한국생물공학회지 제23권 제1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 23, No. 1, 23-30(2008)

Phellinus sp.의 액체배양에 의한 세포외 색소물질의 생산 및 특성

이 동 기 · [2]이 철 원 · † [1]이 신 영
[1]강원대학교 생물공학과, 한국산업기술진흥협회, [2]국방기술품질원
(접수 : 2007. 8. 2., 게재승인 : 2007. 12. 31.)

Production and Characteristics of an Extracellular Pigment through the Submerged Cultivation of *Phellinus* sp.

Dong-Ki Lee, Chul-Won Lee[2], and Shin-Young Lee[1]†
[1]Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
Korea Industrial Technology Association
[2]Defense Agency for Technology and Quality
(Received : 2007. 8. 2., Accepted : 2007. 12. 31.)

An extracellular pigment production of three *Phellinus* sp. (*Phellinus 421*, *P. linteus* and *P. hartigii*) through submerged cultivation was investigated. The maximum brown pigment from culture broth was obtained from the precipitate by addition of 10% 1M HCl solution. This precipitate showed absorption characteristics with λ_{max} of 360nm. The maximum production of extracellular pigment obtained at optimum medium and culture condition was 3.54 (A_{360}). The precipitate was fractionated by Sephadex G-75 gel chromatography, and the isolated brown pigment contained a large amount of polyphenol and the small amounts of sugar and protein. The brown pigment fraction was stable in temperature range of 30~60℃, pH range of 4~6, sugar addition ranges of 1~5% and salt addition concentration of 3 molarity. Antioxidative activity of the brown pigment by TBA method was better than that of vitamin E (α-tocopherol).

Key Words : *Phellinus* sp., liquid culture, extracellular pigment, properties

서 론

버섯은 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 왔고, 최근에는 새로운 식량자원의 개발이나 유용물질 생산연구의 대상으로 크게 주목받고 있으며, 대체의학으로서의 한 부분으로서도 자리매김하고 있다(1-5).

이 중 소나무 비늘버섯과 (*Hymenochaetaceae*), 진흙버섯속 (*Phellinus*)에 속하는 백색 부후균의 버섯으로는 변종 67종을 포함하여 221종이나 알려지고 있는데, 생리 활성이 잘 알려진 목질진흙버섯 (*Phellinus linteus*)을 비롯한 검은진흙버섯 (*P. nigricans*), 마른진흙버섯 (*P. gilvus*), 말똥진흙버섯 (*P. igniarius*), 젓나무진흙버섯 (*P. hartigii*), 낙엽송층버섯 (*P. pini*), *P. densus*, *P. robustus*, *P. baumii* 및 *P. concharus* 등이 여기에 속한다(6).

특히, *P. linteus*에 대해서는 다른 버섯과는 달리 항암활성이 높고 면역증강제로서의 효과가 1960년대 후반에 이미 밝혀졌으나(7) 자연계에서 잘 번식되지 않아 자실체가 희귀하며, 인공 재배법도 개발되지 않아 이후의 지속적인 연구가 이루어지지 않았다.

하지만 점차 균사체의 고체 및 액체배양 기술이 일반화됨에 따라 최근에는 배양 균사체로부터의 다당류를 중심으로 그의 항암 및 면역활성에 관하여 광범위하게 보고되었으며, 고가의 항암제로서 상품화되어 판매도 되고 있는 실정이다(8-10).

그러나 그동안의 진흙버섯속 버섯에 대한 연구는 주로 자실체 및 배양 균사체의 배양조건이나 추출조건 및 추출물의 항암활성이나 면역증강 등 생리작용에 관한 것들이 대부분이었다(11-17). 따라서 균사체의 액체배양 중 생성되는 세포외 성분에 대한 연구는 매우 제한되어 세포외 다당의 생산 연구가 있을 뿐, 아직까지 세포외 황갈색 색소에 대한 연구는 이루어진 바가 없었다(18).

그 동안 버섯류의 색소 생산에 관한 연구는 대부분 *Monascus* sp.를 이용하여 이루어져왔는데, 특히 황색계 색소로는 monascin

† Corresponding Author : Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
Tel : +82-33-250-6273, Fax : +82-33-243-6350
E-mail : sylee@kangwon.ac.kr

과 ankaflavin이 있으며, 천연 식용색소원으로 사용되고 있다(19-22). *Phellinus*속 버섯의 액체배양 또는 PDA 배지 상에서 분비하는 갈색 색소와 같은 2차 대사산물에 대한 연구로는 송 등(23)이 *P. linteus* 균사체 배양액으로부터 2차 대사산물을 ethyl acetate로 추출하고 succinic acid, *p*-hydroxyphenylacetic acid metyl ester 등 여섯가지 화합물을 동정한 정도인데, 색소를 포함한 2차 대사산물의 생산능은 균사체의 항암활성과도 상관성이 깊은 것으로 추측된다.

저자 등(24)은 강원도 일원 야산의 뽕나무 고사목에서 자생한 자실체로부터 *Phellinus* 균주를 분리하고 이의 액체배양을 보고한 바 있으며, 이 때 배양 중 황갈색 색소가 경시적으로 생성됨을 육안관찰 할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 이점에 착안하여 3종 진흙버섯속 버섯 (*Phellinus 421, Phellinus linteus* 및 *Phellinus hartigii*)의 액체 배양에 의한 세포외 황갈색 물질의 경시변화를 추적하였다. 아울러, 이 물질을 분획, 정제하였으며, 이의 특성 및 기능성을 탐색하여 새로운 생물산업소재로서의 이용 가능성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 보존

본 연구에 사용한 균주는 *Phellinus 421, Phellinus linteus* 및 *Phellinus hartigii*의 3종 *Phellinus* sp.이다. *Phellinus 421*은 본 연구실에서 분리하였고(24), *P. linteus*와 *P. hartigii*는 강원대학교 산림자원보호학과로부터 분양받았다. 이들 균주는 P.D.A. (potato dextrose agar) 사면 배지에서 30℃로 10일간 배양한 후, 4℃에서 보존하였으며, 8주 마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

배지 조성 및 조제

본 실험에서 사용한 배지는 Table 1의 조성을 갖는 8종의 배지이다(25, 26). 모든 배지는 121℃에서 15분간 가압살균하여 사용하였고, 이때 glucose, yeast extract, KH_2PO_4 및 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 등은 침전 현상을 방지하기 위하여 각각 분리하여 살균하고 상온에서 혼합하였다. 배지의 pH는 0.1N HCl 또는 0.1N NaOH로 조절하였다.

