

## 버섯균사체 배양기질로서의 손바닥선인장의 활용과 그 배양추출물의 기능적 특성

문상욱<sup>1</sup> · 박수영 · 최수연 · 황준호 · 장미경 · 진영준 · 정완석 · 김세재\*

<sup>1</sup>(주)퍼멘텍, 제주대학교 생명과학과 및 생명과학기술혁신센터

Received February 27, 2006 / Accepted March 24, 2006

**Utilization of *Opuntia ficus-indica* as a Substrate for the Growth of Mushroom Mycelia and the Functional Properties of its Culture Extracts.** Sang-Wook Moon<sup>1</sup>, Soo-Yeong Park, Soo-Youn Choi, Joon-Ho Hwang, Mi-Kyoung Jang, Yeong-Jun Jin, Wan-Seok Chung and Se-Jae Kim\*. <sup>1</sup>Fermentech. Co. Ltd., Department of Life Science and Technology Innovation Center for Life Science, Cheju National University, Ara-1, Jeju, Jeju 690-756, Korea – This study was performed to know the potentialities of the fruits of *Opuntia ficus-indica*, as a medium for mushroom mycelial culture. Five mushroom mycelial (*Agrocus blazei*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceum*, *Innonotus obliquus*, *Phellinus linteus*) were grown on the malt extract broth (MEB) and the cactus broth medium (CB). The submerged culture mixtures were extracted using equal volume of ethyl acetate, and their extract yields, total polyphenol contents, and some physiological activities were compared with each other. Each extract from mycelial culture grown on CB medium showed remarkable enhancement in physiological activities compared with each counterpart grown on MEB. Among five mycelial cultures grown on CB medium, the extract yield and polyphenyl content were highest in the extract from *Grifola frondosa* (extract yield, 0.4 g/L and polyphenol content, 22.7%). Also, the extracts from *Grifola frondosa* showed the highest physiological activities, such as DPPH radical scavenging (IC<sub>50</sub> = 362.9 µg/ml), xanthine oxidase inhibition (about 80% at 500 µg/ml), and superoxide radical scavenging (about 80% at 500 µg/ml), and NO production inhibition (IC<sub>50</sub> = 43.1 µg/ml) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. This result suggests that the fruit of *Opuntia ficus-indica* can be used as a culture medium for improving the functional properties of various mushroom mycelia.

**Key words** – Fruit of *Opuntia ficus-indica*, mushroom mycelium, antioxidant activities, NO production

### 서 론

제주도에서 대량 경작되는 손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica* var. *sarboten*)은 중심자목 선인장과에 속하는 다년생 초본이다. 손바닥선인장의 열매는 서양 배모양이며 많은 종자가 들어 있고 다량의 점질물을 함유하고 있다[9,18]. 또한, 무기질, 식이섬유, 폴리페놀이 다량 함유되어 있어 식품소재로 이용 가능성이 높다[23]. 손바닥선인장의 열매는 백년초라는 별도의 명칭을 가지고 있으며, 예로부터 열매와 줄기를 공복에 갈아 마시면 변비, 이뇨효과, 장운동 활성화 및 식욕증진에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 손바닥선인장의 열매에는 (+)-trans-dihydrokaempferol, (+)-trans-dihydroquercetin, anhalinin, indicaxanthin, isobetain, betain, saponin 등의 플라보노이드류가 함유되어 있고 쥐의 스트레스성 위궤양에 대한 항궤양 효과와 항염 효과가 있으며 [4,12], 손바닥선인장의 열매 및 줄기 추출물에서 항진통 및 항소염 작용 등도 보고된 바 있다[7,25,27].

남아메리카와 일본의 후쿠오카 지방에서는 선인장을 식품소재로 활용하여 다양한 가공품들이 개발되어 판매되고 있

다[23]. 그러나 제주도에서 생산되는 손바닥선인장은 대부분 착즙하여 음료로 가공되거나 혹은 식품첨가물로서 정장효능을 증진시킨 선인장 요구르트, 과자류, 다류, 양식어 사료첨가제 등의 제품들이 출시되고 있는 정도이다. 최근에는 손바닥선인장 열매에 대한 기능성 연구가 다수 진행됨에 따라 전통주와 침출주 등이 개발되어 제품화가 이루어지고 있다 [1,2,22]. 그러나 제주도에서 대량 생산되는 손바닥선인장의 판로를 개척하기 위해서는 손바닥선인장을 다양한 용도를 개발하는 연구가 필요한 실정이다.

