

## 버섯 균사체 혼합 배양 추출물의 항균, 항산화 및 항암 활성

김 만 철 · 김 주 상 · † 허 문 수  
제주대학교 해양과학대학 해양과학부 및 † 해양과 환경연구소  
(접수 : 2007. 8. 9., 게재승인 : 2008. 4. 20.)

### Antibacterial, antioxidant and antitumor activities of mushroom mycelium mixed culture extracts

Man-Cheol Kim, Ju-Sang Kim, and Moon-Soo Heo†  
Faculty of marine science and Marine and environment institute, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea  
(Received : 2007. 8. 9., Accepted : 2008. 4. 20.)

In this study, we have investigated the antibacterial, antioxidant, and antitumor activities of mycelium cultural extract from mushroom. Mushroom mycelium was grown in a synthetic liquid media such as PD broth, YM broth or citrus extracts. In antibacterial activity test, the best result was achieved when mycelium cultural extracts from *Phellinus linteus* and *Coriolus versicolor* were incubated together on YM broth. On the other hand, mushroom mycelium cultured on citrus extracts showed better activity than that on PD broth. We have also tested the antioxidant activity at concentration up to 10 mg of mycelium cultural extract /mL. The more it is in higher concentration, the more the activity increases. The higher antioxidant activity was observed both on PD broth containing the *Phellinus linteus* and *Coriolus versicolor* mycelium and citrus extract containing the same. The complex culture extracts obtained from the synthetic medium and citrus extract medium showed 10-89% of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenger activity. The antitumor activity of mycelium cultural extract was examined by using MTT assay on A549 cells. Mushroom mycelium cultured on citrus extracts showed interestingly higher antitumor activity than that on synthetic liquid media.

**Key Words** : Mushroom mycelium mixed culture extracts, Antibacterial activity, antioxidant activity, antitumor activity

#### 서 론

최근 국민들의 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라서 건강 기능성 식품에 관한 연구가 심도 있게 진행되어 다양한 제품들이 속속 개발되어 상품화 되고 있다. 최근에는 종래 식용으로만 주로 이용되어온 버섯에서 우수한 약리효능이 계속 해서 밝혀짐에 따라 건강 기능성 식품신소재로서 버섯의 소비 역시 꾸준히 증가하고 있다(1). 현재 한국산 버섯의 경우 현재 992종이 분류되어 있으며 그 중 식용 가능한 버섯이 100여종, 독버섯은 50여종이 존재한다(2). 또한 약용으로 사용하는 버섯은 35과 82속 162종으로 보고되고 있으나, 그 나머지 버섯은 아직 확인된 바가 없다(3). 버섯은 당질, 단백질, 비타민 및 무기질과 같은 영양소들을 골고루 함유하고 있어

식품으로서 가치가 높다. 이러한 버섯류의 식품적 기능은 영양적 가치에 의한 1차적 기능과 기호성에 따른 2차적 기능, 식용 후 인체 내의 다양한 조절기능에 관여하는 3차적 기능으로 나눌 수 있다(1). 버섯은 이러한 기능 중 특히 3차적 기능이 뛰어나 예로부터 약용으로 널리 이용되었지만 그 성분과 약리작용에 대한 체계적인 연구는 그리 많지 않은 편이다.

담자균류의 약리활성에 대한 최초의 연구는 Lucas등(4)에 의하여 그물버섯의 열수 추출물이 sarcoma 180 고형암 억제 효과 및 종양에 대한 완화작용이 있는 물질인 것으로 밝혀 지면서부터 비롯되었다. 담자균류의 약리효과에 대한 본격적인 연구는 Chihara등(5)이 일본 및 아시아에서 종양에 유효한 민간 약인 한방약에 기초하여 *Phellinus linteus*, *Coriopolus hirsutus*, *Ganoderma applanatum* 등이 열수 추출물이 항암활성이 있음을 보고하였으며, 이후 구름버섯에서 분리한 krestin, 표고버섯 으로부터 분리한 lentinan이 항암 및 항암보조제로 시판되고 있다(6). 이와 같은 연구에 의해 항암, 콜레스테롤 저하, 혈당 강하, 항종양 효과, 항균 활성, 항산화 활성 등이 입증됨으로 기능성 식품 (functional food) 및 의약품 소재로 크게 주목

† Corresponding Author : Faculty of marine science and Marine and environment institute, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea  
Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-756-3493  
E-mail : msheo@cheju.ac.kr

받고 있다(7-10).

버섯 중 일부는 자연계에서 분포 및 발생수가 극히 적어 자실체를 얻기 어려우며 인공배양 역시 계절의 제약을 받는 등 어려운 것으로 알려져 이에 대한 화학적, 생화학적 연구가 거의 이루어지지 못하였지만, 1990년대 중반 균사체 배양 기술과 인공재배법이 확립된 후 농가에서 대량생산이 가능하게 하게 되었다. 또한 버섯균사체는 자실체(7-10)와 유사한 항암, 체지방 감소, 혈중 콜레스테롤 저하 및 면역증강 효과 등의 활성을 가지며, 성장중에 섬유소 분해효소, 단백질 분해효소, 지방질 분해효소 등의 다양한 가수분해 효소를 생성한다(11, 12).