Table 1. Compositions of the media used for extracellular pigment production and mycelial growth of *Phellinus* sp

(Unit : g/L)

Ingredient \ Media[a]	GCM	GP	MY	CVM	YM	YMG	MCM	CCM
Glucose	30	10	10	20	-	4	20	40
Sucrose	20	-	-	-	-	-	-	-
Dextrose	-	-	-	-	10	-	-	-
Peptone	4	10	-	4	5	-	2	5
Yeast extract	10	10	5	6	3	4	6	5
Malt extract	-	15	3	-	3	10	-	-
Casamino acid	5	-	-	-	-	-	-	-
KH_2PO_4	0.46	-	-	0.46	-	-	-	0.46
K_2HPO_4	1	-	-	1	-	-	-	1
$MgSO_4$ $7H_2O$	0.5	-	-	0.5	-	-	-	0.5

[a]GCM: ganoderma complete medium, GP: glucoe-peptone, MY: malt extract-yeast extract, CVM: coriolus versicolor medium, YM: dextrose-yeast extract-malt extract, YMG: glucoe-yeast extract-malt extract, MCM: mushroom complete medium, CCM: coriolus complete medium.

배양 방법

접종균의 전배양은 P.D.A. 배지에서 생육한 균사체를 직경 5mm의 stainless steel pipe로 무균적으로 펀칭하여 mycelium disk를 만들었으며, 이 disk 5~6개를 M.C.M. (mushroom complete medium)배지 50 ml를 넣은 250 ml 삼각 플라스크에 접종하여 30℃에서 8일간 배양하였다. 다시 위의 배지 50 ml를 함유한 250 ml 삼각 플라스크에 전배양액 5%를 접종하여 30℃에서 100 rpm으로 6일 동안 회전 진탕배양하였다. 또 본 배양은 Table 1의 배지 50 ml를 함유한 250 ml 삼각 플라스크에 균질기 (homogenizer, 동양(주) model 0802)로 30초 동안 무균적으로 균질화한 종균 배양액 5% (v/v)를 접종하고 30℃에서 100 rpm으로 8일간 회전 진탕배양하여 실시하였다.

균주 및 배지 선정

균주 및 배지 선정을 위해 Table 1의 배지조성을 갖는 8종의 배지 50 ml를 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 멸균하였다. *Phellinus 421*, *P. linteus* 및 *P. hartigii*의 3종 균주를 각각 접종한 다음, 30℃에서 8일간 회전 진탕배양 하였다. 여기서 1차 선정한 균주(*P. hartigii*)를 다시 생육 및 색소물질의 생산이 우수한 3종 (MCM, YM 및 CCM)의 배지에서 20일간 경시 변화를 관찰하고 최종적인 기본배지로 선정하였다.

균사체, 잔존당 및 색소 물질의 정량

균사체 중량은 여과지를 70℃로 유지한 dry oven에서 12시간 건조시킨 후, 여과지 무게를 측정하고, 여기에 배양액을 전량 분주하였다. 진공 하에서 여과한 후, 염류 등을 제거하기 위해 증류수로 2회 세척하였다. 이를 70℃로 유지한 dry oven에서 12시간 건조한 다음, 원래 여과지와의 무게 차이를 균체량으로 나타내었다. 또, 배양액 중의 잔존 glucose농도는 DNS (dinitrosalicylic acid) 법 (27)을 이용하여 분광광도계 (UV/Vis spectrophotometer, Varian Cary 1E)로 575 nm에서의 흡광도를 구한 다음, 여러 농도의 포도당 용액을 사용하여 미리 작성해둔 표준곡선으로 부터 그 값을 환산하여 구하였다.

한편, 색소물질의 정량은 배양여액을 1/20로 희석하여 분광광도계로 200~600 nm까지 파장을 변화시키면서 scanning하였고, 그 결과 최대 흡수 파장을 나타낸 360 nm에서의 흡광도로 색소물질의 양을 나타내었다.

색소물질의 분리

유기용매에 의한 추출 및 침전 : 색소물질의 분리를 위해 유기용매에 의하여 추출되는 정도를 다음과 같이 조사하였다. 즉, 분획 깔대기를 이용하여 benzene, chloroform, ethyl acetate, butanol, hexane, cyclohexane, dichloromethane, pertroleum ether 등의 유기용매와 배양여액을 1 : 1 (v/v) 비율로 하여 1시간 동안 추출하고 유기용매 분획을 얻었다. 배양 여액층에 남아 있는 색소물질의 양을 잔존율(residual percent, %)로 나타내었으며, 잔존율은 배양여액에서 침전을 제거하고 남은 여액을 1/20로 희석하고 분광광도계로 360 nm에서의 흡광도를 측정하여 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{Residual percent (\%)} = \frac{A_{360} \text{ of precipitate removed on culture broth}}{A_{360} \text{ of culture broth}} \times 100$$

한편, 색소물질의 유기용매에 의한 침전은 다음과 같이 조사하였다. 즉, ethanol, methanol, acetone의 유기용매를 각각 100~500% (v/v)로 첨가하였을 때 생성된 침전물을 원심분리(15,000 × g, 20 min)하고, 여과하여 얻어지는 침전물의 양을 건조 중량으로 조사하였다. 이 때 침전물이 타는 것을 방지하기 위해 건조시간은 2시간으로 하였다.

산에 의한 침전 : 예비실험 결과, pH 4 미만에서는 침전의 형성이 관찰되었으므로, 산에 의한 침전을 검토하였다. 산 침전은 배양여액에 1 M HCl 및 1 M H_2SO_4를 0~20% (v/v)로 첨가하여 생성된 침전을 원심분리 (15,000 × g, 20 min)한 후, 여과하고 균사체 무게의 측정과 마찬가지 방법으로 첨가량별의 침전량을 조사하였다. 잔존율은 앞에서와 동일한 방법으로 산출하였다.