까치버섯, 버들송이, 조개껍질버섯 등의 자실체 및 균사체로부터 다양하고 유의한 새로운 항암 및 항생물질들이 밝혀졌으며[28], 식품으로 사용가능한 다양한 버섯균사체에서 항암, 항산화 활성을 중심으로 연구가 수행되어 왔다. 이들 중에서 상황버섯, 차가버섯, 영지버섯, 운지버섯 등은 항암 및 면역활성이 우수한 것으로 보고되었으며, 이들로부터 추출·분리된 유효성분인 다당체와 관련한 더욱 세부적인 연구가 진행되고 있다[6,14,15,19,20,28]. 건강소재로 주목을 받고 있는 버섯은 동일한 속내의 종인데도 불구하고 그 약리활성은 종에 따라 다양한 것으로 알려져 있는데, 균주뿐만 아니라 배양조건, 배지 종류 등에 따라서도 다양한 생리활성이 나타나는 것으로 알려져 있다[21]. 현재까지 손바닥 선인장을 버섯균사체의 배지로 활용한 예는 극히 드물지만 탄수화

\*Corresponding author

Tel : +82-64-754-2135, Fax : +82-64-726-3539

E-mail : sjkim@cheju.ac.kr

물의 상대적인 함량이 높은 선인장 열매 및 줄기는 버섯 균사체의 배지로 활용 가능성은 매우 높다. 본 연구에서는 손바닥선인장 열매를 배양기질로 사용하여 5 종류의 버섯 균사체를 배양하여 이들 배양액 추출물의 생리활성을 탐색하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

손바닥선인장은 제주도 복제주군 한림읍 금능리 소재 선인장 마을로부터 일정 기간에 수확한 비교적 동질의 선인장 열매이며 실험에 이용될 때까지 -20℃에서 보관하였다. 신령버섯(*Agaricus blazei*), 잎새버섯(*Grifola frondosa*), 차가버섯(*Inonotus obliquus*), 상항버섯(*Phellinus linteus*) 종균은 한국생명공학연구원 생물자원센터(BRC)에서 구입하였으며, 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*) 종균은 일본 제품평가기술기반기구(NITE)에서 구입하였다.

### 버섯균사체 배양 및 시료 추출

버섯균사체를 배양하기 위한 손바닥선인장 액체배지(Cactus Broth : CB)는 열매를 믹서기로 완전 분쇄하여 열처리한 후, 증류수를 첨가하여 선인장 농도를 30% (w/v) 되도록 조절한 후, 121℃에서 15분간 멸균하여 제조하였다. 한편, 손바닥선인장 액체배지와 비교하기 위한 배지로는 Malt Extract Broth (MEB)를 사용하였다. 이들 배지에 버섯 균사체를 5% (v/v) 되도록 접종하여 25℃에서 10일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 버섯균사체와 배양액 혼합물을 100℃에서 1시간 동안 열처리한 후 동량의 에틸아세테이트를 첨가하여 에틸아세이트 분획을 얻었다. 분획물은 감압농축하여 건조분말로 만들어 생리활성 분석을 위한 시료로 사용하였다.

### 폴리페놀 화합물의 함량분석

폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법[12]을 약간 변형시켜 측정하였다. 에틸아세테이트 분획(1 mg/ml in PBS) 0.2 ml를 시험관에 취하고 증류수를 가하여 2 ml로 만든 후, 0.2 ml Folin-ciocalteu's phenol reagent (Sigma)를 첨가하여 잘 혼합하고 3분간 실온에 방치하였다. 여기에 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 0.4 ml를 첨가하여 혼합하고 증류수를 4 ml이 되도록 첨가한 후, 실온에서 1시간 방치하여 725 nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 tannic acid (Sigma) 1 mg을 50% 메탄올 용액 1 ml에 녹이고 최종농도가 0, 32.5, 75, 125, 250 및 500 µg/ml용액이 되도록 취하여 위와 같은 방법으로 725 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

### 항산화 활성 분석

항산화 활성은 Blois 방법[3]에 의한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 자유기 소거법에 따라 측정하였다. 시료

를 메탄올에 여러 농도로 희석하여 96 well plate에 0.1 ml씩 분주하고 0.4 mM DPPH 용액을 동량 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 자유기 소거활성은 아래의 식으로부터 산출하였고 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였다.

$$\text{DPPH 자유기 소거활성(\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

$A_{\text{sample}}$  = 시료를 첨가한 반응액의 흡광도

$A_{\text{control}}$  = 시료대신 메탄올을 첨가한 반응액의 흡광도

Xanthine/xanthine oxidase에 의한 uric acid 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도로 측정하였고 superoxide의 양은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원방법에 의해 측정하였다[5]. 여러 농도의 시료와 0.5 mM xanthine과 1 mM EDTA를 함유한 200 mM phosphate buffer (pH 7.5) 0.1 ml 반응액에 xanthine oxidase (50 mU/ml)를 첨가하여 uric acid 생성을 유도하였다. Superoxide 소거활성은 상기 반응액에 0.5 mM NBT를 첨가하여 측정하였다. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성은 각각 생성된 uric acid와 superoxide의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)로 표시하였다.

