

뽕나무가루 첨가 배지에서 배양한 버섯균사체 배양물의 자유라디칼 유도 산화 억제

김석종¹ · 임동길² · 박철우¹ · 세르보로다메¹ · 형석원¹ · 이강권³ · 김정옥⁴ · 하영래^{1*}

¹경상대학교 응용생명과학부 · BK21 사업단 · 농업생명과학연구소, ²부산지방식품의약품안전청
³삼성에버랜드(주) 식품연구소, ⁴(주) HK바이오텍

Inhibition of Free Radical-Induced Lipid Oxidation by the Extract from Submerged-Liquid Culture of Mushrooms in the Medium Containing Mulberry Tree Powders

Seck-Jong Kim¹, Dong-Kil Lim², Cherl-Woo Park¹, Rhoda Mae Cerbo¹, Seok-Won Hyung¹, Kang-Kweon Lee³, Jeong-Ok Kim⁴ and Yeong-Lae Ha^{1*}

¹Division of Applied Life Science, BK21 Corps and Institute of Agricultural Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701 Korea

²Busan Regional KFDA, Busan 608-080, Korea

³Food Research and Development Center, Samsung Everland, Yongin 449-912, Korea

⁴HK Biotech. Co., Ltd, Jinju 660-932, Korea

Abstract

Antioxidant activity of extracts from the submerged-liquid culture of mushrooms was measured using two systems: linoleic acid and mouse liver microsomes induced by various free radical sources. Mushrooms of *Pleurotus ostreatus* (Neutari), *Phellinus linteus* (Sanghwang), *Paecilomyces japonicus* (Dongchunghacho), *Hericium erinacium* (Norugungdengyee) and *Agaricus blazei* (Shinryeong) in 1% mulberry tree powder-supplemented medium were incubated in a shaking incubator (200 rpm, 25°C) for 3 days. Hot water extracts of mycelial cultures were freeze-dried, followed by fractioning with hexane, chloroform, ethylacetate, and butanol in the order. Antioxidant activity of each sample was examined in free radical-induced linoleic acid oxidation in phosphate-buffered saline (PBS) solution by measuring the amount of malonaldehyde (MA), and mouse liver microsomal systems by measuring the amount of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). In linoleic acid oxidation system, hot water extracts from the cultures of *Pleurotus ostreatus*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces japonicus* exhibited stronger antioxidant activity than aqueous or butanol fraction and the combined fraction of hexane, chloroform and ethylacetate, but the hot water extract from *Pleurotus ostreatus* culture was the strongest activity. The antioxidant activity of the hot water extract from *Pleurotus ostreatus* culture was stronger than any other fractions in mouse microsomal system. These results suggest that hot water extract of *Pleurotus ostreatus* culture, and the cultures of *Phellinus linteus* and *Paecilomyces japonicus* could be useful for functional materials to reduce the oxidation of lipids in food systems induced by free radicals.

Key words: submerged-liquid culture of mushrooms, free radical, antioxidant, mulberry tree powders, malonaldehyde (MA), thiobarbituric acid

서 론

식품 또는 유지의 산화를 방지하기 위해 항산화제가 사용되고 있는데 이는 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), propyl galate(PG) 등과 천연 항산화제인 α -tocopherol, ascorbic acid, polyphenol 등이 사용되고 있다. 합성 항산화제는 가격이 싸고 효과가 탁월하여 식품가공 및 의약품에 널리 쓰이고 있으

나 안전성 문제가 있고(1-3), *in vivo*에서 항산화력이 강한 천연항산화제인 α -tocopherol 및 ascorbic acid 등은 *in vitro*에서는 항산화력이 떨어지는 문제가 있다(4,5). 따라서 안전성에 문제가 없고, 가격이 저렴하면서 *in vitro* 및 *in vivo*에서 항산화력이 강한 천연물 유래 항산화물질 개발에 관한 연구는 많이 수행되었고 또한 현재 수행되고 있다(6-8).

이들 천연 항산화제는 식물 또는 해조류 등의 천연물로부터 추출한 추출물이거나 분리·동정된 순수물질이라 하더라도

*Corresponding author. E-mail: ylha@nongae.gsnu.ac.kr
Phone: 82-55-751-5471, Fax: 82-55-757-0178

도 독성이 우려되고 있고(9,10), 원료인 천연물에 함량이 낮거나 계절성 등에 의해 원료수급이 어려워 실제 산업화하는데는 문제가 될 수 있다. 따라서 독성이 없거나 낮고, 원료수급에 문제가 되지 않는 저렴한 천연 항산화제를 개발하는 것이 중요하다.