색소물질의 정제

배양여액으로부터의 색소물질의 분리능이 가장 우수했던 산에 의한 침전 방법으로 분리한 조 색소물질 (crude coloring material)을 Fig. 1과 같이 정제하였다. 즉, 배양여액에 1 M HCl 용액을 2~20% (v/v) 첨가하고, 그 침전을 원심분리하여 산 침전물을 얻었으며, 이 침전물을 소량의 증류수로 HCl 용액을 씻어낸 다음, 1~2일간 투석하였다. 투석 내액을 취하여 0.05 torr에서 24시간 동안 동결건조한 다음, 부분정제 시료로 사용하였다.

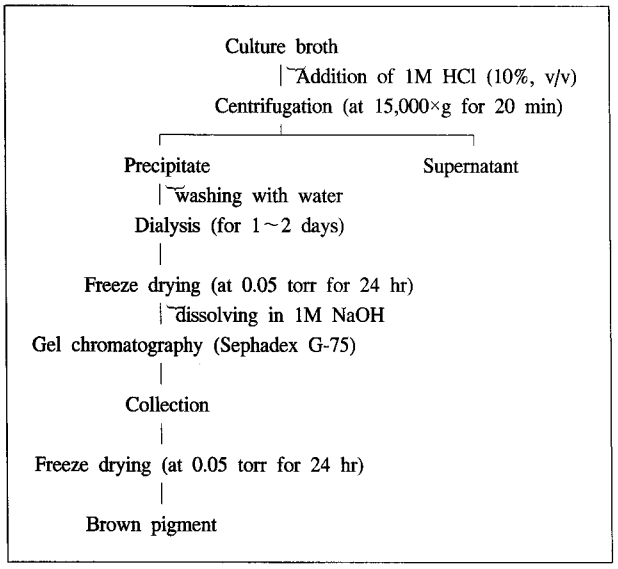


Figure. 1. A procedure for purification of isolated brown pigment.

한편, gel chromatography에 의한 정제는 증류수로 90℃에서 3시간이상 팽윤시킨 Sephadex G-75를 column (2.0×60cm)에 충전하고, 증류수로 평형화하였다. 동결건조된 시료를 1M NaOH 용액으로 24시간 교반하여 녹인 다음, 1 M HCl 용액으로 중화하였고, 원심분리하여 불순물을 제거한 후 column에 1 ml 주입하여 gel 여과하였다. 증류수로 1 ml/min의 유속에서 용출하고 fraction collector(Advantec, model SF-2120)로 3 ml씩 분획하였다.

색소 물질의 이화학적 분석

정제 시료의 전당은 phenol-sulfuric acid 법(28)으로 정량하였고, 단백질은 Lowry법(29)을 이용하여 표준물질인 BSA (bovine serum albumin)를 여러 농도로 조제하여 정량한 다음, 이로부터 얻은 표준곡선을 이용하여 구하였다. 또 phenol성 물질의 함량 측정은 총 phenol 함량을 측정하는 Bray와 Thrope의 방법(30)으로 다음과 같이 측정하였다. 즉, 각 phenol성 물질 0.2 ㎖에 2% Na_2CO_3 2.0 ㎖를 가하여 충분히 혼합하고 2분 후에 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 ㎖를 가하여 상온에서 30분 동안 방치한 다음, 분광광도계로 750 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Phenol 함량은 catechin (Sigma, C-1251)을 표준물질로 이용한 표준곡선으로부터 구하였다. 분획된 색소물질은 다시 동결건조하여 색소물질의 각종 조사용 시료로 하였다.

색소 물질의 특성

열 및 pH에 대한 안정성 : 열에 대한 안정성은 배양 여액을 항온수조에서 30℃~90℃의 온도범위의 일정온도에서 0~12시간 동안 방치한 다음, 1/20로 희석하고, 분광광도계로 360 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 이로부터 잔존율을 산출하여 안정성으로 나타내었다.

한편, pH 안정성은 배양 여액에 1 M HCl을 첨가하여 pH 2~pH 12로 조절하였고, 실온에서 0~12시간 동안 방치한 다음, 1/20로 희석하여 분광광도계로 360 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 이로부터 잔존율을 산출하여 안정성으로 나타내었다.

NaCl 및 sucrose의 첨가 안정성 : 세포외 색소물질의 NaCl과 sucrose 첨가에 따른 안정성을 다음과 같이 검토하였다. NaCl 첨가시에는 배양 여액에 0.1~3 M NaCl을 각각 첨가하여 실온에서 0~12시간 동안 방치한 다음, 1/20로 희석하여 분광광도계로 360 nm에서의 흡광도를 측정하였고, 이로부터 잔존율을 산출하였다.

한편, sucrose 첨가시에는 역시 배양여액에 sucrose를 1~20%의 농도로 첨가하였고, 실온에서 0~12시간 동안 방치한 다음, 1/20로 희석하여 분광광도계로 360 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 이로부터 잔존율을 산출하여 나타내었다.

항산화 효과 : 정제 시료가 linoleic acid의 산화를 방지하는 능력을 linoleic acid acid-H_2O emulsion계를 이용한 방법으로 α-tocopherol과 비교하면서 측정하였다. 즉, linoleic acid 10 mg을 함유한 99% ethanol 10 ml에 0.2 M phosphate buffer (0.2 M Na_2HPO_4+ KH_2PO_4, pH 7.0) 10 ml를 넣고, 시료와 α-tocopherol을 100 ppm이 되도록 첨가하여 30℃에서 1~8일간 incubation하면서 TBA (thiobarbituric acid) 법(31)으로 TBA 값을 측정하였다. TBA 값은 시료액 2 ml를 원심분리관에 넣고 35% trichloroacetic acid 1ml와 0.75% aqueous TBA 2 ml를 가하여 혼합한 후 끓는 물 수조에서 가끔씩 진탕하면서 15분간 처리하고, 흐르는 물에 냉각시킨 후 70% trichloroacetic acid 2 ml를 가하고 20분 후 2,500~3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였으며, 그 상등액을 532 nm에서의 흡광도를 측정하여 TBA 값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

세포외 색소물질의 생산 균주 및 배지의 선정

Phellinus 421, P. linteus 및 *P. hartigii*의 3종 균주를 8종의 버섯 균사체 배양용 배지 (Table 1)에 8일간 배양하여 균사체 생육에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다.