### Nitric oxide(NO) 생성 억제 활성

RAW264.7 세포는 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양하였다. NO 생성을 유도하기 위해서 세포(1.0×10<sup>5</sup> cells/ml)를 96 well plate에 접종하고, 시료와 LPS (1 µg/ml)를 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포배양 상등액 0.1 ml을 취하여 0.1 ml Griess 시약[1% (w/v) sulfanilamide와 0.1% (w/v) naphthyl- ethylenediamine이 포함된 2.5% 인산용액]과 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)를 standard로 비교하여 산출하였다. 세포 독성 분석은 96 well plate에서 RAW264.7 세포(2.0×10<sup>5</sup> cells/ml)를 24시간 배양하고 여기에 시료를 첨가하여 다시 24시간 동안 배양한 후, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) 100 µg을 첨가하고 3시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 배지를 제거하고 MTT 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) 0.15 ml를 첨가하여 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**항균 활성**

항균실험에 사용한 식품 관련 균주는 Gram 양성세균 2종 (*Staphylococcus aureus* KCTC1927, *Bacillus subtilis* KCTC1023) 과 Gram 음성세균 3종 (*Vibrio parahaemolyticus* KCTC2471, *Escherichia coli* KCTC1042, *Salmonella typhimurium* KCTC2514)을 사용하였다. 균의 배양은 균주에 따라, *V. parahaemolyticus*는 marine broth와 marine agar (Difco, USA)를 사용하여 30°C에서, 그 외의 균주는 nutrient broth와 nutrient agar (Difco, USA)를 사용하여 37°C에서, *B. subtilis*는 30°C에서 각각 배양하였다. 각각 Broth에서 균을 24시간 배양한 후, agar 배지에 균을 도말하고 paper disc (Advantec, 8 mm)를 밀착시켜 시료(50 mg/ml)를 50 µl씩 첨가한 후, 24 시간 배양하여 저해환(clear zone)의 직경(mm)으로 항균 활성을 측정하였다.

**HL-60 세포의 성장억제 활성**

급성 전골수성 백혈병 세포주인 HL-60 세포( $2.0 \times 10^5$  cells/ml)는 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지에서 4일간 배양한 후 시료를 첨가하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 여기에 MTT (Sigma) 100 µg을 첨가하고 3시간 동안 배양한 후, 환원된 formazan 침전물을 DMSO (Sigma) 0.15 ml를 첨가하여 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포성장 억제율을 산출하였다. 그리고 세포사멸 유도 여부를 분석하기 위해서 HL-60 세포( $2.5 \times 10^5$  cells/ml)에서 DNA를 분리하여 1.5% agarose gel에서 30분 동안 100 V로 전기영동하여 DNA 단편화 현상을 관찰하였다. 세포핵의 형태는 형광색소인 H33342 (Sigma)를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양한 후, CoolSNAP-Pro color digital camera가 장착된 형광현미경하에서 관찰하였다. 세포주기 분석을 위한 세포는 수확하여 PBS로 세척하고 -20°C에서 70% 에탄올로 30분 동안 고정시킨 다음 PBS로 세척하여 RNase A를 처리하였다. 그런 후에 propidium iodide (PI, Sigma)로 염색하여 Flow Cytometer (FACS Calibur, BD Bioscience, USA)로 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**버섯 균사체의 추출 수율과 총 폴리페놀 함량**

손바닥선인장 액체배지(Cactus Broth; CB)와 Malt Extract Broth (MEB) 배지에서 배양한 버섯균사체 혼합물을 에틸아세테이트로 추출하여 얻은 분획물의 수율(total extract yield)과 폴리페놀 함량을 Table 1에 나타내었다. MEB 배지에서 버섯균사체를 배양했을 때, 신령버섯(*Agaricus blazei*)의 수율(0.37 g/l)이 가장 높았고, 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*), 상황버섯(*Phellinus linteus*), 잎새버섯(*Grifola frondosa*), 차가버섯(*Innonotus obliquus*) 등은 비교적 낮은 수율(0.16 ~ 0.09 g/l)을 나타내었다. 잎새버섯, 상황버섯, 차가버섯 균사

Table 1. The yields and total polyphenol contents of ethyl acetate extracts from various mycelial culture mixtures grown on Malt Extract Broth (MEB) and Cactus Broth (CB) medium

Mycelium	Extracts yield (g/l)		Crude polyphenol concentration (%)	
	MEB	CB	MEB	CB
<i>Agaricus blazei</i>	0.37	0.16	4.72	11.70
<i>Grifola frondosa</i>	0.09	0.40	3.88	22.75
<i>Hericium erinaceum</i>	0.16	0.18	5.65	11.14
<i>Innonotus obliquus</i>	0.09	0.21	1.34	14.85
<i>Phellinus linteus</i>	0.10	0.29	4.37	17.67

체는 CB 배지에서 배양하면 이들의 수율이 MEB 배지에서보다 향상되었다. 그러나 노루궁뎅이버섯은 MEB 배지에서와 같은 수율을 보였고, 신령버섯은 오히려 그 수율이 2.3배 감소하였다. MEB 배지에서 배양한 버섯균사체의 총 폴리페놀 함량은 신령버섯이 가장 높았지만, 버섯균사체를 CB 배지에서 배양하면 균사체배양 혼합물들의 총 폴리페놀 함량은 전반적으로 2~10배 정도 증가되었다(Table 1). 선인장 열매의 폴리페놀 함량은 추출 용매에 따라 3.4~4.9% 정도라고 보고된 바 있다[23]. 버섯균사체가 원래 가지고 있는 폴리페놀량을 제외하더라도 선인장열매를 배지로 사용하여 버섯균사체를 발효시키면 총 폴리페놀 함량이 1.4~3.8배 이상 증가함을 확인하였다. 버섯균사체 중에서 잎새버섯이 CB 배지에서 성장 효과가 가장 좋았으며(0.4 g/l), 총 폴리페놀 함량 또한 22.75%로 가장 높았다.