이와 같은 버섯균사체의 생육특성을 이용하여 액체배양을 할 경우, 배지의 조성 및 생육조건에 따라 항균, 항산화, 항암 활성을 갖는 다양한 대사산물을 얻을 수 있다. 즉 버섯균은 배지에 함유된 성분을 다양한 기능성을 갖는 물질로 생물 전환할 수 있고, 배지에 함유된 특수한 기능을 갖는 2차 대사산물 자체도 배양액으로 유입시킬 수 있다. 또한 이와 같은 버섯균배양물의 생산은 계절의 제한을 받지 않고, 값싸게 대량생산이 가능하여 원료공급이 용이하고, 산업화가 쉽지만 식품소재 및 의약품 소재에 응용되는 부분은 매우 미흡한 편으로 식품산업에 보다 다양하게 이용할 필요가 있다(1).

또한 미생물들의 경우 인위적인 혼합배양은 각 균 간의 상호과정인 competition, predation, commensalism 등 다양한 작용에 의해 단독배양에서 기대할 수 없었던 물질을 생산하거나 발효방법을 개량할 수 있는 가능성을 가지고 있다(13). 이에 따라 본 연구에서는 버섯균사체간의 혼합 배양을 통한 효율 개선 가능성을 검토 하고자 하였다.

한편 제주지역을 중심으로 대량생산되고 있는 온주 밀감은 생산량이 많지만 제품의 경쟁력이 낮아지는 추세이므로, 보다 유리한 조건을 얻기 위해 감귤을 원료로 하는 가공제품의 생산에 관심을 기울이고 있고, 용도개발을 통한 고부가 가치 제품을 생산하려는 노력을 하고 있다(14-16).

또한 제주도는 지역적인 특성상 어류 양식 산업이 높은 비중을 차지하고 있으며, 이에 따른 어류 질병에 많이 노출됨에 따라 항생제의 사용 빈도 증가로 인한 내성균주의 증가, 생산비의 증가, 제품이미지 하락 등으로 인하여 어민들의 경제적인 부담이 증가하고 있으므로 친환경적이고 값싸며 경제적인 항생제 및 면역증강제의 개발이 절실한 상황이다.

본 연구에서는 어류 양식 산업에서 사료첨가제로서의 가능성을 확인하기 위하여 약용버섯으로 잘 알려진 상황버섯 (*Phellinus linteus*), 운지버섯 (*Coriolus versicolor*), 그리고 꽃송이버섯 (*Sparassia crispa*)의 버섯 균사체를 감귤농축액이 첨가된 배지와 일반 합성배지에서 혼합배양한 후, 배양액의 추출액이 병원성세균 및 어류질병세균에 대한 항균활성과 자유라디칼을 산화시키는 system에서 항산화 효과, 그리고 인체 암세포에 대한 항암효과를 비교 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 재료

실험에 사용한 균주는 총 3종류로 상황버섯 (*Phellinus*

*linteus*), 운지버섯 (*Coriolus versicolor*), 그리고 꽃송이버섯 (*Sparassia crispa*)균은 제주도내에 위치하는 (주)대우환경산업에서 보관 중인 균주를 사용하였다(Table 1).

**Table 1.** The mushroom mycelium mixed cultured used for the tests of antibacterial, antioxidant activities and cell viability assay

Name of mushroom		Part used
Korean name	Scientific name	
Sanghwang + Eunji	<i>Phellinus linteus</i> + <i>Coriolus versicolor</i> (10% citrus extract media)	Mycelium
Sanghwang + Eunji	<i>Phellinus linteus</i> + <i>Coriolus versicolor</i> (PD broth)	Mycelium
Sanghwang + Eunji	<i>Phellinus linteus</i> + <i>Coriolus versicolor</i> (10% citrus extract filtration)	Mycelium
Sanghwang + Eunji	<i>Phellinus linteus</i> + <i>Coriolus versicolor</i> (YM broth)	Mycelium
Sanghwang + Eunji + Kkotsongi	<i>Phellinus linteus</i> + <i>Coriolus versicolor</i> + <i>Sparassia crispa</i> (10% citrus extract media)	Mycelium

균주보관은 4°C 냉장실에 20 ml 시험관에 Potato Dextrose Agar (PDA; Difco: Co., USA). YM (Dextrose 1%, Peptone 0.5%, Malt extract 0.3%, Yeast extract 0.3%, Agar 1.8%) Slant로 보관하면서 필요할 때마다 같은 배지의 8.5 mm 평판 배양기에 이식하여 확대 배양을 하였다. 그리고 균사체 직경이 5 cm 이상 자랐을 때 균사체 가장자리에서 Cork borer (5 mm) 로 떼어서 접종하였다. 본 실험에서는 기본 배지로 PDA, YM 를 사용하였고, 천연배지로는 감귤농축액을 구입하여 증류수에 10% (v/v) 정도를 첨가한 후, 각각 배양하여 항균활성, 항산화 등의 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 감귤 농축액은 제주도 남제주군 한남리 소재 제주도 지방개발공사에서 생산하여 시판 중인 제주 감귤 희석액 (62 brix)을 구입하여 살균 증류수로 12% 되게 희석하여 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 희석감귤 농축액의 pH는 3.7이었다.