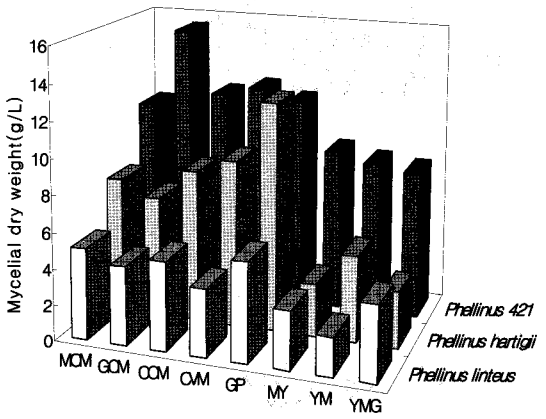


Figure 2. Effect of different media on the mycelial dry weight of *Phellinus* species.

*Phellinus 421*은 거의 모든 배지에서 우수한 균사체 생육을 나타내었고, 특히 G.C.M. 배지에서 가장 우수한 균체 생육을 나타내었다. *P. hartigii*는 G.P. 배지에서 우수한 균사체 생육을 나타내었고, *P. linteus*는 상대적으로 균사체 생육이 가장 저조하였으나 역시 G.P. 배지에서 가장 우수한 균사체 생육을 나타내었다. *P. linteus*의 균사체 생육정도는 Lee 등(11)의 보고와 비교적 일치하였다.

한편, 색소물질의 생산은 8종의 배지에서 8일간 배양한 여액을 1/20로 희석하고 200~600 nm에서의 흡광도를 scanning하여 나타내었으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다.

각각의 배지와 그 배양 여액의 scanning 결과를 비교해 보면 시간 경과에 따라 배양 여액에서는 배지에선 볼 수 없던 peak가 나타나는데, 그 흡수파장은 350~400 nm이었다. 이는 일반적인 황갈색계 색소의 최대 흡수파장과 거의 일치하는 것으로, 특히 색소 생산에 많이 이용되고 있는 *Monascus* sp.가 생산하는 황색계 색소의 최대 흡수파장과도 비교적 잘 일치하였다(32). 이 흡수파장 범위에서 1/20로 희석한 배양 여액의 흡광도는 MCM, YM 및 CCM의 3종에서 *P. hartigii*를 배양하였을 때, 1.5~2.0으로 가장 높게 나타났다. 균사체 생육이 우수한 *Phellinus* 421은 MCM, GCM 및 CVM의 3종 배지에서 흡광도가 비교적 높게 나타났으나, 상대적으로 그 값은 *P. hartigii*보다는 낮았고, *P. linteus*는 거의 모든 배지에서 배양여액의 흡광도가 낮게 나타났다.

따라서 흡광도가 가장 높게 나타난 *P. hartigii*를 MCM, YM 및 CCM 배지에서 각각 배양하면서 배양기간에 따른 흡광도의 변화를 조사하였으며, 그 결과를 pH, 균사생육 및 잔존당의 경시변화와 함께 Fig. 4에 나타내었다.

CCM 배지에서 8일간 배양하였을 때, 당이 소비되면서 균사체 생육 및 색소물질의 축적이 모두 가장 우수하였다. 반면, YM 배지에서는 균체 생육이 상대적으로 적었고, 6일간 배양한 결과로는 색소물질의 축적이 가장 우수하였으나, 8일째에 감소하는 경향을 나타내었다. 한편, MCM 배지에서는 8일간 배양하였을 때, 균체 및 색소물질의 축적은 우수하였으나, 그 양은 CCM 배지보다 낮았다. 또 배양 여액의 pH 변화를 보면 6일까지는 낮아지다가 8일 이후 다시 높아지는 것으로 나타났다. pH 변화에 따라 색이 변하는 색소로는 anthocyan계 색소(33) 등이 알려져 있는데, 배양 8일 이후 색소물질의 감소 경향 또한 pH 변화에 의한 영향일 가능성이 있으므로 색소물질의 pH에 대한 안정성을 추가 검토할 필요성이 있었으나 이에 대해서는 더 이상 검토하지 못했다.

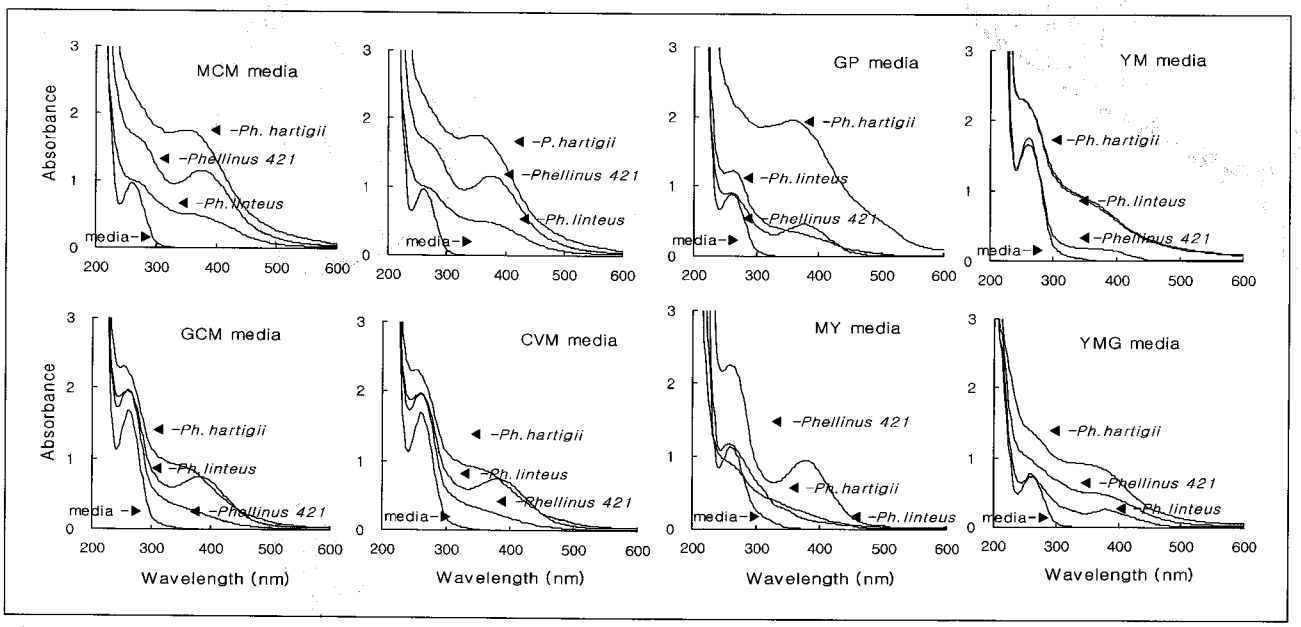


Figure 3. UV/Vis absorption spectra of the culture broth diluted to 1/20 by submerged cultivation from the three *Phellinus* species after 8days cultivation in different media.