**항산화 활성**

DPPH 자유기 소거활성으로 분석한 항산화 활성은 MEB 배지 보다 CB 배지에서 배양했을 때 비교적 높은 자유기 소거 활성을 나타내었다(Fig. 1). CB 배지에서 배양한 잎새버섯 발효 추출물의 IC<sub>50</sub> 값이 362.9 µg/ml (Fig. 1B)로 가장 높은 자유기 소거 활성을 보여주었다. DPPH 자유기 소거활성은 총 폴리페놀함량(Table 1)이 높을수록 좋은 것으로 나타났다. Xanthine/xanthine oxidase assay 방법으로 측정된 xanthine oxidase 저해 활성과 superoxide anion 라디칼 소거 활성을 Fig. 2에 나타내었다. MEB 배지에서 배양한 버섯균사체의 추출물은 500 µg/ml 농도에서 xanthine oxidase 저해활성이 10% 미만으로 매우 미약하였지만, CB 배지에서 배양하여 얻은 발효 추출물들은 특이적으로 xanthine oxidase 저해 활성이 현저하게 증가하였다(Fig. 2). 또한 MEB 배지에서 배양한 버섯균사체 추출물의 superoxide anion 라디칼 소거 활성도 CB 배지에서 배양하면 최대 2배 이상 증가하였다(Fig. 2). CB 배지에서 배양한 잎새버섯, 차가버섯, 상황버섯 균사체 발효 추출물은 xanthine oxidase 저해 활성과 superoxide anion 라디칼 소거 활성이 모두 양호하였고, 신령버섯과 노루궁뎅

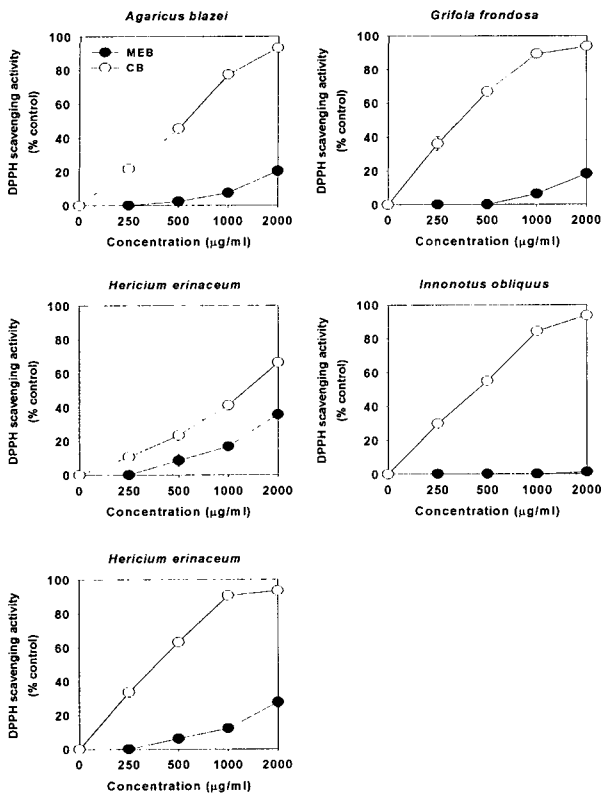


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of the ethyl acetate extracts from various mycelial cultures grown on Malt Extract Broth (MEB) and Cactus Broth (CB) medium. Each value represents the mean±SD of triplicate measurements.

이버섯 균사체 추출물은 superoxide anion 생성 억제활성이 xanthine oxidase 저해활성보다 높게 나타났다. 이 중에서도 폴리페놀 함량이 가장 높은 잎새버섯 균사체 추출물이 가장 양호한 활성 증대효과를 나타내었다(Fig. 2B). 이는 잎새버섯 균사체가 가장 효율적으로 CB 배지를 발효 기질로 이용하는 것으로 사료된다. 세포가 산화적 환경에 놓이면 xanthine oxidase에 의해 uric acid와 산소가 생성되며, 산소에서 산소유리기와 수소과산화기가 발생하여 세포 손상이 일어난다[5]. 선인장 열매를 발효기질로 이용하여 배양한 버섯 균사체 추출물은 다양한 항산화 활성 증대효과를 보여주기 때문에 산화적 손상 예방 소재 개발에 활용 가치가 있다고 사료된다.

**NO 생성 억제 활성**

MEB 배지에서 배양한 버섯 균사체 추출물은 LPS로 활성화시킨 RAW264.7 세포에서 NO 생성을 억제하는 활성이 저조하였다. 그러나 CB 배지에서 배양한 버섯 균사체 추출물은 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였다(Table 2). CB 배지에서 배양한 버섯 균사체 추출물중에서 NO 생성 저해 활