버섯균은 주로 고사된 나무에 기생하여 생육하면서 아주 다양한 extra-cellular enzyme를 분비하여 자체의 영양분을 조달하는 고등균류로서 자연에는 수많은 식용 가능한 버섯균이 생육하고 있다. 이와 같은 버섯균의 생육 특성을 이용하여 액체배양을 할 경우, 배지의 조성 과 생육조건에 따라 항산화력을 갖는 다양한 중간 또는 대사산물을 얻을 수 있다. 즉, 버섯균은 배지에 함유된 성분을 다양한 기능성을 갖는 물질로 생물전환할 수 있고, 배지에 함유된 특수한 기능을 갖는 2차 대사산물 자체도 배양액으로 유입시킬 수도 있다. 또한 버섯균이 생산하는 여러 가지 기능성 물질(특히 β -D-glucan 등과 같은 기능성 물질)도 배양액에 부가시킬 것이다. 대부분의 생물에 의한 생물생산은 계절의 제한을 받지만 이와 같은 버섯균배양물의 생산은 계절에 영향을 받지 않고, 값싸게 대량생산이 가능하여 원료공급이 용이하고, 산업화가 쉽다.

Kim 등(11)은 뽕나무가루가 첨가된 배지에 여러 가지 버섯균을 배양한 배양물이 *in vitro* 실험에서 linoleic acid의 자동산화 반응을 억제함을 구명하였다. 이는 linoleic acid를 ethanol과 PBS 완충용액의 혼합물에서 반응(37°C)시킬 때에 일어나는 자동산화를 억제하는 것이었는데, 이 산화반응은 자유라디칼에 의해 일어나는 산화반응과는 차이가 있다. 따라서 이들 배양물이 자유라디칼 유도 산화 system에서도 항산화 효과를 갖는지 연구할 필요가 있다.

본 연구에서는 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)을 뽕나무가루가 첨가된 배지에서 배양하고 그 배양물이 자유라디칼로 linoleic acid를 산화시키는 system에서 항산화 효과가 있는지를 연구하였으며, 상황버섯(*Phellinus linteus*), 동충하초버섯(*Paecilomyces japonicus*), 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinacium*) 및 신령버섯(*Agaricus blazei*) 배양물의 항산화 효과와 비교 검토하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

뽕나무건조분말은 시중 건재약초상(Jinju, Korea)에서 구입하였으며, 버섯균(*Pleurotus ostreatus*, *Phellinus linteus*, *Paecilomyces japonicus*, *Hericium erinacium* 및 *Agaricus blazei*)은 (주)HK바이오택(Jinju, Korea)으로부터 분양 받았고, 산업용 cellulase와 protease는 태평양화학(Ansan, Korea)에서 구입하였다. 또한 BHT, α -tocopherol, ascorbic acid, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH), 2,2'-azo-bis[isobutyronitrile](ABIN), cumene hydroper-

oxide(CuOOH), linoleic acid 및 ethanol(HPLC grade)은 Sigma사(St. Louis, MO)로부터 구입하였고, thiobarbituric acid(TBA), 1,1,3,3-tetra-methoxypropane(TMP), ferrous ammonium sulfate, phosphoric acid, sodium dodecylsulfate, ferrous chloride 및 hydrogen peroxide는 Aldrich사(Milwaukee, WI)로부터 각각 구입하였으며, 그 외 사용된 모든 시약은 1급 이상이었다.

버섯균액체배양

액체배지 : 기본배지(밀과 대두를 cellulase와 protease를 처리하여 분해시키고 여기에 황백당, $MgSO_4$, KH_2PO_4 첨가)에 뽕나무건조분말 1%(v/w)를 첨가한 배지를 121°C에서 20분 동안 고압멸균(Jeio Tech, Daegu) 하여 사용하였다.

배양조건 : 멸균한 배지에 종배양 한 버섯균을 접종하고 5 L 용량의 발효조(Kobiotech, Incheon)를 이용하여 3일간 배양하였다(11).

시료조제 및 분획

버섯균체배양액을 멸균(121°C, 15분)한 후 여과하여 균사체와 잔사를 제거하고 여액을 동결건조하였다(Ilshin, Seoul). 동결건조물 3 g을 Fig. 1과 같은 방법으로 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 및 액상으로 분획하였다.

in vitro 항산화성 측정

MA 측정 : Fenton's reagent 방법(12)에 준하여 MA의 함량을 측정을 하였다. 반응액 4.90 mL(2% sodium dodecyl sulfate, 1 μ M ferrous chloride, 0.5 mM hydrogen peroxide)에 시료 30 mg/100 μ L을 첨가하고 여기에 25 μ M의 linoleic acid를 첨가하여 55°C에서 일정 기간(1, 3, 6일) 반응하여 MA의 함량을 측정하였다. 0.5 mL의 시료 반응물을 함유한 screw-capped test tube에 1% phosphoric acid(3 mL)와 0.6% TBA 용액(1 mL)을 첨가하고 10초간 2회 헐타시킨 후 boiling water bath에서 45분간 반응시킨 다음 실온에서 냉각시킨 후 butanol(4 mL)을 첨가하여 10초간 강하게 흔들어서 추출한 다