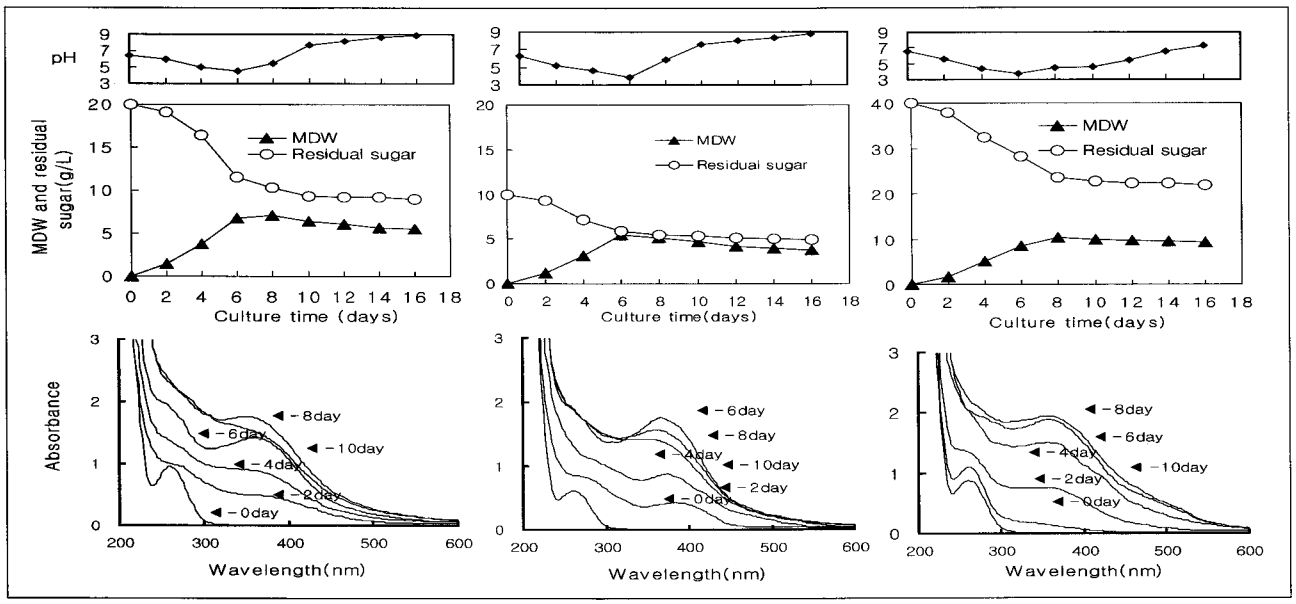


Figure 4. Time courses of the mycelial dry weight and UV/Vis absorption spectra of the culture broth (diluted to 1/20) during submerged cultivation of *Phellinus hartigii* in MCM (left), YM (middle) and CCM(right) media.

이상의 결과로부터 세포외 색소물질의 생산 균주로는 *P. hartigii*를 선정하였고, 배지는 CCM 배지로 결정하였다.

색소물질의 분리

배양 여액으로부터 색소물질을 분리하기 위하여 배양 여액과 8종의 유기용매를 각각 분액 깔대기에 동량비로 넣고 추출한 결과, 자료화하지는 않았으나 사용된 모든 유기용매에서 유기용매 층으로의 분배율이 매우 낮았고 (0.12~4.76%), 따라서 유기용매 추출로는 색소물질이 효과적으로 분리되지 않았다. 오히려 배양여액에 유기용매를 첨가하면 색소물질의 침전이 일어나 침전에 의해 색소물질이 회수됨을 알 수 있었다. Fig. 5는 3종의 유기용매를 1~5배 첨가하였을 때, 침전량을 나타낸 것으로, 침전량은 acetone을 5배로 첨가하여 사용하였을 때 6.38 g/L로 가장 많았으며, 잔존율도 가장 적었다.

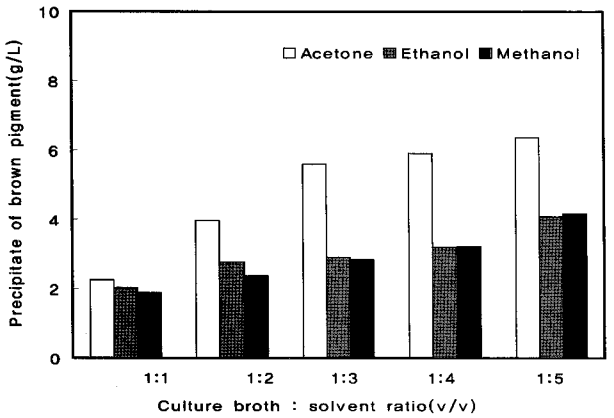


Figure 5. Effect of culture broth : solvent ratio (v/v) on brown pigment precipitation.

한편, 산에 의한 침전을 조사한 결과, Fig. 6과 같이 침전량과 상등액의 색소 잔존율은 반비례하였다. 1 M HCl을 0~20% (v/v) 첨가하였을 때, 각각 10% (v/v)의 첨가구에서 여액의 색소물질 잔존율이 가장 낮았으며, 침전량은 7.7 g/L로 가장 높았으므로 색소물질이 효과적으로 분리됨을 알 수 있었다. 산 첨가 후 pH는 1.5~2.0 범위이었다.

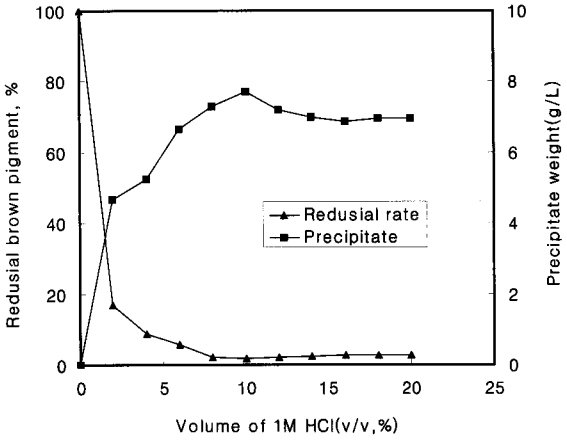


Figure 6. Effect of added volume of 1 M HCl solution on brown pigment precipitation from culture broth.