**Table 2.** List of strains and media used for antibacterial experiments

	Strain	Media
	<i>Vibrio harvey</i> KCTC 2717	
	<i>Vibrio mimicus</i> KCTC 2732	
	<i>Vibrio alginolyticus</i> KCTC 2472	
Gram negative bacteria	<i>Vibrio vulnificus</i> KCTC 2959	
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> KCTC 2471	
	<i>Vibrio campbelli</i> KCTC 2716	Tryptic soy broth (TSB, Difco)
	<i>Vibrio anguillarum</i> KCTC 2711	
	<i>Vibrio pelagius</i> KCTC 2732	
	<i>Edwardsiella tarda</i> KCTC 12267	
Gram positive bacteria	<i>Streptococcus</i> sp (Wild type)	
	<i>Streptococcus parauberis</i> (Wild type)	
	<i>Streptococcus iniae</i> (Wild type)	

본 항균활성 실험에 사용된 균주는 일반 병원성 균주 *Vibrio harvey* KCTC 2717, *Vibrio mimicus* KCTC 2732, *Vibrio alginolyticus* KCTC 2472, *Vibrio vulnificus* KCTC 2959, *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2471과 어류에서 가장 많은 질병을

일으키는 세균인 그람 음성균인 *Vibrio anguillarum* KTCT 2717, *Edwardsiella tarda* KCTC 12267과 *Vibrio pelagius* KCTC 2732, 그리고 어류 비병원성 세균인 *Vibrio campbelli* KCTC 2716, 질병에 걸린 양식넙치로부터 분리된 그람 양성균인 *Streptococcus* sp.와 분리 동정된 *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*를 사용하였다(Table 2). 균 생육배지는 Tryptic soy broth (TSB, Difco. Co. USA)를 사용하여 20시간 배양하였으며, 항균활성측정을 위한 배지로는 Mueller Hinton Agar (Difco Co., USA)를 사용하였다.

#### 플라스크배양 및 Carboy 배양

기본 실험배지는 Potato Dextrose Broth (Difco. Co. USA)와 YM 배지를 사용하였다. 배지는 300 ml 삼각 flask에 100 ml 씩 분주하여 121°C, 20분 동안 고압 멸균하였다. 공시균주 접종원을 Cork borer (5 mm)로 5개씩 떼어서 접종하였다. 배양은 120 rpm의 회전수에 온도는 24~30°C 사이에서 회전진탕 배양기에서 균에 따라 7일에서 15일까지 배양하였다.

본 배양의 영양원으로 복합배지 (PD broth, YM broth)와 감귤농축액 첨가 배지를 사용하였는데 대량 배양에 흔히 사용되는 방법인 carboy 배양방법을 이용하였으며, 감귤농축액 배지 (10%)는 2 L의 병에 증류수를 첨가한 후, 감귤농축액의 농도 10% (v/v)로 배지를 조제하여 121°C에서 30분간 가압 살균하여 배지를 조제하였으며, 접종원은 균질기로 균질화한 후 2% 접종비로 무균적으로 접종하였다. 25 ± 1°C의 항온 시설에서 통기량 0.2 vvm (volume of air added to liquid volume per minute)으로 7~10일간 통기 배양하였다.

#### 추출물의 조제

배양이 완료된 배양물을 121°C에서 60분간 고압추출한 후 4000 Xg에서 10분간 원심분리 (union 32 R Plus, Hanil)한 후, filter paper (Whatman NO. 2)로 여과하였다. 배양 균사체를 제거한 후 여액에 ethanol 를 3배 첨가하고, 강력하게 교반하여 4°C의 저온에서 24시간 방치한 후, 4000 Xg에서 30분간 원심 분리하여 상등액과 침전물로 분리한 후, 상등액을 회전감압농축기로 농축 및 동결건조한 후, -70°C의 deep freezer 에 보관하면서 각 실험에 사용하였다.

#### 항균활성측정

항균력 실험을 위한 disc 제작을 위해 버섯균사체 추출분말 10mg을 멸균증류수 1ml에 용해한 후, membrane filter (0.45 µm)로 제균한 것을 항생물질 검정용 paper disc (ADVANTEC F0424695, 6mm)에 각각 100 µl씩 흡습시킨 후 40°C로 조절된 건조기에서 30분간 건조시킨 다음 항균력 실험에 사용하였다. disc당 추출물의 함유량은 1,000 µg, 2,000 µg 이었다.

항균활성 실험에 사용된 균주는 표준균주를 포함하여 그람 음성균 9균주, 그람 양성균 3균주였다. 이들 균들은 각각의 최적 배지와 성장 최적 조건에서 전 배양한 후, MacFaland No. 0.5인 균 현탁액을 다시 생리식염수에 10배 희석하여 미리 만들어진 Muller Hinton Agar plate에 100 µl를 골고루 도말한 후, 제작한 버섯균사체 추출물이 함유된 disc를 올려 놓고, 각각의 균주 배양 온도에 맞추어서 24시간 배양한

다음 버니어캘리퍼스로 저지대를 측정하였다. 또한 시험 추출분말의 항균력 비교를 위하여 총 7종의 항생제 (Penicillin, Erythromycin, Neomycin, Kanamycin, Chloamphenicol, Nalidixic acid, Tetracycline) disc를 비교약제로 사용하였다.