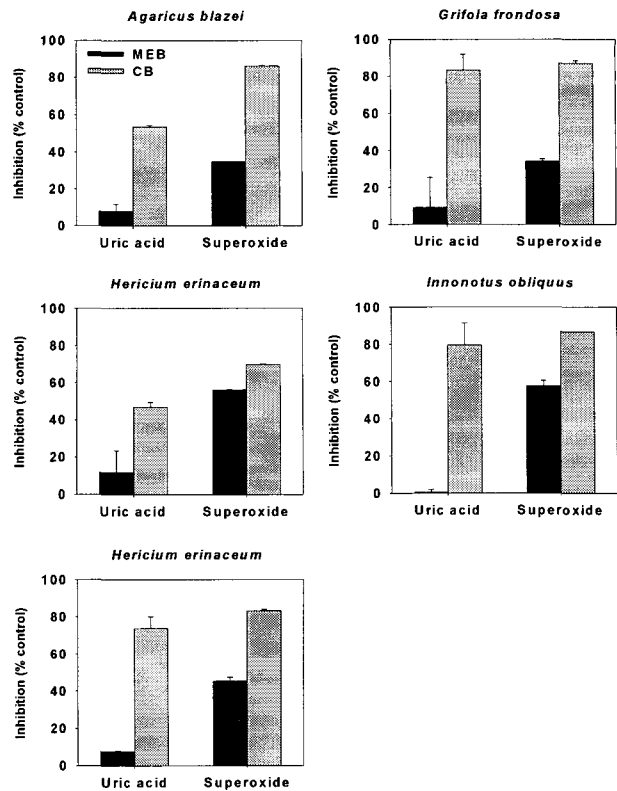


Fig. 2. Xanthine oxidase inhibitory activities of the ethyl acetate extracts from various mycelial cultures grown on Malt Extract Broth (MEB) and Cactus Broth (CB) medium at concentration of 500 µg/ml. Each bar represents the mean±SD of triplicate measurements. Uric acid, inhibition (%) on uric acid generation by xanthine oxidase; Superoxide, inhibition (%) on superoxide generation by xanthine oxidase.

성은 잎새버섯( $IC_{50} = 43.8 \mu\text{g/ml}$ )이 가장 높았고, 상황버섯( $IC_{50} = 49.2 \mu\text{g/ml}$ ), 차가버섯( $IC_{50} = 72.2 \mu\text{g/ml}$ ), 노루궁뎅이버섯( $IC_{50} = 77.1 \mu\text{g/ml}$ ), 신령버섯( $IC_{50} = 99.9 \mu\text{g/ml}$ ) 순으로 나타났다. 그러나 NO 생성 저해활성과 세포독성을 고려한 치료지수(therapeutic index)는 상황버섯 균사체 추출물(14.6)이 가장 양호하였다(Table 2).

NO는 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 무기유리체로 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완과 같은 다양한 생리적인 과정에 관여한다고 알려져 있다[16,24,26]. 특히, LPS 자극을 받은 세포에서는 inducible NOS (iNOS)의 발현이 유도되어 NO가 대량 생성된다. 이렇게 생성된 NO는 염증반응, 세포의 돌연변이 및 종양 발생 등에도 관여하게 된다. CB 배지에서 배양한 버섯 균사체 추출물은 NO 생성 저해 효과를 가지므로 항염증 소재 개발에도 유용될 수 있다고 사료된다.

Table 2. Anti-inflammatory activities of ethyl acetate extracts from various mycelial culture mixtures grown on Malt Extract Broth (MEB) and Cactus Broth (CB) medium in LPS-stimulated RAW264.7 cells

Mycelium	Inhibitory activity on NO production (IC <sub>50</sub> =µg/ml <sup>a</sup> )		Cytotoxicity (TC <sub>50</sub> = µg/ml <sup>b</sup> )		Selectivity index (TC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )	
	MEB	CB	MEB	CB	MEB	CB
<i>Agaricus blazei</i>	791.1±9.6	99.9±5.6	>1000	1159.5±56.3	>1.3	11.6
<i>Grifola frondosa</i>	482.3±4.6	43.8±2.1	>1000	302.6±10.5	>2.1	6.9
<i>Hericium erinaceum</i>	425.8±9.2	77.1±3.5	>1000	905.4±42.3	>2.3	11.7
<i>Innonotus obliquus</i>	>1000	72.2±5.4	>1000	812.6±33.6	-	11.3
<i>Phellinus linteus</i>	341.7±3.5	49.2±2.6	>1000	716.5±20.6	>2.9	14.6

Each data value is the mean±SD of triplicate measurements. IC<sub>50</sub>, concentration indicated 50% inhibitory activity; TC<sub>50</sub>, concentration indicated 50% cytotoxicity.

Table 3. Antimicrobial activities of ethyl acetate extracts from various mycelial culture mixtures grown on Malt Extract Broth (MEB) and Cactus Broth (CB) medium

Mycelium	Clear zone on plate (mm)									
	S. t		E. c		V. p		S. a		B. s	
	MEB	CB	MEB	CB	MEB	CB	MEB	CB	MEB	CB
<i>Agaricus blazei</i>	+	+	-	10	12	12	-	+	+	11.5
<i>Grifola frondosa</i>	+	11.5	-	11	-	14	-	15	-	14
<i>Hericium erinaceum</i>	-	+	-	10	+	14	-	14	+	12
<i>Innonotus obliquus</i>	-	+	-	10	-	12.5	-	12.5	+	12
<i>Phellinus linteus</i>	-	10.5	-	10.5	+	13	-	13	-	11