이상으로부터 유기용매 보다는 산 용매를 사용하였을 때 색소물질이 가장 잘 분리됨을 알 수 있었고, 이 결과를 바탕으로 색소물질의 정제 조작에서는 배양여액에 1 M HCl 10% (v/v)를 첨가하였으며, 생성된 침전물을 증류수로 세척한 후 동결건조하여 조색소물질 (crude coloring material) 시료로 하였다.

색소물질의 정제

색소물질은 ethanol, methanol 및 증류수에 전혀 용해되지 않았으므로 1 M NaOH 용액에 녹여 중화시킨 다음, 이를 gel chromatography하여 정제하였다. 그 결과는 Fig. 7과 같다.

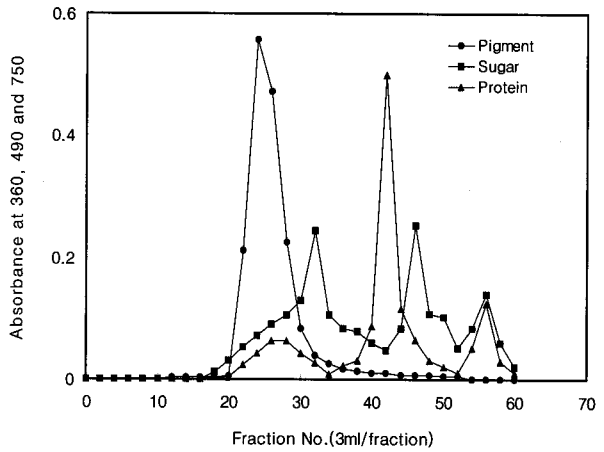
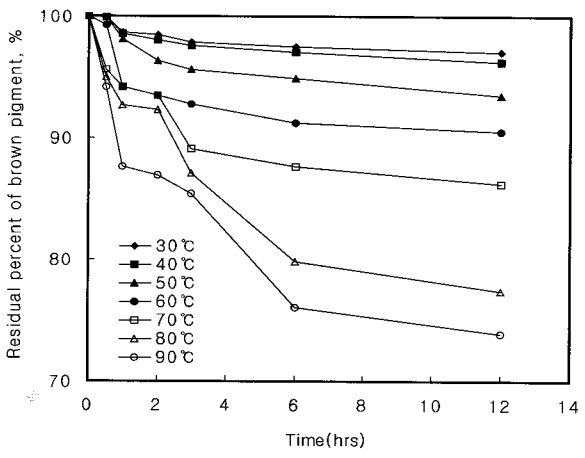


Figure 7. Elution profile of brown pigment on Sephadex G-75 gel chromatography.

각 분획의 흡광도를 360 nm에서 조사한 결과, 용출부피 72 ml에서 단일 peak를 나타내었고, 이 peak의 분획에서 전당, 페놀 및 단백질 또한 peak를 나타내었다. 그러나 페놀성분의 함량이 가장 높았으며, 이 색소가 거의 분리된 이후인 용출부피 90 ml 이상에서도 당성분과 단백질 성분이 소량 분리되었는데, 이는 조색소물질의 미량 불순물로 생각되었다. 따라서 페놀 성분 함량이 높은 단일 peak를 나타내었던 분획을 채취하였고, 이를 분자량적으로 균일한 부분정제.색소물질로 하여 이하의 실험을 실시하였다.

색소물질의 특성

정제된 색소물질의 열 및 pH에 대한 안정성은 Fig. 8과 같다. 30~90℃범위에서 각각의 온도를 유지하며 12시간 동안 조사한 결과, 30~60℃범위에서는 색소물질의 잔존율이 97~90%로 안정하였으나, 80℃이상에서는 3시간 이후 급격히 감소하여 75%의 잔존율을 나타내었다. 또, 색소물질의 pH에 대한 안정성은 1 M HCl 및 1M NaOH로 pH를 조절하여 12시간 동안 조사하여 얻었으며, pH 4~6에서는 92%이상으로 잔존율이 높게 유지되었고, pH 6이상에서도 각각 85~88%로 비교적 높은 잔존율을 유지하였다. 그러나 pH 4보다 낮은 조건에서는 침전을 형성하여 안정성을 확인할 수 없었다.



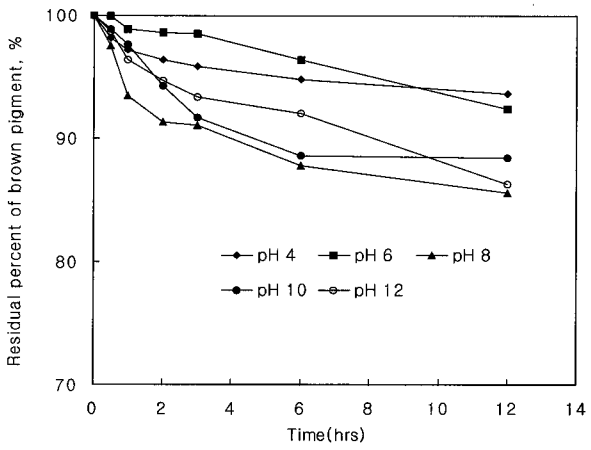


Figure 8. Heat and pH stability of brown pigment.

한편, NaCl의 0.1~3 M 및 sucrose의 1~20% 첨가시 색소물질의 안정성을 조사한 결과는 Fig. 9와 같다. NaCl 첨가의 경우 12시간 경과 후에도 각각 94, 95, 92 및 90%로 높은 잔존율을 유지하여 NaCl에 대해 안정한 것으로 나타났으나, NaCl 농도가 증가할수록 다소 잔존율이 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 또, sucrose 첨가시는 1~5% 첨가하였을 때는 색소물질의 잔존율이 약 93%이상으로 비교적 안정하였다. 그러나 그 이상 첨가하였을 경우는 1시간 후 색소물질의 잔존율이 10%이상 급격히 감소하였고, 그 이후 안정한 상태를 나타내었다.