#### 전자공여능 측정

상황버섯, 운지버섯, 꽃송이버섯의 균사체 혼합배양액의 전자공여능은 Bios의 방법(17)에 의하여 시료의 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)에 대한 환원력으로 측정하였다. DPPH는 항산화성 물질로부터 전자, 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하므로, 전자공여능 (Electron Donating Ability)으로부터 항산화 활성을 추정할 수 있다(18).

버섯 균사체 추출용액은 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 그리고 1 mg/ml 농도의 버섯 균사체 추출용액 각각 1 ml를 취하여 150 µM DPPH 용액 2 ml에 가하여 vortex로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 반응시킨 후 525 nm의 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 널리 알려진 합성 항산화제인 BHA (butylated hydroxyanisole)를 같은 방법에 의하여 실험하였다.

#### 항암활성측정

항암활성측정에 사용된 세포주인 A549 인체 폐암세포는 한국생명공학연구원 (KRIBB, Daejeon, Korea)에서 분양 받았으며, RPMI-1640배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)와 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL)과 1%의 penicillin-streptomycin (Gibco BRL)등이 포함된 배지를 사용하여 KRIBB의 배양조건으로 배양하였다. 버섯균사체 혼합배양물의 첨가에 따른 암세포의 성장억제는 3-(4,5-dimethyl- thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT) 분석법(19)으로 측정하였다.

$$\text{암 세포 생존율(\%)} = (1-B/A) \times 100$$

A : 암세포만 배양된 well의 흡광치

B : 대조구 및 실험구 well의 흡광치

## 결과 및 고찰

#### 버섯균사체 혼합배양추출물의 항균활성측정

버섯균사체 혼합배양액을 이용하여 병원성 세균 및 어류 질병세균에 대한 항균활성을 조사한 결과 Table 3.과 같이 대부분의 시료에서 항균활성이 있는 것으로 나타났다. 일반 합성배지의 경우 YM broth 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 혼합배양물이 전반적으로 높은 항균활성을 나타내었으며, PD broth 에서 배양된 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양물의 경우는 다른 버섯 균사체 혼합 배양물에 비해 가장 낮은 항균활성을 나타내었다. 값비싼 합성배지를 대체하기 위한 10% 감귤추출물배지에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 혼합배양물이 10% 감귤추출물배지에서 배양한 상황버섯, 운지버섯, 꽃송이 버섯 균사체 혼합 배양물 보다 전반적으로 높은 항균활성을 나타내었다. 감귤배지 내의 고형물에 의해 균사체의 성장 및 활성물질 생산에 영향을 미치는지를 확인하고자 10% citrus extract filtration 에서 배양한

상황버섯과 운지버섯 균사체 혼합 배양물과 10% 감귤추출물배지에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 혼합 배양물을 비교하였으나 유의성 있는 항균활성효과 차이가 나타나지 않았다.

**Table 3.** Antibacterial activities of the liquid mixed culture extracts of mushroom mycelium

Strain	Inhibition zone (mm)									
	Concentration (mg/ml)									
	A		B		C		D		E	
	10 mg	20 mg	10 mg	20 mg	10 mg	20 mg	10 mg	20 mg	10 mg	20 mg
<i>V. harvey</i>	16	18	11	20	14	21	18	23	0	12
<i>V. mimicus</i>	8	10	0	8	9	11	10	12	8	8
<i>V. alginolyticus</i>	0	10	0	10	0	10	0	11	0	0
<i>V. vulnificus</i>	0	10	0	10	9	15	12	18	8	10
<i>V. parahaemolyticus</i>	12	16	8	9	11	17	14	19	9	10
<i>V. campbelli</i>	8	8	8	8	9	11	10	16	8	8
<i>V. anguillarum</i>	9	13	8	10	10	12	11	15	8	11
<i>V. pelagius</i>	9	13	0	0	9	13	12	16	8	10
<i>E. tarda</i>	11	13	0	10	10	15	11	14	8	10
<i>Streptococcus sp.</i>	0	12	0	0	0	13	12	19	0	0
<i>S. iniae</i>	0	15	0	0	0	14	14	20	0	0
<i>S. parauberis</i>	0	13	0	0	0	13	9	17	0	9

Cell were grown on MHA plate for 24h at 26, 37°C after 10 mg, 20 mg each of mushroom liquid cultures was absorbed into paper disc (8 mm in diameter) and then the diameter (mm) of the growth inhibition zone was measured. Each value represents the average of three independent experiments.