S. t: *Salmonella typhimurium*, E. c: *Escherichia coli*, V. p: *Vibrio parahaemolyticus*;

B. s: *Bacillus subtilis*

+ : ≤ 9 mm, - : none

**항균 활성**

Paper disc 방법으로 MEB 배지와 CB 배지에서 배양한 버섯균사체 추출물의 식품 관련 미생물에 대한 항균활성을 분석하여 그 결과를 Table 3에 나타내었다. MEB 배지에서 배양한 버섯 균사체 중에서 신령버섯 균사체 추출물은 비브리오균에 대한 항균활성을 보이지만, 전반적인 항균활성은 없거나 저조하였다. 그러나 CB 배지에서 배양한 버섯균사체 추출물은 검색한 대부분의 세균에 대한 양호한 항균활성을 나타내었다(Table 3). 특히, CB 배지에서 배양된 잎새버섯 균사체 추출물은 분석된 Gram 음성균(*S. typhimurium*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*) 및 Gram 양성균(*S. aureus*, *B. subtilis*) 모두에서 가장 좋은 항균활성을 나타내었다. 손바닥선인장 열매와 줄기의 추출물을 사용해서 항균활성을 보고한 바 있다[8,17]. 본 연구는 손바닥 선인장을 배양기질로 사용하여 버섯 균사체를 배양하면 식품관련 미생물에 대한항균활성이 전반적으로 증진됨을 확인하였다. 이러한 결과는 식품보조 첨가제로의 활용 가능성을 제시한다고 하겠다.

**HL-60 세포의 성장 저해 활성**

백혈병 세포주인 HL-60 세포에서 MEB 배지와 CB 배지에서 배양된 버섯균사체 추출물을 처리하여 얻은 세포성장 억

제 효과를 Table 4에 표시하였다. MEB 배지에서 배양한 버섯 균사체 추출물을 HL-60 세포에 처리하면 농도 의존적으로 세포증식을 억제하였다. 이러한 결과는 대부분의 버섯류가 항암활성을 가진다는 보고와 일치하는 결과이다 [13,17,18,28]. 그러나 버섯 균사체를 CB 배지에서 배양한 버섯균사체 추출물은 MEB에서 배양된 것과 비교할 때 세포증식 억제 효과가 1.4배에서 3.6 배까지 증가하였다(Table 4). 이러한 활성 증대 효과는 잎새버섯(2.3 배)과 차가버섯(3.6 배) 균사체에서 가장 양호하였다.

HL-60 세포에서 관찰된 세포증식 억제현상과 세포사멸과의 관련성을 DNA 단편화 현상을 분석하여 관찰하였다. MEB와 CB 배지에서 배양한 모든 버섯 균사체 추출물이 DNA 단편화 현상을 유도하지만, CB 배지에서 배양한 버섯 균사체 혼합물을 처리한 실험 군에서 훨씬 선명한 DNA 단편화 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 또한, 농도 의존적인 세포증식 효과가 양호한 잎새버섯(*Grifola frondosa*) 추출물을 HL-60 세포에 125 µg/ml 농도로 처리하여 세포주기를 분석한 결과, sub-G1 hypodiploid 세포가 증가되었고 세포핵의 응축 현상도 관찰되었다(Fig. 4). 본 연구 결과는 버섯균사체를 CB 배지에서 배양한다면 버섯 고유의 항암활성이 증진될 수 있음을 암시하고 있다[10,11,29,30]. 일반적으로 버섯류에

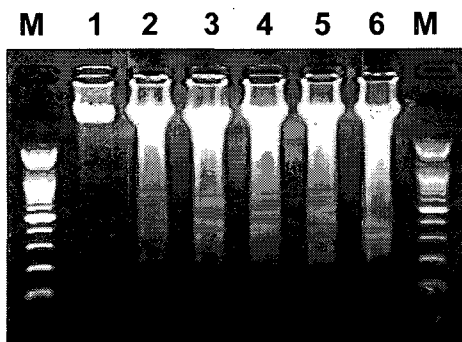
Table 4. The cell (HL-60) growth inhibitory effects of ethyl acetate extracts from various mycelial culture mixtures grown on Malt Extract Broth (MEB) and Cactus Broth (CB) medium

Mycelium	Growth inhibitory activity(%)					
	125 µg/ml		250 µg/ml		500 µg/ml	
	MEB	CB	MEB	CB	MEB	CB
<i>Agaricus blazei</i>	46.3±2.4	79.8±0.9	51.2±6.0	82.8±1.2	69.6±0.6	86.6±1.1
<i>Grifola frondosa</i>	28.7±11.7	65.2±1.1	56.5±6.8	79.3±1.0	68.5±7.1	80.5±0.7
<i>Hericium erinaceum</i>	44.2±6.1	80.2±0.4	53.1±9.4	81.0±1.6	64.3±2.5	85.6±0.1
<i>Innonotus obliquus</i>	19.1±8.5	70.1±0.2	30.0±5.5	83.8±0.9	43.9±4.8	84.8±2.5
<i>Phellinus linteus</i>	52.7±3.9	77.1±0.1	64.2±5.9	80.3±1.1	68.7±0.3	85.7±0.5

Each data value is the mean±SD of triplicate measurements.