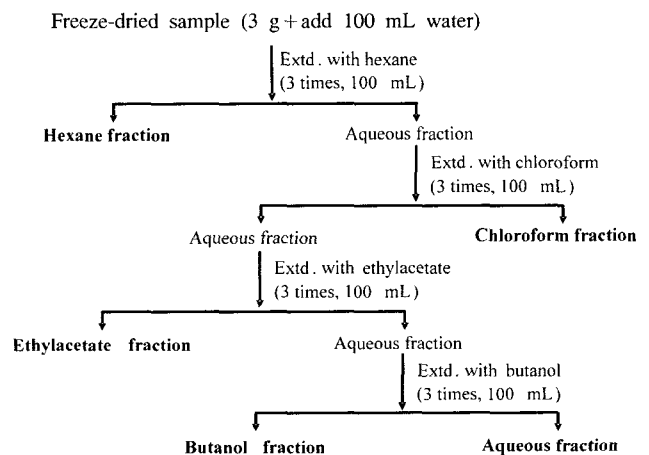


Fig. 1. Solvent fractionation of freeze-dried samples of the submerged-liquid culture of mushroom strains.

음 원심분리(2,000 rpm, 3분)하였다. Butanol층을 535 nm의 흡광도에서 측정하여 표준곡선으로부터 MA 값을 측정하였다. 각각 200 nM의 α -tocopherol, ascorbic acid, BHT를 positive control로서 사용하였다. 표준곡선 작도를 위해 사용된 TMP의 농도는 2, 4, 6, 8, 10 nmol이었다.

Mouse liver microsome에 의한 항산화성 실험

동물실험 : Female ICR mouse(6주령)는 β -chip이 깔린 polycarbonate cage(5 mice/cage)에서 mouse용 chow(Life Science, Daegu)로 1주일동안 예비 사육하여 체중이 24 ± 1 g인 것을 사용하였다. 물과 사료를 자유롭게 먹도록 하였고, 조명은 12시간 간격의 light-and-dark cycle을 유지하여 자연조명에 가깝게 하였으며, 사육실의 온도는 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도는 60%로 조절하였다. 각 시료(100 mg/0.2 mL PBS)와 BHT(5 mg/0.2 mL PBS) 0.2 mL를 10일 동안 매일 경구 투여하였다. 대조구는 PBS(0.2 mL)만을 경구 투여하였다. 처리 14일 후 mouse를 희생하여 간을 적출하고 microsome을 분리하여 실험에 사용하였다(13).

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)

측정 : Microsome에 산화유도물질 (NADPH/ Fe^{2+} , ascorbic acid/ Fe^{2+} , CuOOH, ABIN)을 Table 1과 같이 처리하고 Kim 등(14)의 방법에 따라 생성된 TBARS를 측정하였다.

통계분석

각 data는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 유의차 검정은

분산분석을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하였다.

결 과

버섯균배양물의 분획물

뽕나무가루가 첨가된 배지에서 배양한 *Pleurotus ostreatus*, *Phellinus linteus*, *Paecilomyces japonicus*, *Hericicum erinacium* 및 *Agaricus blazei* 버섯균배양물을 동결건조 한 다음 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 및 수용성 분획으로 분획 하였으며, 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 각 분획물의 함량은 버섯균에 따라 차이가 있었다. 분획 중 함량이 가장 많은 분획은 수용성 분획으로 그 함량은 88.16%(*Phellinus linteus*)~92.87%(*Pleurotus ostreatus*)였다. 그 다음으로 함량이 많은 분획은 butanol 분획으로 그 함량이 4.24%(*Pleurotus ostreatus*)~9.92%(*Phellinus linteus*) 범위였다. 그 외 hexane, chloroform 및 ethylacetate 분획의 총 함량이 3% 이하로 아주 낮았다. 이 결과는 버섯균 배양물에는 수용성 물질이 대부분을 차지하고 지용성물질은 아주 적은 양이 함유되어 있음을 의미한다.

Fenton 시약에 의한 linoleic acid 산화 억제효과

뽕나무가루가 첨가된 배지에서 배양한 각 버섯균사체 배양물의 조추출물, butanol 및 수용성 분획, 그리고 분획혼합

Table 1. Composition of the mouse liver microsomal lipid peroxidation media induced by various free-radical generating agents

Treatment	Constituent (mL)							Total
	Microsome	Tris-HCl ¹⁾	Ascorbic acid ²⁾	NADPH ³⁾	Fe ²⁺ ⁴⁾	ABIN ⁵⁾	CuOOH ⁶⁾	
Control	1	0.5	·	·	·	·	·	1.5
Ascorbic acid/ Fe^{2+}	1	·	0.25	·	0.25	·	·	1.5
NADPH/ Fe^{2+}	1	0.1	·	0.15	0.25	·	·	1.5
ABIN	1	·	·	·	·	0.5	·	1.5
CuOOH	1	·	·	·	·	·	0.5	1.5

¹⁾Tris[hydroxymethyl]aminomethane (pH 7.4, 50 mM).