- A : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (10% citrus extract media)
- B : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (PD broth)
- C : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (10% citrus extract filtration)
- D : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (YM broth)
- E : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* + *Sparassia crispa* (10% citrus extract media)

감귤 추출물에서 배양한 버섯 추출물의 경우에 감귤에 flavonoid, phenolics 등의 물질이 버섯균사체 배양 시에 항균물질 생성에 영향을 주는 것으로 사료되며 flavonoid, phenolics은 하귤, 삼보감, 이예감, 지각등이 *Bacillus licheniformis* ATCC 8845에서 높은 항균활성 뿐만 아니라 높은 flavonoid 함량을 나타내고 있음과 일치하는 결과를 나타낸 것으로 flavonoid의 항균능력이 뛰어난 것을 확인시켜 주고 있다(20). 페놀 성분의 함량이 높은 종류가 식중독에 관계된 균에 대해 항균성을 나타낸다는 보고가 있으며(20), 식물성 페놀성분이 항균에 작용한다는 보고(21)와도 상당히 일치하는 경향이 있음을 알 수 있다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 감귤 추출물에서 배양한 버섯 추출물의 경우 합성 배지와 거의 비슷한 항균 활성을 나타냈으며, 일부 약제 disk 처리구와 비슷한 수준의 항균 활성능 (Table 4)을 보여 주는 것으로서 기존 항생제를 대체하여 사용할 수 있는 가능성이 있고, 감귤 추출물 배양액 또한 기존의 값비싼 합성배지를 대체 할 수 있는 가능성이 있는 것으로 사료된다. 이러한 결과를 토대로 하여 본 연구에서 천연배지로 사용된 감귤추출물의 다양한 산업적인 응용이 가능하며, 버섯균사체와의 배양을 통한 활성 증가를 확인할 수가 있었다. 또한 본 항균 실험을 통하여 제주도내 많은

어류 질병 유발세균에 대한 억제능을 확인할 수가 있었으며, 제주도내 많은 해산 어류 양식장에서의 사료첨가제로서의 이용 가능성을 확인할 수가 있었다.

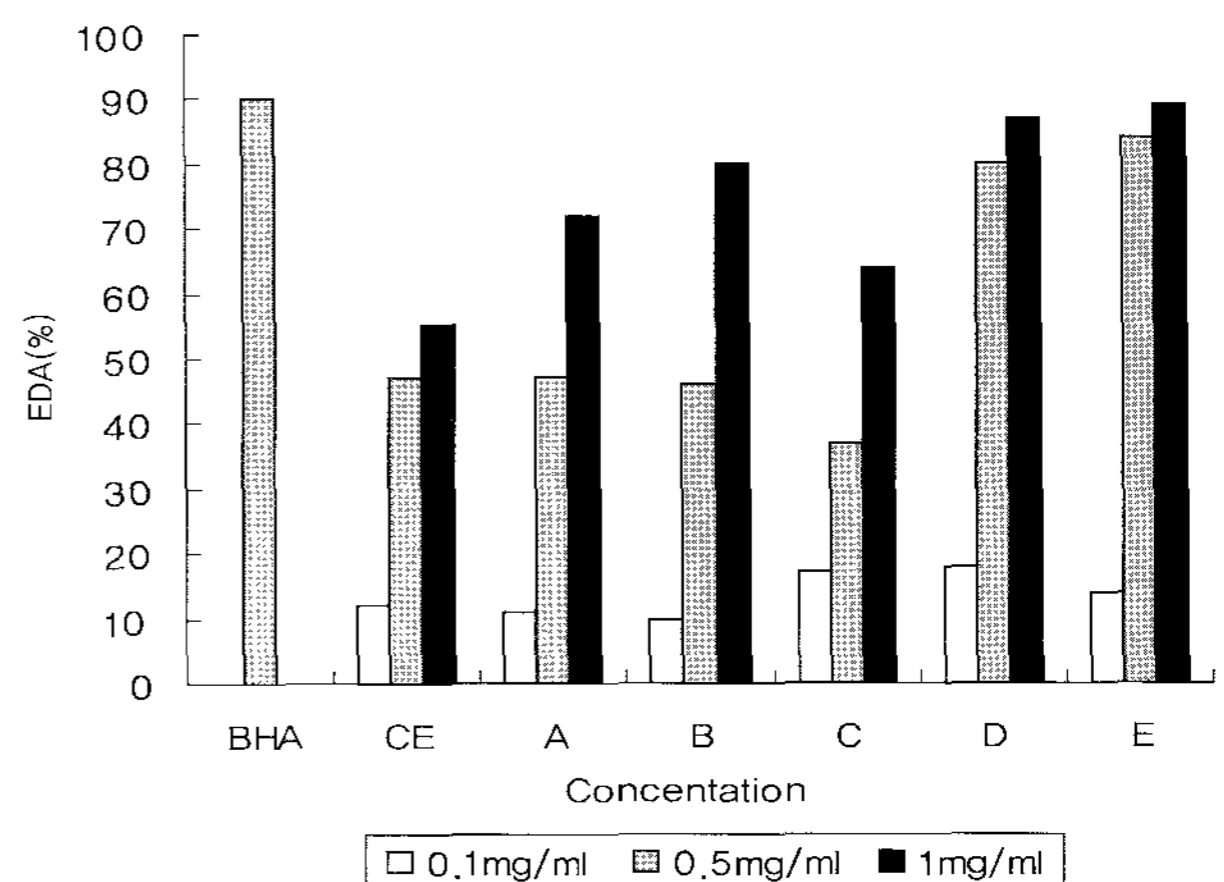
**Table 4.** Antibiotics resistance of *Vibrio* sp. and fishes disease bacteria

