NEB, EB가 NEBE, EBE보다 높았으며, EB가 가장 높았다. 구성당 분석 결과, 모든 추출물에서 glucose의 함량이 가장 높았으며, 대조구와 효소 전처리구 모두 정제하면서 그 비율이 증가하였다. 단백질 함량(0.44-11.73 mg/mL)은 NEBE, EBE가 NEB, EB보다 높았으며, EBE가 가장 높았다. FT-IR 분석 결과 890 cm^{-1} 부근에서 peak가 확인되었기에 β -glycosidic linkage를 가지고 있는 것으로 판단하였다. MTT assay를 통해 B6F10과 SK-MEL-5 세포 독성을 측정된 결과 B6F10의 경우 대조구의 세포 생존율을 100%로 하였을 때 세포 생존율이 80% 이상으로 나타나 세포독성을 보이지 않았으나, SK-MEL-5에서는 EBE를 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 세포 생존율이 75%로 나타나 약간의 세포독성을 보였다. Wound healing assay를 통해 암세포 증식 억제 활성 측정 결과, 정제한 NEB, EB가 NEBE, EBE보다 활성이 높았으며, 특히 12시간일 때 EB 30 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리한 경우 B6F10과 SK-MEL-5 모두에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

Keywords 베타글루칸 · 상황버섯 · 세포 독성 · 암세포 증식 억제 활성 · 효소 가수분해 전처리

References

- Bae JS, Jang KH, Rhee MH, Jeong KS, Jo WS, Choi SG, Kim YH, Park SC (2003) Comparison on the Morphology, General Composition, Elemental Composition and Mineral Contents of *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* and *Phellinus gilvus*. Korean J Vet Res 43: 423–428
- Cho JH, Lee JY, Lee MJ, Oh HN, Kang DH, Jhune CS (2013) Comparative Analysis of Useful β -glucan and Polyphenol in the Fruiting Bodies of *Ganoderma* spp. J Mushroom Sci Prod 11: 164–170
- Chung HS, Youn KS (2005) Comparison of Pretreatment Methods for Extraction of Selected Components from *Ganoderma lucidum*. Korean J Food Preserv 12: 130–134
- Dubois M, Gilles KA, Hamiton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal Chem 28: 350–356
- Heo JC, Park JY, Lee JM, Kwon TK, Kim SU, Chung SK, Lee SH (2005) Wisteria Floribunda Gall Extract Inhibits Cell Migration in Mouse B16F10 Melanoma cells by Regulating CD44 Expression and GTP-RhoA Activity. J Ethnopharmacol 102: 10–14
- Kim AR, Kim JE, Park SN (2011) Antioxidative Activity and Component Analysis of *Phellinus linteus* Extracts. Korean J Soc Cosmet 37: 309–318
- Kim DY, Teng H, Choi YH (2012) Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction Process for *Inonotus obliquus* Using Response Surface Methodology. Current Research on Agriculture and Life Sciences 30: 68–75
- Kim JH, Lee SC, Ju YC (2007) Effect of Far-infrared Irradiation on the Antioxidant Activity of Extracts from *Phellinus igniarius* and *Ganoderma lucidum*. Korean J Food Sci Technol 39: 386–389
- Kwon JH, Jacqueline M. R., Belanger, J.R. Jocelyn Pare (2003) Optimization of Microwave-Assisted Extraction (MAP) for Ginseng Components by Response Surface Methodology. J Agric Food Chem 51: 1807–1810
- Lee JS, Lee SH, Jang YM, Lee JD, Lee BH, Jung JY (2011) Macrophage and Anticancer of Feed Additives on β -Glucan from Schizophyllum commune in Breast Cancer Cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 40: 949–955
- Lee PH, Park SY, Jang TH, Yim SH, Nam SH, In MJ, Kim DC, Chae HJ (2014) Effects of Complex Carbohydrase Treatment on Physiological Activities of Pear Peel and Core. J Korean Soc Food Sci Nutr 43: 404–410
- Lee SR, Nam DY, Lee HJ, Park CH, Heo JC, Kim JG, Lee JM, Lee CY, Park HJ, Lee SH (2009) Analysis of Anti-Tumor Activity of *Flammulina velutipes* Extract on B16 cells. Korean J Food Preserv 16: 599–603
- Maja K, Anita K, Miomir N, Dragica J, Johannes P.F.G. H, Leo J.L.D. Van G (2011) Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. Food Chem 129: 1667–1675
- Mossmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65: 55–63
- Park CH, Heo JC, Nam DY, Lee SR, Nam SH, Son MS, Hwang YH, Lee SH (2009) Comparison of immuno-suppressive activities of Pintol isolated from soybean. Korean J Food Preserv 16: 449–453
- Park MK, Kim CH (2008) Effect of Pre-heating Conditions on Extraction Yield of *Phellinus linteus* Tea. J Korean Soc Food Sci Nutr 37: 653–659
- Rhee YK, Han MJ, Park SY, Kim DH (2000) *In vitro* and *in vivo* Antitumor Activity of the Fruit Body of *Phellinus linteus*. Korean J Food Sci Technol 32: 477–480
- Shiao MS, Lee KR, Lin JJ, Wang CT (1994) Phytochemicals for Cancer Prevention II, Teas, Spices and Herbs. American Chemical Society, Washington DC
- 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 Anti-thrombin and Antioxidation Activity of its Methanol Extract. Kor J Microbiol Biotechnol 36: 201–208
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Frovenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic acid. Anal Chem 150: 79–85
- Suh HJ, Noh DO, Choi YM (2002) Solubilization of onion with polysaccharide-degrading enzymes. Int J Food Sci Technol 37: 65–71
- Vlasta M, Romano B, Gerwin P (2001) Vibrational Spectroscopic Characterization of wild growing mushrooms and toadstools. Spectrochimica Acta Part A 57: 2815–2829