²⁾Ascorbic acid (0.5 mM).

³⁾ β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (0.2 mM).

⁴⁾Ferrous ammonium sulfate (1 μM).

⁵⁾2,2'-Azobis[isobutyronitrile] (40 mM).

⁶⁾Cumene hydroperoxide (0.1 mM).

Table 2. Fraction ratio of hot-water extracts from submerged-liquid culture of mushroom strains in basal media containing 1% mulberry tree powder¹⁾

Mushroom strain ²⁾	Fraction ratio (%)					Total (%)
	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol	Aqueous	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0.61	1.38	0.90	4.24	92.87	100
<i>Hericicum erinacium</i>	0.80	0.83	1.18	7.38	89.81	100
<i>Phellinus linteus</i>	0.51	0.61	0.80	9.92	88.16	100
<i>Paecilomyces japonicus</i>	1.67	0.35	0.62	4.64	92.72	100
<i>Agaricus blazei</i>	1.75	1.35	0.52	7.54	88.84	100

¹⁾Sample was obtained from the submerged-liquid culture of mushroom strains in BMM for 3 days.

²⁾Mushroom strain identification: *Pleurotus ostreatus* (Neutari); *Hericicum erinacium* (Norugungdengyee); *Phellinus linteus* (Sanghwang); *Paecilomyces japonicus* (Dongchunghacho); and *Agaricus blazei* (Shinryeong).

물(hexane, chloroform 및 ethylacetate)을 linoleic acid와 Fenton 시약이 함유된 배지에 가하여 1, 3, 6일간 반응시켜 MA 함량을 측정하였다. 시료 분획물에 의해 생성된 MA의 함량을 BHT, ascorbic acid, α -tocopherol에 의해 생성된 MA의 함량과 비교하였다(Fig. 2, 3).

Fig. 2에서는 뽕나무가루가 첨가된 배지에서 배양한 느타리버섯균사체 배양물 분획들의 MA 생성억제 정도를 나타내고 있다. 대조구에서는 1일간 반응시킨 시료의 MA의 함

량이 약 43 nmol이었고, 3, 6일 반응시킨 시료의 MA의 함량은 1일 반응 시료와 큰 차이가 없어, 1일간 반응에 의해 MA의 생성이 최대로 되었다. 시료의 조추출물 또는 분획에 의한 효과는 차이가 있었지만 3일간 반응에서 MA의 생성이 최대가 되었다. 대조구와 비교하여 조추출물, 분획혼합물, 수용성 및 butanol 분획은 MA의 생성을 지연시켰다. 즉 반응 3일에는 대조구의 MA함량과 유사하였지만, 반응 1일의 MA의 함량은 조추출물이 10.4 nmol, 분획혼합물이 15.5 nmol, 수용

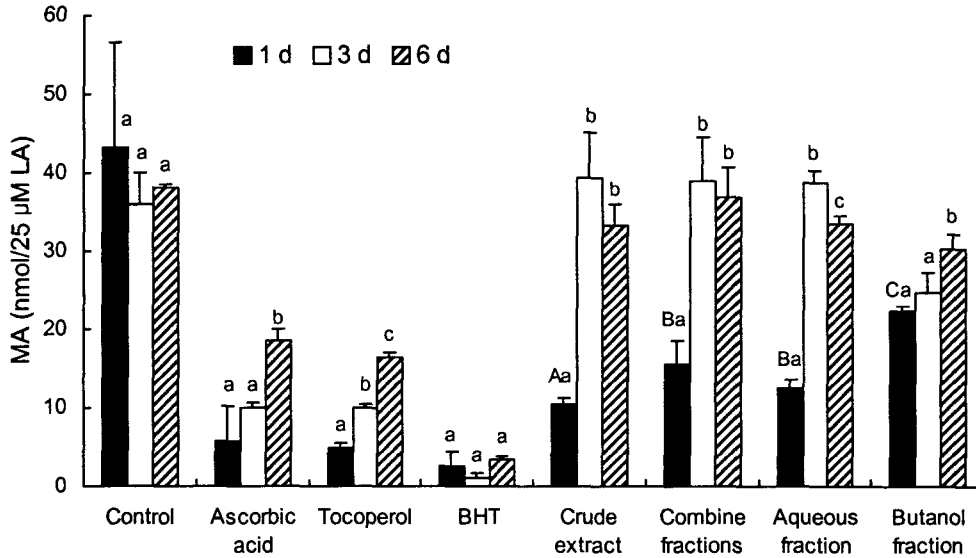


Fig. 2. Effects of fractions from the submerged-liquid culture of *Pleurotus ostreatus* on the amount of MA produced in the linoleic acid oxidation system induced by Fenton's reagent. 1, 3 and 6 represent incubation days at 55°C. Bars with same small letters in given treatments and same capital letters between treatments are not significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple test.