Strain	Inhibition zone (mm)						
	Penicillin	Erythromycin	Neomycin	Kanamycin	Chloamphenicol	Nalidixic acid	Tetracycline
<i>Streptococcus sp.</i>	22	23	25	21	27	30	25
<i>E. tarda</i>	20	30	23	18	22	30	18
<i>V. pelagius</i>	35	30	24	19	20	30	20
<i>V. campbelli</i>	35	25	25	22	25	28	25
<i>V. alginolyticus</i>	20	21	20	19	24	30	25
<i>V. parahaemolyticus</i>	18	20	19	19	25	28	30
<i>V. mimicus</i>	20	22	24	20	25	31	32
<i>V. anguillarum</i>	15	22	20	21	28	30	30
<i>V. harvey</i>	20	24	21	20	30	27	32
<i>V. vulnificus</i>	18	20	20	16	26	26	24

Each value represents the average of three independent experiments.

**버섯균사체 혼합 배양추출물의 전자공여능 측정**

항산화활성을 측정하기 위한 전자공여능 측정결과는 Fig. 1과 같다. 농도에 따른 흡광도를 비교한 결과 Fig. 3에 나타낸 것과 같이 각 시료의 농도가 높아질수록 전자공여능이 증가하였으며, 감귤첨가 배지를 이용한 상황버섯, 운지버섯 균사체 혼합배양물의 경우 filtration 하지 않은 실험구의 경우는 감귤첨가배지 자체보다 높은 전자공여능을 나타내었으며 감귤배지 자체의 항산화 성분이 균사체 배양을 통해 증가되었음을 알 수 있었다. 반면 filtration을 한 감귤첨가배지 실험구는 전자공여능이 감소하는 결과를 나타내었는데 이는 감귤첨가배지의 고형물이 제거됨으로서 함유되었던 항산화 물질의 손실에 의한 것이라고 사료된다.



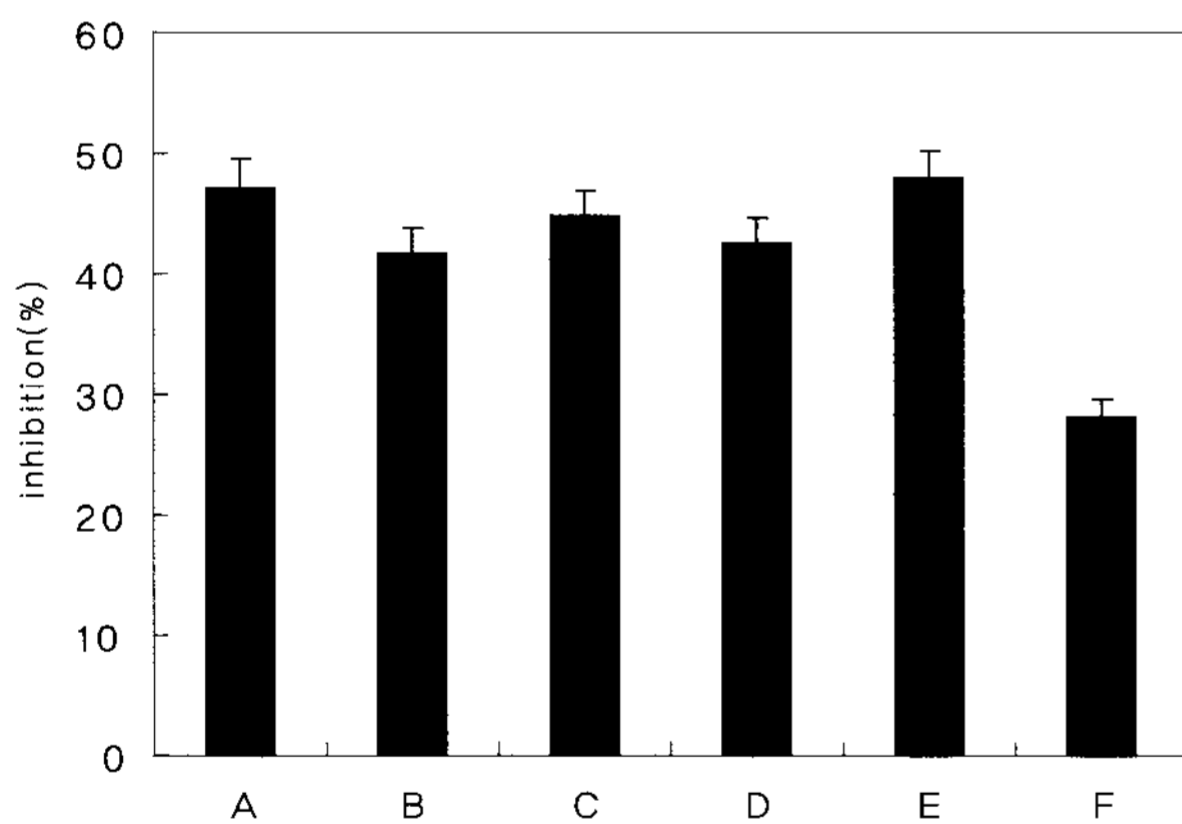
**Figure 1.** Electron donating activities of extracts from mushroom mycelium mixed cultured in synthesis and natural medium. A : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (10% citrus extract media) B : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (PD broth) C : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (10% citrus extract filtration) D : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (YM broth) E : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* + *Sparassia crispa* (10% citrus extract media) BHA : Butylated hydroxyanisole CE : Citrus extract (Negative control) Each value represents the average of three independent experiments.