는 terpenoid계, polyacetylene계, 방향족계, 단백질, 다당류, 단백다당류, 그리고 기타 화합물 등이 함유되어 있어 항염 및 항암활성을 포함한 다양한 생리활성을 가지고 있다고 알려져 있다[6,14,15,19,20,28,31]. 본 연구 결과는 손바닥선인장 열매를 버섯 균사체의 배양기질로 활용하여 다양한 용도의 가능성 소재를 생산할 수 있다는 가능성을 제시하였다

(A) Cactus Broth



(B) Malt Extract Broth



Fig. 3. DNA fragmentation by the ethyl acetate extracts from various mycelial cultures grown on Malt Extract Broth (MEB) and Cactus Broth (CB) medium in HL-60 cells. Lane M : 100 bp DNA ladder size maker, Lane 1 : control, Lane 2 : *Agaricus blazei*, Lane 3 : *Grifola frondosa*, Lane 4 : *Hericium erinaceum*, Lane 5 : *Innonotus obliquus*, Lane 6 : *Phellinus linteus*.

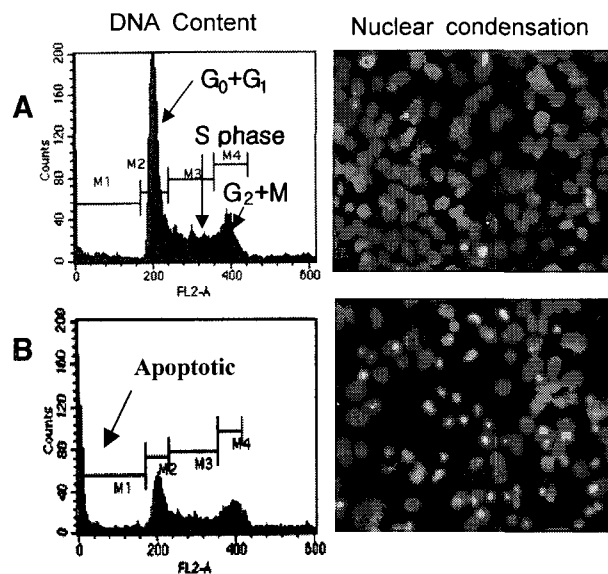


Fig. 4. The degree of apoptosis is represented as the DNA content measured by flow cytometric analysis (left panel) and the photographs (right panel) showing cells with highly condensed nuclei stained with Hoechst 33342. The HL-60 cells ( $2.5 \times 10^5$  cells/ml) were treated with 125 µg/ml of the ethyl acetate extracts from *Grifola frondosa* culture grown on CB medium for 48 hours. A: Control, B: *Grifola frondosa* extract.

요 약

본 연구는 버섯균사체의 배양 기질로서 손바닥선인장 열매의 활용 가능성을 타진하기 위하여 수행하였다. 5 종류(신령, 잎새, 노루궁뎅이, 차가, 상황)의 버섯균사체를 MEB 배지와 손바닥선인장 열매 액체배지(CB)에서 각각 배양하여 에틸아세테이트로 추출한 후, 각 추출물의 수율, 총 폴리페놀 함량, 그리고 몇몇 생리활성을 분석하여 비교하였다. CB 배지에서 배양한 버섯 균사체 중에 잎새버섯 균사체가 추출 수율(0.4 g/l)과 총 폴리페놀 함량(22.7%)에서 가장 양호하였다. CB 배지에서 배양한 버섯 균사체 추출물들은 항산화 활성(DPPH 자유기 소거활성, superoxide의 소거활성, xanthine

oxidase 억제 활성), LPS로 활성화시킨 RAW264.7세포에서의 NO 생성 억제 활성, 항균활성, 그리고 HL-60에서의 세포 증식 억제 활성 모두가 MEB 배지에서 배양한 버섯균사체 추출물의 것과 비교해 현저하게 증진되어 있음을 확인할 수 있었다. 특히, 잎새버섯 발효추출물에서 DPPH 자유기 소거활성( $IC_{50}=362.9 \mu\text{g/ml}$ ), xanthine oxidase 저해활성(80% at 500  $\mu\text{g/ml}$ ), superoxide 소거활성(80% at 500  $\mu\text{g/ml}$ ), NO 생성 억제 활성( $IC_{50}=43.1 \mu\text{g/ml}$ ), 항균활성, 그리고 HL-60 세포 증식 억제 활성 등 분석된 모든 생리활성이 가장 높게 나타났다. 본 연구 결과는 손바닥선인장 열매가 버섯균사체의 기능성 증진을 위한 배양기질로서 활용될 수 있음을 시사하였다.

### 감사의 글

본 연구는 교육인적자원부의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원 (R08-2003-000-10286-0)과 산업자원부의 지역혁신인력양성사업의 연구비로 수행되었음.