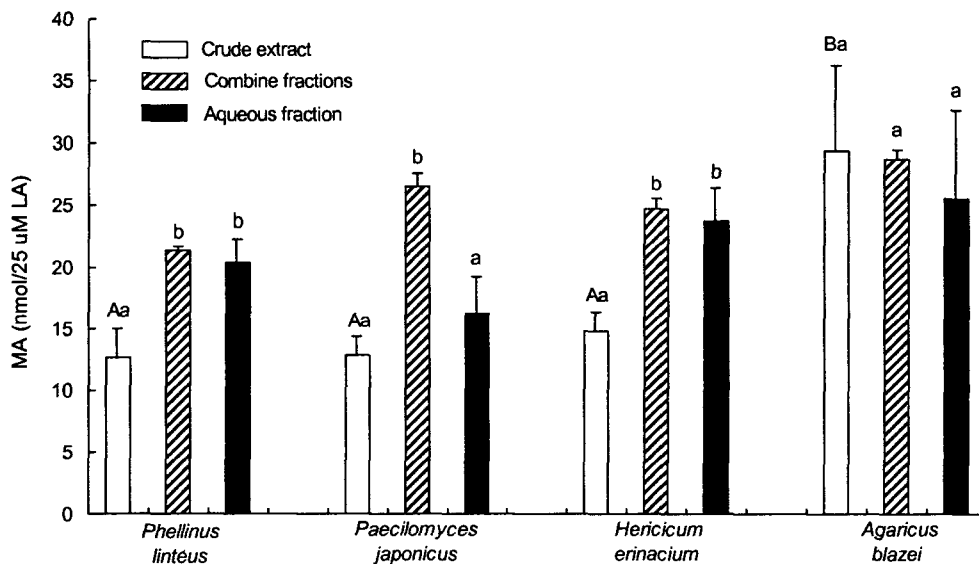


Fig. 3. Effects of fractions from the submerged-liquid cultures of *Phellinus linteus* (Sanghwang), *Paecilomyces japonicus* (Dongchunghacho), *Hericium erinacium* (Norugung-dengyee) and *Agaricus blazei* (Shinryeong) on the amount of MA produced in the linoleic acid oxidation system induced by Fenton's reagent. Data was derived from 1 day incubation at 55°C. Bars with same small letters in given mushroom strains or capital letters between mushroom strains are not significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple test.

성 분획이 12.6 nmol, butanol 분획이 22.4 nmol로서 조추출물과 수용성 분획이 MA의 생성 억제력이 강하였고, butanol 분획은 그 효과가 떨어졌다. 이 효과는 ascorbic acid, α -tocopherol, BHT(1일간 반응에서 각각 MA가 5.8, 5.0, 2.5 nmol)보다 떨어졌다. 그러나 조추출물, 분획혼합물과 수용성 분획을 1일간 배양한 효과는 ascorbic acid 및 α -tocopherol의 3일간 배양한 효과와 유사하였다.

Fig. 3에서는 다른 버섯균사체 배양물 시료의 항산화 효과를 비교하기 위하여 1일간 반응시켜 생성된 MA 양을 나타내었고, 이 결과를 Fig. 2의 결과와 비교하였다. BHT, α -tocopherol 및 ascorbic acid가 대조구와 비교하여 각각 94.3, 88.4, 86.5% MA 생성 억제 효과를 나타내었으나 버섯균사체 배양물로부터 얻은 조추출물, 분획혼합물, 수용성 분획의 효과는 이들 항산화제보다는 낮았다. 또한 모든 조추출물의 효과는 분획혼합물과 수용성 분획보다 높았다. 조추출물 중에서는 느타리버섯균사체 배양물의 조추출물이 75.9%(Fig. 2), 상황버섯균사체 배양물의 조추출물은 70.7%, 동충하초버섯균사체 배양물의 조추출물은 70.2%, 노루궁둥이버섯균사체 배양물의 조추출물은 65.8%, 신령버섯균사체 배양물의 조추출물은 31.8%의 MA 생성 억제 효과를 나타내었다. 또한 버섯균을 배양하지 않은 뽕나무가루가 첨가된 배지로부터 얻은 조추출물은 대조구에 비해 MA의 생성을 29.9% (30.2 nmol) 억제하였으나, 버섯균배양물로부터 얻은 조추출물의 MA 억제효과보다는 낮았다. 따라서 이 결과는 조추출물이 다른 분획물보다 MA 생성 억제능이 우수함을 의미하고, 그 중에서 느타리버섯균사체 배양물의 조추출물이 가장 우수하였으나 상황버섯균사체 배양물의 조추출물 및 동충하초버섯균사체 배양물의 조추출물도 효과가 이와 유사하였다.