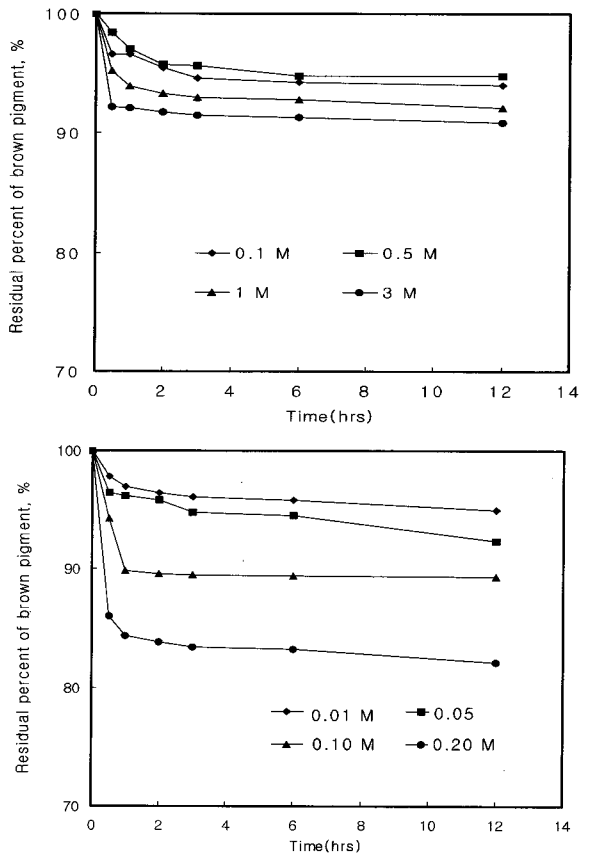


Figure 9. Time change of brown pigment residual percent at various concentrations of sodium chloride (top) and sucrose (bottom).

이상의 결과로 보아 색소물질의 안정한 온도 및 pH 범위는 각각 30~60℃, pH 4~6이고, NaCl 및 sucrose의 첨가량은 각각 NaCl 3 M 이하 및 sucrose 1~5%임을 알 수 있었다.

한편, 색소물질의 항산화 기능성 및 유효성분을 알아보기 위해 분리정제 과정의 각 시료인 배양여액 (culture broth), 산 침전시 상등액 (supernatant), 조색소 물질 (dialysis) 및 색소물질 (brown pigment)의 항산화 효과를 vitamin E (α-tocopherol)를 대조로 하여 TBA 법에 의해 7일간 비교하였으며, 그 결과는 Fig. 10과 같다.

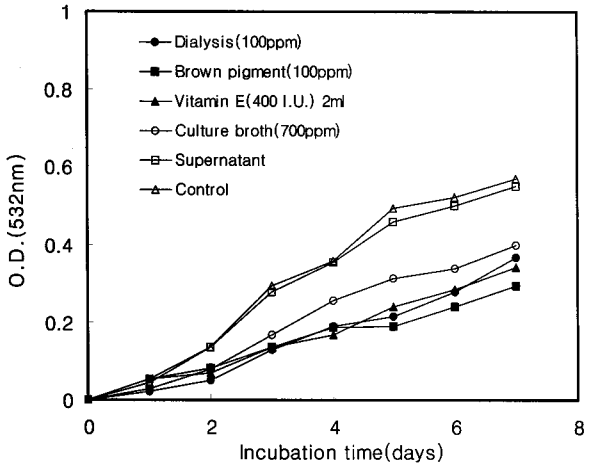


Figure 10. Antioxidative activity of culture broth, supernatant, dialysis, brown pigment and vitamin E by TBA method.

분리정제 과정의 각 시료의 항산화 활성을 비교한 결과, 정제가 진행 될수록 활성이 증가하는 것으로 나타났고, 최종 분리된 색소물질은 vitamin E보다도 우수한 항산화 활성을 나타내었다. 또, 이 때 각 시료의 항산화 활성 검색에서 과산화 지질 생성억제를 TBA값으로 나타내어 inhibition ratio (I.R, %)로 나타낸 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Percent inhibition ratio of culture broth, dialysis, brown pigment, supernatant and vitamin E by TBA method

	Concentration	TBA Value	I.R.(%)[a)]
Control	-	0.570	-
Vitamin E	400 I.U. 2ml	0.342	40.0
Culture broth	700 ppm	0.398	30.2
Supernatant	2 ml	0.550	3.5
Dialysis	100 ppm	0.367	35.6
Brown pigment	100 ppm	0.293	48.6

a) Percent inhibition ratio = $\frac{Cm - Tm}{Cm} \times 100$

Cm : TBA mean value of control

Tm : TBA mean value of test sample

색소물질은 100 ppm에서 과산화 지질 생성 억제율이 vitamin E의 40%보다도 높은 48.6%로 나타나 비교적 우수한 항산화 효과를 갖는 것으로 판단되었다.

결 론

Phellinus 421, *Phellinus linteus* 및 *Phellinus hartigii*의 3종 진흙버섯속 버섯을 8종의 배지를 사용하여 액체배양하고, 세포외 색소물질의 생산을 조사하였으며, 이 색소물질을 분리, 정제하고, 그 안정성 및 항산화 활성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

세포외 색소물질을 가장 많이 생산하는 균주로 *Phellinus hartigii*, 배지로는 CCM (Coriolus complete medium)배지가 선정되었고, 배양여액을 희석하여 200~600 nm에서 scanning 결과, 색소물질은 360 nm에서 최대 흡수파장을 나타내었다. 배양 여액으로부터 색소물질을 분리하기 위한 방법으로는 배양여액에 1 M HCl을 10% 첨가할 때, 색소물질이 가장 잘 분리되었으며, 이때 침전량은 7.7 g/L이었고, 이 색소물질은 다량의 폴리페놀과 소량의 당 및 단백질 함유한 성분인 것으로 추정되었다. Gel chromatography로 정제하여 얻은 색소물질의 열, pH, NaCl 첨가 및 sucrose 첨가 안정성을 각 조건에서 12시간 동안 검토한 결과, 온도 범위는 30~60℃, pH 범위는 pH 4~6이었고, NaCl 첨가량은 3 M이하, 그리고 sucrose 첨가량은 1~5% 정도에서 매우 안정한 것으로 나타났다. 정제 과정의 각 시료와 vitamin E의 항산화 효과를 비교한 결과, 정제가 진행될수록 항산화 활성이 증가하였으며, 색소물질의 과산화 지질 생성 억제율은 vitamin E (α-tocopherol)의 40%보다도 높은 48.6%로 나타나 우수한 항산화 효과를 갖는 것으로 나타났다.