특히 YM broth 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 혼합배양물, 10% 감귤농축액배지에서 배양된 상황버섯, 운지버섯과 꽃송이버섯 균사체 배양배양물에서 1 mg/ml 일때 80% 이상의 전자공여능을 보였으며 전반적으로 다른 실험구에 비해 높은 전자공여능을 보였다. 10% 감귤농축액배지에서 배양한 상황버섯, 운지버섯과 꽃송이버섯 균사체 배양배양물의 경우 꽃송이버섯의 단독배양물의 경우 선행연구 (Data not shown)에서 전자공여능이 타 버섯균사체에 비해 우수하여 이에 따른 영향에 의한 것이라 사료된다.

이러한 결과는 현재 문제시 되는 합성항산화제의 안전성, 가격, 항산화 활성에 대한 천연항산화제의 개발 가능성이 있으며, 이와 밀접하게 관련되어 있는 질환의 발병을 예방 또는 치료할 수 있는 생리활성물질로서 작용할 가능성이 높다.

**버섯균사체 혼합배양추출물의 항암활성측정**

MTT 정량분석법을 이용하여, 버섯추출물에 대한 항암활성측정 결과 (Fig. 2)에서 볼 수 있듯이 10% 감귤추출물만을 첨가한 실험구보다 모두 높은 항암활성을 나타냈으며, 대체적으로 40%이상의 항암활성을 나타냈다. 특히 A 실험구 (10% 감귤추출물배지에서 혼합 배양된 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물)와 E 실험구 (10% 감귤추출물배지에서 혼합 배양된 상황버섯, 운지버섯과 꽃송이버섯 균사체 배양 추출물)에서 각각 47.2, 47.9%의 가장 좋은 활성을 보였으며, F 대조군 (버섯균사체를 첨가하지 않은 감귤농축액)에 비해서도 약 20%이상의 증가된 항암활성을 나타내었다.



**Figure 2.** antitumor activity of the liquid culture extracts of mushroom mixed mycelium.

- A : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (10% citrus extract media)
- B : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (PD broth)
- C : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (10% citrus extract filtration)
- D : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (YM broth)
- E : *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* + *Sparassia crispera* (10% citrus extract media)
- F : 10% Citrus

Each value represents the average of three independent experiments.

본 항암실험은 감귤 농축액을 첨가하여 배양된 버섯균사체 추출물이 합성배지에서 배양된 버섯균사체 추출물보다 모두 높은 항암 억제활성을 나타냈는데 이것은 Lee et al.(15)의 결과에서도 일반 합성배지에서 운지 버섯을 배양했을 때 보다 감귤 희석 농축액에서 배양했을 때 항산화 효과, 아질 산소거능 및 항암효과가 현저히 상승하다는 결과보고와도

상당히 일치하는 경향이 있음을 알 수 있다. 또한 *Phellinus* 속의 상황버섯 (*P. linteus*)은 항-종양 및 기타 의학적 활용 가능성 때문에 많은 연구가 이루어지고 있는 버섯으로서 상황버섯 자실체로부터 정제된 활성 polysaccharide는 체액성 및 세포성 면역, 항-종양, 항-돌연변이 및 항-혈관신생 활성을 보인다고 알려져 있다는 Oh et al.(22) 연구내용과도 상당히 일치한다고 볼 수 있다.

결과적으로 감귤농축액 첨가배지 자체 또는 일반 합성배지에서 상황버섯, 운지버섯, 꽃송이버섯을 혼합 배양했을 때 보다 감귤농축액 첨가배지에서 혼합 배양 하였을 때 항암효과가 상승함을 알 수 있었다.

**요 약**

버섯 균사체 혼합배양액을 이용하여 어류질병세균에 대한 항균 및, 항산화활성, 그리고 인체 암세포에 대한 항암 활성을 조사하였다. 항균활성 측정 결과 대부분의 시료에서 항균활성이 있는 것으로 나타났다. 그 중 YM broth에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물이 가장 높은 활성을 띄었지만 10% 감귤추출물배지에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물 또한 비교적 활성이 높아 합성배지가 고가임을 고려할 때 의의가 있다고 생각된다. 항산화 활성의 측정결과 10% 감귤추출물배지에서 배양한 상황버섯, 운지버섯, 꽃송이버섯 균사체 배양 추출물과 PD broth에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물의 경우 1 mg/ml에서 90%에 가까운 라디칼 소거활성을 보였다. 항암활성 측정결과 10% 감귤추출액만을 첨가한 대조군보다 모든 실험구가 높은 활성을 나타냈으며 특히 10% 감귤추출물배지에서 배양한 상황버섯, 운지버섯 배양 추출액과 10% 감귤추출물배지에서 배양한 상황버섯, 운지버섯, 꽃송이버섯 균사체 배양 추출액이 높은 활성을 나타냈다. 이러한 다양한 생리활성을 측정된 결과 최종적으로 감귤농축액이 첨가된 버섯균사체 배양 추출물들의 활성이 가장 좋은 것으로 나타났으며, 감귤의 천연배지로서의 이용가능성을 확인할 수 있었다. 따라서 감귤농축액 및 버섯균사체 혼합 배양을 이용한 다양한 사료첨가제 및 신소재의 개발이 가능할 것이다.