Mouse liver microsomes의 lipid peroxidation 억제 효과

앞의 *in vitro* 실험에서 느타리버섯, 상황, 동충하초버섯 균사체 배양물이 우수한 항산화성을 나타내었으나 가장 항

산화성이 우수한 느타리버섯균사체 배양물만 mouse liver microsomes의 안정성 연구에 사용하였다. 느타리버섯균사체 배양물로부터 분리된 분획물(수용성, 분획혼합물 및 butanol) 및 조추출물의 TBARS 함량 감소효과를 동물실험을 통하여 검증하였다. 각 분획물(100 mg/0.2 mL PBS)과 BHT (5 mg/0.2 mL PBS)를 female ICR mouse에 매일 1회 10일간(총 10회) 경구투여하고, 시료 처리 14일에 mouse를 희생하여 간을 적출하고 microsomes을 분리하였다. Microsomes에 산화유도물질(NADPH/Fe²⁺, ascorbic acid/Fe²⁺, CuOOH, ABIN)을 처리하여 TBARS 함량을 측정된 결과를 Table 3에 나타내었다.

전체 처리구에서 CuOOH 및 ABIN 유도물질에 의한 TBARS의 함량이 NADPH/Fe²⁺ 및 ascorbic acid/Fe²⁺에 의한 경우보다 높았다. 느타리버섯균사체 배양물의 조추출물, 분획혼합물, butanol 및 수용성 분획이 효과적으로 TBARS를 감소시켰다. 산화유도물질과 관계없이 조추출물은 대조구에 비해 유의성있게 TBARS의 함량을 감소시켰고 그 효과는 BHT의 효과와 유사하였다. 수용성, 분획혼합물, butanol 분획은 NADPH/Fe²⁺, ascorbic acid/Fe²⁺, ABIN 유도물질에서 그 효과가 비슷하였고 대조구에 비해 유의성 있게 감소시켰으나 CuOOH 유도물질에 대해서는 효과가 낮았다.

고찰

본 연구에서 뽕나무가루 첨가 배지에서 배양한 버섯균사체 배양물의 조추출물이 자유라디칼로 유도한 linoleic acid와 mouse liver microsomes의 산화를 억제함을 구명하였다. 그 중에서도 느타리버섯균사체 배양물의 효과가 가장 뛰어났다. 사용한 두 산화 system(자유라디칼로 유도한 linoleic acid와 mouse liver microsomes의 산화 억제효과)에서 느타리버섯균사체 배양물의 조추출물이 수용성, 분획혼합물 및 butanol 분획보다 항산화 효과가 우수하였다(Fig. 2, Table 3). 따라서 뽕나무가루 첨가 배지에서 배양한 느타리버섯균사

Table 3. Effects of fractions from the extract of submerged-liquid culture of *Pleurotus ostreatus* on lipid peroxidation of the mouse liver microsomes induced by free radical generating agents

Treatment	Agent			
	Ascorbic acid/Fe ²⁺	NADPH/Fe ²⁺	ABIN	CuOOH
Control ¹⁾	0.16 ^{a2)}	0.14 ^d	0.70 ^a	0.87 ^a
BHT	0.05 ^d (68.8) ³⁾	0.06 ^{bc} (57.1)	0.40 ^c (42.9)	0.54 ^c (37.9)
Methanol extract ⁴⁾	0.11 ^c (31.3)	0.05 ^c (64.3)	0.52 ^{bc} (25.7)	0.69 ^b (20.7)
Crude extract	0.10 ^c (37.5)	0.05 ^c (64.3)	0.48 ^c (31.4)	0.64 ^{bc} (26.4)
Fractions combined	0.12 ^{bc} (25.0)	0.06 ^{bc} (57.1)	0.58 ^b (17.1)	0.75 ^{ab} (13.8)
aqueous fraction	0.12 ^{bc} (25.0)	0.08 ^b (42.9)	0.57 ^b (18.6)	0.73 ^{ab} (16.1)
Butanol fraction	0.13 ^b (18.8)	0.08 ^b (42.9)	0.53 ^{bc} (24.3)	0.77 ^{ab} (11.5)

¹⁾Treatment without sample.

²⁾MA nmol/min/g protein. Means followed by the different letter in same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple test.

³⁾The number in the parenthesis means the percentage against control.

⁴⁾Methanol extract of mulberry tree powder.

체 배양물을 항산화성 소재로 활용하기 위해서는 분획물보다 조추출물을 사용하는 것이 바람직하다.

뽕나무가루 첨가 배지에서 배양한 느타리버섯균사체 배양물의 조추출물이 다른 분획보다 항산화성이 높은 것은 현재 정확히 알 수 없어 앞으로 더욱 연구가 수행되어야 할 것이다. 그러나 이 조추출물에는 원료물인 뽕나무 및 대두에서 유래한 물질, 느타리버섯에 의해 생물 전환된 물질, 또는 느타리버섯으로부터 유래한 물질 등이 함유되어 있을 것이다. 수용성물질에는 β -D-glucan, protein, peptide 등이 함유되어 있을 것이고, butanol 분획은 수용성 분획보다 다소 지용성인 물질이 함유되어 있을 것이지만 이런 물질은 다소 항산화성이 낮은 물질임에는 틀림이 없다. 왜냐하면 분획혼합물은 항산화성이 다소 낮았기 때문이다. 따라서 이 조추출물에는 이들 모든 물질이 혼합되어 있어 이들 물질의 항산화 시너지효과를 기대할 수 있을 것이다.