REFERENCES

1. Lakhanpal, T. N. and M. Rana (2005). Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms, *Plant Genetic Resources* **3,** 288-303.
2. Ikekawa, T. (2001), Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms on health care, *International Journal of Medicinal Mushrooms* **3,** 291-298.
3. Mizuno, T. (2000), Development of an antitumor biological response modifier from *Phellinus linteus* (Berk. Et Curt.) Teng (Aphyllophoromycetidae) (Review), *International Journal of Medicinal Mushrooms* **2**, 21-33.
4. Mizuno, T. (1995), Bioactive biomolecules of mushrooms: food functions and medicinal effects of mushroom fungi, *Food Review International* **11,** 7-21.
5. Breene, W. M. (1990), Nutritional and medical value of specialty mushrooms, *J. Food Protection* **53**, 883-894.
6. Larsen, M. J. and L. A. Cobb-Poulle (1988), *Phellinus* (Hymenochaetaceae). A Survey of the World, Taxa. Fungiflora, Oslo, Norway, pp.1-206.
7. Ikekawa, T., M. Maeda, N. Uehara, G. Chihana, and F. Fukuoka (1968), Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus, Gann.* **59**, 153-155.
8. Lee, J. H., S. M. Cho, K. S. Song, N. D. Hong, and I. D. Yoo (1996), Characterization of carbohydrate-peptide linkage of acidic heteroglycopeptide with immunostimulating activity from mycelium of *Phellinus linteus, Chem. Pharm. Bull.* **44**, 1093-1095.
9. Lee, J. W., S. J. Baek, K. W. Bang, S. W. Kang, S. M. Kang, B. Y. Kim, and I. S. Ha (2000): Biological activities of polysaccharide extracted from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001, *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **32**, 726-735.

10. Lee, J. W., S. J. Baek, K. W. Bang, Y. S. Kim, M. D. Han, .and I. S. Ha (1999), Characteristics of polysaccharide isolated from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001, *Kor. J. Mycology* **27**(6), 424-429.
11. Lee, J. H., S. M. Cho, K. S. Ko, and I. D. Yoo (1995), Effect of cultural conditions on polysaccharide production and its monosaccharide composition in *Phellinus linteus* L13202, *The Korean Journal of Mycology* **23**(4), 325-331.
12. Chi, J. H., T. M. Ha, Y. H. Kim, and Y. D. Rho (1996), Studies on the main factors affecting mycelial growth of *Phellinus linteus, Kor. J. Mycol.* **24**(3), 214-222.
13. Song, C. H., H. Y. Moon, and C. H. Ryu (1997), Artificial cultivation of *Phellinus linteus, Kor. J. Mycol* **25**(2), 130-132.
14. Choi, K. H., and C. W. Lee (2000), Submerged culture of *Phellinus linteus* in stirred tank fermenter and air lift fermenter, *Hwahak Konghak* **38**(2), 310-315.
15. Lee, J. W. and K. W. Bang (2001), Biological Activity of *Phellinus* spp., *Food Industry and Nutrition* **6**(1), 25-33.
16. Lim, J. S., S. H. Kim, J. S. Park, J. Y. Choi, S. J. Park, and K. S. Shin (2001), Anti- tumor activity of the fruitbody extract of basidiomycetes, *Phellinus linteus, The Journal of Microbiology* **39**(2), 121-125.
17. Lee, K. H., H. J. Kwon, S. S. Chun, J. H. Kim, Y. J. Cho, and W. S: Cha (2006), Biological activities of extracts from *Phellinus linteus, J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**(4), 298-303.
18. Hwang, H. J., S. W. Kim, J. W. Yun, and J. W. Choi (2004), Optimal conditions of mycelial growth and exopolysaccharide production in submerged culture of *Phellinus baumi, Journal of Life Science* **14**(1), 51-56.
19. Su, Y. C. and J. H. Huang (1980), Fermentative production of anka-pigment (*Monascus*-pigments), *Proc. Natl. Sci. Counc. ROC.* **4**(2), 201-215.
20. Lin, T. F. and A. L. Demain (1991), Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**(1), 70-75.
21. Lin, T. F. (1973), Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture, *J. Ferment. Technol.* **51**(6), 407-414.
22. Mariette, C. and S. David (1977), The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged, shaken culture, *Can. J. Microbiol.* **23**, 1360-1372.
23. Song, K. S., S. M. Cho, K. S. Ko, M. W. Han, and I. D. Yoo (1994), Secondary metabolites from mycelial culture broth of *Phellinus linteus, J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **37**(2), 100-104.
24. Kang, T. S., D. G. Lee, and S. Y. Lee (1997), Isolation and mycelial submerged cultivation of *Phellinus* sp., *The Korean Journal of Mycology* **25**(4), 257-267.
25. Lee, J. H., S. M. Cho, K. S. Ko, and I. D. Yoo (1995), Effect of cultural conditions on polysaccharide production and its monosaccharide composition in *Phellinus linteus* L13202, *Kor. J. Mycology* **23**(4), 324-326.
26. Park, K. S., S. Park, I. C. Jung, H. C. Ha, S. H. Kim, and J. S. Lee (1994), Production of protein-bound polysaccharides by solid state fermentation of *Coriolus versicolor, The Korean Journal of Mycology* **22**(2), 184-189.
27. Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chem.* **31**, 426-428.
28. Chaplin, M. F. and J. F. Kenndy (1986), Carbohydrate Analysis, IRL Press, Oxford, pp. 1-6.
29. Bollag, D. M. and S. J. Edelstein (1991), Protein Methods, Wiley-Liss Inc., New York, pp. 56-59.
30. Bray, H. G., and W. V. Thorpe (1954), Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism, *Method in Biochemical Analysis* **1**, 27-54.
31. Sidwell, C. G., H. Salwin, M. Benca, and J. H. Mitchell Jr. (1954), The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **31**, 603-609.
32. Mak, N. K., W. F. Fong, and Y. L. Wong-Leung (1990), Improved fermentative production of Monascus pigments in roller bottle culture, *Departments of Biology and Chemistry*, Hong Kong, pp. 964-966.
33. Baranac, J. M., N. A. Petranovic´, and J. M. Dimitric´-Markovic´ (1996), Spectro-photometric study of anthocyan copigmentation reactions, *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1333-1336.