**감 사**

본 연구는 2006년도 산업자원부의 지역산업기술개발사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

**REFERENCES**

1. Yu, H. E., S. M. Cho, G. S. Seo, B. S. Lee, D. H. Lee, and J. S. Lee (2006), Screening of bioactive compounds from mushroom *Pholiota* sp. *Kor. J. Mycol.* **34**(1), 15-21.
2. Lee, T. S. (1990), The full list of recoded mushroom in Korea, *Kor. J. Mycol.* **18**, 233-259.

3. Ahn, D. K. (1992), Medicinal Fungi in Korea, *Kor. J. Mycol.* **20**, 154-166.
4. Lucas, E. H., Ringle, R. U., Clarke, D. A., Reilly, H. C., Stevens, J. A., and Stock, C. C. (1957), Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other *Holobasidiomycetes*, *Antibiot Chemotherapy* **7**, 1-4.
5. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, A., and Fukuoka, F. (1970), Fractionation and purification of the polysaccharides with made antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk) Sing (an edible mushroom), *Res. Cancer* **30**, 2776-2781.
6. Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F., and Ishida, N. (1978), Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, Extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes* L., *Antibiotics* **31**, 1079-1085.
7. Suzuki, S. and Oshima, S. (1976), Influence of Shitake (*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol, *Mushroom Sci.* **9**, 463-467.
8. Hikino, H., Kanno, C., Mirin, Y., and Hayashi, T. (1985), Isolation and hypoglycemic activity of Ganoderans A and B, glycans of Ganoderman lucidum fruit bodies, *Planta. Med.* **51**, 339-340.
9. Lee, J. W., Chung, C. H., Jeong, H. J., and Lee, K. H. (1990), Anticomplementary and antitumor activities of the Ikal, extract from the mycelia of *Lentinus edodes* IY-105, *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* **18**, 571-577.
10. Kim, H. J., Ahn, M. S., Kim, G. H., and Kang, M. H. (2006), Physiological Activity/Nutrition : Antioxidative and Antimicrobial Activities of *Pleurotus eryngii* Extracts Prepared from Different Aerial Part *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**(6), 799-804.
11. Song, C. H., Kim, J. H., Yang, B. K., and Kim, K. W. (1996), Anti-complementary polysaccharides produced from submerged mycelial culture of *Pleurotus sajocaju*. *Korea J Mycology* **24**, 104-110.
12. Jung, I. C., Park, S., Park, K. S., and Ha, C. H. (1996), Antioxidative effect of fruit body and mycelia extracts of *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Food Sci Technol* **28**, 464-469.
13. Pyun, Y. R., Kwon, T. W., and Yu, J. H. (1977), Studies on a Mixed Yeast Culture; Part 1. Interactions in a Mixed Yeast Culture, *Korea J. food sci. technol.* **9**(4), 306~312.
14. Koh, J. S. and S. H. Kim (1995), Physicochemical properties and chemical compositions of Citrus Fruits Produced in Cheju, *Agric. Chem. Biotechnol.* **38**, 541-545.
15. Lee, S. J., S. H. Moon, T. Kim, J. Y. Kim, J. S. Seo, D. S. Kim, J. Kim, Y. J. Kim, and Y. I. Park (2003), Anticancer and antioxidant activities of *Coriolus versicolor* culture extracts cultivated in the citrus extract, *Kor. J. Microbial. Biotechnol.* **31**(4), 362-367.
16. Song, E. Y., Y. H. Choi, K. H. Kang, and J. S. Koh (1998), Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of Cheju Citrus Fruits according to harvest date, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**, 306-312.
17. Bios, M. S. (1958), Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **25**, 1199-1120.
18. Chung, Y. C., C. T. Chang, W. W. Chao, and S. T. Chou (2002), Antioxidative activity and safety of the 50% ethanol extract from red bean fermented *Bacillus subtilis* IMR-NK 1, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2454-2458.
19. Charmichael, J., Degeaff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Michell, J. B. (1987), Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing, *Cancer. Res.* **47**, 936-942.
20. Oh, H. S. and W. B. Park *et al.* (2003), Antimicrobial Activity of Extracts from Citrus Seeds, *Korean J Culinary Research* **9**(4), 69-80.
21. Lee, J. H. and S. R. Lee (1994), Some Physiological Activity of Phenolic Substances in Plant Foods, *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**(3), 317-323.
22. Oh, I. S. and H. G. Kim (2006). Effect of *Phellinus* Extracts on Sprouting in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Korean J. Biotechnology. Bioeng.* **21**(4), 292-297.