이 연구에서는 느타리버섯균사체 배양물의 조추출물과 분획물에 관한 항산화성 관련물질을 분리 동정을 하지 않았다. 그러나 항산화효과에 관련되는 성분은 여러 가지 측면에서 고찰될 수 있다. 첫째 뽕나무에 함유된 rutin, quercetin, isoquercitrin, flavonoids 등의 물질(15-17), 대두에서 유래한 genistein(4,5,7-trihydroxyisoflavone), daidzein(4,7-dihydroxyisoflavone) 등의 isoflavones, phytosterol 등의 화합물(18-22), 버섯균사체가 생산하는 β -D-glucan, chitin 등(23, 24)의 당 관련 화합물 등이 느타리버섯균사체 배양 시 배지 속으로 유출되었을 것이다. 두 번째로는 버섯균이 생육하는 중 여러 가지 효소에 의해 뽕나무 및 대두에 함유된 항산화성이 낮은 화합물이 항산화성이 높은 물질로 생물전환되었을 수도 있다. 마지막으로 버섯균이 생육하면서 분비하는 물질도 항산화성에 관여하였을 것이다. 상황버섯균사체 및 동충하초버섯균사체 배양물의 조추출물이 느타리버섯균사체 배양물의 조추출물과 유사한 항산화성을 나타내었다. 이 결과는 근본적으로 이들 버섯균의 효소가 서로 유사하여 배지에 함유된 성분을 비슷한 물질로 생물 전환하였을 가능성이 높다. 따라서 이런 생물전환된 물질들은 분리 동정에 관한 연구는 수행되어야 할 것이다.

버섯자실체의 항산화성에 관한 연구는 많이 수행되었다(6,25-28). 버섯자실체의 항산화성 연구를 위해 사용된 추출용매는 methanol(25,26), 70% ethanol(27), ethanol(28), 물(6) 등이 사용되었고, 항산화성은 버섯자실체의 종류에 따라 또한 추출방법에 따라 상이하였다. 그러나 버섯자실체의 항산화성은 대체적으로 polyphenol의 함량에 비례하였다.

반면에, 버섯균사체의 항산화성에 관한 연구보고는 많지 않다. Jung 등(29)은 느타리버섯 균사체 추출물을 용매추출하였을 경우 ethanol 분획이 수용성분획이나 hexane 분획보다 항산화성이 높았음을 보고하였다. 이 연구결과는 단순히 버섯균사체 추출물에 관한 항산화성을 연구한 결과이기 때문에 본 연구와는 상이하다. 본 연구는 항산화성을 증가시키

기 위해 뽕나무가루를 첨가한 배지에 버섯균을 배양하고 그 배양 추출물(버섯균사체로부터 추출된 추출물과 배양물)에 관한 항산화 연구이기 때문에 용매분획을 하였을 경우 많은 항산화성물질(polyphenol성 물질 및 생물전환된 물질)이 용매 분획 시 사용된 용매의 특성에 희석이 되었기 때문에 조추출물에서 가장 우수한 항산화 효과가 나타난 것이라고 생각된다. 또한 이들 대부분의 연구는 자동산화에 관한 연구였다.

버섯균사체배양물을 항산화성 소재로 활용하기 위해서는 항산화성물질을 분리 및 정제를 하여야 할 것이나 이들의 물질이 단독보다는 복합적으로 작용할 시 항산화력이 증가되었다. 따라서 버섯균배양 시 첨가한 뽕나무는 식품의 부재료로 사용이 허가된 것이기 때문에 물질의 분리 없이 버섯균 배양물(특히 항산화력이 우수한 느타리, 상황, 동충하초버섯균사체 배양물)을 동결건조하여 분말 또는 다른 제제 형태로 식품 항산화제로 사용함도 바람직하다. 이 경우 생물전환된 특수한 물질이 존재할 가능성 때문에 안정성 검사를 수행하여야 필요가 있을 것이다.

요 약

뽕나무가루 첨가 배지에서 배양한 느타리버섯균사체 배양물의 조추출물이 자유라다칼로 유도한 linoleic acid의 산화를 대조구에 비해 75.9% 감소시켰고, mouse liver microsome 산화에서도 NADPH/Fe⁺⁺ system에서 64.3% 감소시켰다. 이와 같은 효과는 조추출물로부터 용매분획한 분획물의 단독 효과보다 우수하였다. 상황 및 동충하초버섯균사체 배양물의 조추출물도 느타리버섯균사체 배양물의 조추출물과 효과가 유사하였지만 다소 낮았다.

감사의 글

본 연구는 경상대학교 농생명 대학원육성 BK21지원사업 연구비(삼성에버랜드)에 의해 수행되었음을 감사드립니다.

