

건조 방법에 따른 표고버섯의 항산화능과 항유전독성 효과

김민정 · 추원미 · 박은주[†]

경남대학교 식품영양학과

Antioxidant and Antigenotoxic Effects of Shiitake Mushrooms Affected by Different Drying Methods

Min-Jung Kim, Won-Mi Chu, and EunJu Park[†]

Dept. of Food and Nutrition, Kyungnam University, Gyeongnam 631-701, Korea

Abstract

Shiitake mushroom (SM; *Lentinus edodes*) are cultivated and consumed in many Asian countries including Vietnam, China, Japan, Korea, and Thailand. In Asia, SM are mainly dried and used as flavoring. The aim of this study was to compare the effects of SM created with different drying processes, such as oven-dried and sun-dried, on the antioxidative and antigenotoxic effects. Raw and dried SM were extracted with acetone, ethanol, methanol, and hot water. The antioxidant effects of SM were evaluated by determining total phenolic content, DPPH radical scavenging activity (RSA), an ORAC assay, and a cellular antioxidant capacity (CAC) assay. The inhibitory effect of SM on oxidative stress-induced DNA damage in human leukocytes was evaluated by a Comet assay. The total phenolic content of raw SM extracted with methanol and of that extracted with water were significantly higher than the dried SM. Among the water extracts, the IC₅₀ for DPPH RSA of raw and sun-dried SM were significantly higher than that of oven-dried SM. Sun-dried SM showed the most potent ORAC value at 50 g/mL. The CAC against AAPH⁺ induced oxidative stress in HepG2 cells, and H₂O₂ induced DNA damage were effectively protected against by all SM extracts. These results suggest that unprocessed SM are the best antioxidants, and that the sun-dried method would be the best option to use in terms of antioxidant activity and the antigenotoxic effect.

Key words: Shiitake mushroom, drying method, antioxidant, antigenotoxic effect

서 론

버섯류는 분류학적으로 포자를 만들기 위해 자실체를 형성하는 고등균류로 담자균 또는 자낭균에 속한다. 버섯은 독특한 풍미와 질감뿐만 아니라 탄수화물, 단백질, 무기질 및 비타민 등의 영양소를 함유하고 있어 예로부터 식용 및 약용으로 이용되어 왔다(1). 버섯류는 phenolic compounds, polyketides, terpenes, steroids 등과 같은 2차 대사산물을 축적하며, 특히 버섯류에서 얻어지는 phenolic compounds는 뛰어난 항산화효과를 나타내며 그 함량에 따라 항산화 활성이 농도 의존적으로 증가한다(2). 버섯류가 암, 뇌졸중, 심장질환 및 당뇨병 등의 만성 퇴행성 질환을 예방하고 개선한다는 보고에 따라 버섯류에 대한 관심이 고조되었다(3). 더불어 버섯류 중 담자균류에서 발견되는 면역증강물질인 단백질 결합 다당체 또한 free radical 제거 활성이 있는 것으로 알려져 있다(4,5).

표고버섯(Shiitake mushroom; SM, *Lentinus edodes*)은 담자균강 주름버섯목 느타리과 잣버섯속에 속하는 식용버

섯으로 주로 한국, 중국, 일본 및 동남아시아에서 재배되고 소비된다(6). 또한 표고버섯은 양송이버섯에 이어 세계에서 두 번째로 많이 재배되어 세계 총 버섯 생산량의 25%를 차지하며 다른 버섯류에 비해 그 생산이 빠르게 증가하고 있다(7,8). 표고버섯은 버섯 중 비타민 C의 함량이 가장 많으며 맛과 향기 성분으로 각각 guanosine 5'-monophosphate(5'-GMP)와 lenthionine을 함유하고 있고 각종 아미노산과 ergosterol 또한 많이 함유하고 있다(9). 이 밖에도 표고버섯에는 혈액 중의 콜레스테롤을 감소시키는 물질인 lentinacin(eritadenine)이 있으며, 특히 표고버섯의 자실체로부터 분리된 β-1,3-glucan인 lentinan은 sarcoma 180 암세포의 증식을 억제하는 활성이 보고되었다(10).