### 참 고 문 헌

- Bae, I. Y., E. J. Yoon, J. M. Woo, J. S. Kim, H. K. Lee and C. B. Yang. 2002. The development of Korean traditional wine using the fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* - I. Characteristics of mashes and soju. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **45**, 11-17.
- Bae, I. Y., E. J. Yoon, J. M. Woo, J. S. Kim, H. K. Lee and C. B. Yang. 2002. The development of Korean traditional wine using the fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* - II. Characteristics of liquors. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **45**, 59-65.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1200.
- Burrer, F., P. H. Lebreton and B. Voirin. 1982. Les aglycones falvoniques de cactees: distribution, signification. *J. Nat. Prod.* **45**, 687-693.
- Cheng, Z. J., S. C. Kuo, S. C. Chan, F. N. Ko and C. M. Teng. 1998. Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1392**, 291-299.
- Cho, H. J., M. J. Shim, E. C. Choi and B. K. Kim. 1988. Studies of constituents of higher fungi of Korea(LVII). Comparison of various antitumor constituents of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* **16**, 162-174.
- Choi, J. W., C. K. Lee, Y. C. Lee, Y. I. Moon, H. J. Park and Y. N. Han. 2001. Screening of biological activities of the extracts from fruit and stem of prickly pear(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*). *Kor. J. Pharmacogn.* **32**, 330-337.
- Chung, H. J. 2000. Antioxidative and antimicrobial activities of *Opuntia ficus* var. *saboten*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **16**, 160-166.
- Chung, M. S. and K. H. Kim. 1996. Stability of betanine extracted from *Opuntia ficus-indica* var. *Sabolen*. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* **12**, 506-510.
- Fesus, L., P. J. A. Davies and M. Piacentini. 1991. Molecular mechanisms in the program of cell death by apoptosis. *Eur. J. Cell Biol.* **56**, 170-177.
- Fesus, L., V. Thomazy, F. Autuori, M. P. Ceru, E. Tarcsa and M. Piacenini. 1989. Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett.* **245**, 150-154.
- Ghansah, E., P. Kopsombut, M. A. Maleque and A. Bossi. 1993. Effects of mescaline and some of its analogs on cholinergic neuromuscular transmission. *Neuropharmacology* **32**, 169-174.
- Gutfinger, T. 1981. Polyphenols in olive olis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 966-968.
- Ham, S. S., S. W. Oh, Y. K. Kim, K. S. Shin, H. Y. Chang and G. H. Chung. 2003. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *J. Koran Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 1088-1094.
- Ham, S. S., S. W. Oh, Y. K. Kim, K. S. Shin, H. Y. Chang and G. H. Chung. 2003. Antioxidant and genotoxic inhibition activity of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 1071-1075.
- Jaffrey, S. R. and S. H. Snyder. 1995. Nitric oxide: A neural messenger. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 417-440.
- Kim, H-N., D-H. Kwon, H-Y. Kim and H-K. Jun. 2005. Antimicrobial activities of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Makino methanol extract. *Kor. J. Life Sci.* **15**, 279-286.
- Kim, I. H., M. H. Kim, H. M. Kim and Y. E. Kim. 1995. Effect of antioxidants on thermostability of red pigment in prickly pear. *Food Sci. Biotechnol.* **27**, 1013-1016.
- Kim, S. W., E. S. Kim and Y. S. Kim. 1995. Studies on the polysaccharide extract from *Ganoderma lucidum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **24**, 147-153.
- Kwon, S. H., C. N. Kim, C. Y. Kim, S. T. Kwon, K. M. Park and S. Hwangbo. 2003. Antitumor activities of protein-bound polysaccharide extracted from mycelia of mushroom. *Korean J. Food & Nutr.* **16**, 15-21.
- Lee, J. W. and K. W. Bang. 2001. Biological activity of *Phellinus* spp. *Food Industry and Nutrition* **6**, 25-33.
- Lee, S. P., S. K. Lee and Y. D. Ha. 2000. Alcohol fermentation of *Opuntia ficus* Fruit Juice. *J. Food Sci. Nutr.* **5**, 32-36.
- Lee, Y. C., K. H. Hwang, D. H. Han and S. D. Kim. 1997. Compositions of *Opuntia ficus-indica*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 847-853.
- Moncada, S., R. M. Palmer and E. A. Higgs. 1991. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.
- Moon, C., S. Kim, M. Ahn, S. Lee, S. Park, J. Jeong, D-Y. Yoon, Y-K. Choe and T. Shin. 2000. Effects of *Opuntia ficus-indica* extract on immune cell activation. *Kor. J. Life Sci.* **10**, 362-364.
- Nathan, C. and Q. W. Xie. 1994. Nitric oxide synthases: Roles, tolls and controls. *Cell* **78**, 915-918.
- Park, E. H., S. E. Hwang and J. H. Kahng. 1998.

- Anti-inflammatory Activity of *Opuntia ficus-indica*. *Yakhak Hoeji* **42**, 621-626.
28. Park, S. S., K. H. Yu and T. J. Min. 1998. Antioxidant activities of extracts from fruiting bodies of mushrooms. *Kor. J. Mycol.* **26**, 69-77.
29. Piacentini, M, F. Autuori, L. Dini, M. G. Farrace, L. Ghibelli, L. Piredda and L. Fesus. 1991. Tissue transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor stimulation. *Cell Tissue Res.* **263**, 227-235.
30. Wyllie, A. H. 1992. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev.* **11**, 95-103.
31. Yoo, I. D. 1995. Screening of new physiologically active substance from mushroom.-Chemical structure and biological activity. *The Kor. Soc. Mycol. News letter* **7**, 6-10.