문 헌

1. Barlow SM. 1990. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In *Food Antioxidants*. Hudson BJJ, ed. Elsevier, Amsterdam. p 253-307.
2. Ito N, Hirose M, Fukeshima S, Tsuda H, Shirai T, Tate-matsu M. 1986. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food Chem Toxicol* 24: 1099-1102.
3. Botterweck AAM, Verhagen H, Goldbohm RA, Kleinjans J, Brandt PA. 2000. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food Chem Toxicol* 38: 599-605.
4. Elliott JG. 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech* 53: 46-48.
5. Yamamoto K, Niki E. 1988. Prooxidant effect of α -toco-

- pherol. *BBA* 958: 19-23.
6. Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem* 81: 249-255.
 7. Pratt DE, Hudson B. 1996. Natural antioxidant not exploited commercially. In *Food antioxidants*. Hudson B, ed. Elsevier, Amsterdam. p 171-192.
 8. Larson RA. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochem* 27: 969-974.
 9. Lu H, Meng X, Lee MJ, Li C, Maliakal P, Yang CS. 2003. Bioavailability and biological activity of tea polyphenols. In *Food Factors in Health Promotion and Disease Prevention* (ACS Symposium Series 851). Shahidi F, Ho CT, Watanabe S, Osawa T, eds. American Chemical Society, Washington, DC. p 9-15.
 10. Yanishlieva-Maslarova NV. 2001. Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. In *Antioxidants in Foods: Practical applications*. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M, eds. CRC Press, New York. p 210-249.
 11. Kim SJ, Lim DK, Park SJ, Kim MS, Kim JO, Lee KK, Ha YL. 2003. Inhibition of lipid autooxidation by the extract of the submerged liquid culture of mushrooms in the medium containing mulberry tree powders. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 249-254.
 12. Kim BJ, Kim JH, Kim HP, Heo MY. 1997. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): antioxidative activity and free radical scavenging activity. *International J Cosmetic Sci* 19: 299-307.
 13. Martinez MJ, Ruiz JI, Lacort M, Ochoa B. 1991. Diurnal variations of rat liver enzymes catalyzing cholesterol ester hydrolysis. *BBA* 1085: 106-111.
 14. Kim HC, Park SJ, Kim JK, Park CW, Cho YU, Cho HJ, Ha YL. 2002. Effect of egg yolks from laying hens intubated astaxanthin on the oxidation of liver microsome of mouse. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 155-159.
 15. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
 16. Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci* 163: 1161-1168.
 17. Fukai T, Pei YH, Nomura T, Xu CQ, Wu LT, Chen YL. 1998. Isoprenylated flavanones from *Morus cathayana*. *Phytochem* 47: 273-280.
 18. Hui E, Henning SM, Park N, Heber D, Go VL. 2001. Genistein and daidzein/glycitein content in tofu. *J Food Comp Anal* 14: 199-206.
 19. Berhow MA, Wagner ED, Vaughn SF, Plewa MJ. 2000. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. *Mut Res* 448: 11-22.
 20. Fritz KL, Seppanen CM, Kurzer MS, Csallany AS. 2003. The in vivo antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects. *Nutr Res* 23: 479-487.
 21. Boue SM, Wientjes CC, Shih BY, Cleveland TE. 2003. Identification of flavone aglycones and glycosides in soybean pods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromat A* 991: 61-68.
 22. Zhou JR, Gugger ET, Tanaka T, Guo Y, Blackburn GL, Clinton SK. 1999. Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice. *J Nutr* 129: 1628-1635.
 23. Song KS, Cho SM, Lee JH, Kim HM, Han SB, Ko KS, Yoo JD. 1995. Blymphocyte stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem Pharm Bull* 43: 2105-2108.
 24. Kim SJ, Park SJ, Park CW, Kim YS, Cho HJ, Lim DK, Kim JO, Lee JH, Ha YL. 2003. Enhanced anticarcinogenicity and antimutagenicity of *Doenjang* prepared from mushroom mycelia-cultured traditional *Mejus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 143-148.
 25. Yang JH, Lin HC, Mau JL. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* 77: 229-235.
 26. Mau JL, Lin HC, Song SF. 2002. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Research International* 35: 519-526.
 27. Song YS, Kim SH, Sa JH, Jin C, Lim CJ, Park EH. 2003. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *Journal of Ethnopharmacology* 88: 113-116.
 28. Ma SJ. 1983. Effects of the substances extracted from dried mushroom (*Lentinus edodes*) by several organic solvents on the stability of fat. *Korean J Food Sci Technol* 15: 150-154.
 29. Jung IC, Park S, Park KS, Ha HC, Kim SH, Kwon YI, Lee JS. 1996. Antioxidative effect of fruit body and mycelial extracts of *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Food Sci Technol* 28: 464-469.

(2003년 7월 29일 접수; 2004년 1월 28일 채택)