한편, 호기성 생명체에서 산소는 생체 내 필요한 에너지를 만드는 과정에서 중요한 역할을 하지만 이들 산소 중 일부(약 2~3%)는 자유 라디칼 반응에 의해 superoxide anion radical(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂), hydroxyl radical(OH·), peroxy radical(ROO·) 등을 포함한 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 전환된다(11). 정상 상

[†]Corresponding author. E-mail: pej@kyungnam.ac.kr
Phone: 82-55-249-2218, Fax: 82-55-244-6504

태에서 세포는 활성 산소의 유리기를 제거하는 항산화 방어 시스템을 지니고 있다. 그러나 활성 산소종의 과잉 축적은 생체 내 항산화 방어 시스템의 산화 환원 항상성을 깨뜨려 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발시킨다(12). 이러한 산화적 스트레스는 암을 비롯한 염증, 동맥경화 등과 같은 각종 질병의 원인으로 알려져 있다. 활성 산소종의 원인이 되는 흡연, 음주, 격렬한 운동, 스트레스, 각종 환경오염물질, 약물 등에 과도하게 노출되어 현대인에게는 산화적 스트레스를 경감시킬 수 있는 항산화제가 필수적이다.

수확 직후의 표고버섯은 수분 함량이 70~95%로 높고 조직이 연하여 신선한 상태를 장기간 유지하기가 어려워 주로 건조 상태로 저장·유통된다. 전통적인 표고버섯의 건조법은 일광을 이용하였으나 건조 기간 동안 일기에 크게 영향을 받을 뿐 아니라 시간과 노력이 많이 소요되므로 최근에는 건조기를 이용한 화력건조법이 주를 이루고 있다. 일반적으로 식품을 건조하면 식품의 색, 질감, 영양 성분 및 생리활성 정도에 변화를 초래한다(13). 건조에 따른 식품의 항산화 활성 변화에 대한 연구로는 키페이어 원적외선 건조기를 이용한 표고버섯의 건조 및 항산화 특성(14), 빨강 피망 건조 시 색깔과 항산화 활성의 변화(15), 일광건조 한 나이지리아 잎채소의 ascorbic acid, 총 페놀함량 및 항산화 활성의 변화(16), 고구마의 항산화 특성에 있어서 건조 가공의 효과(17) 등이 보고된 바 있다. 그러나 표고버섯 저장을 위해서는 건조과정이 필수적이며 대부분의 표고버섯이 건조 상태로 소비자에게 유통됨에도 불구하고 현재까지의 연구는 주로 생 표고버섯의 성분이나 생리활성에 집중되고 있는 실정이다. 더욱이 생 표고버섯과 건조기를 이용하여 건조한 표고버섯 및 일광을 이용하여 건조한 표고버섯의 다각적인 항산화 활성과 항 유전독성을 비교 조사한 연구는 지금까지 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 생 표고버섯과 오븐건조 및 일광건조 한 표고버섯을 세 가지 유기용매(acetone, ethanol, methanol)와 물로 추출한 후 총 폴리페놀 함량을 비롯하여 항산화 활성 및 항 유전독성을 비교 분석하여 건조 방법에 따른 변화를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 표고버섯은 2010년 7월에 경남 창원시 L마트에서 구입하여 사용하였다. 항산화력 측정에 사용된 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), gallic acid, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), histopaque 1077, fluorescein 등은 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 총 페놀 함량 측정에 사용된 Folin-Ciocalteu 시약과 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)에서 구입하

였다. 그 외 ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate(EDTA), dimethyl sulfoxide(DMSO) 등을 비롯한 기타 시약 및 용매는 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

시료의 추출

잘게 자른 생 표고버섯을 5 g씩 나누어 용기에 담은 후 실험용 건조기(Drying oven DDO-102, Daeil scientific, Busan, Korea)와 일광을 이용하여 건조시켰다. 작은 크기의 표고버섯을 자르지 않고 60°C, 상대습도 30%의 환경에서 건조하였을 때 건조 표고버섯의 관행 함수율 13%까지 도달하는데 13시간이 소요되었고, 30°C의 환경에서는 상대습도와 관계없이 24시간 안에 함수율 13%에 도달하지 못하였다는 Seo 등(18)의 연구에 따라 실험용 건조기에서는 50°C에서 13시간 건조하였으며 일광에서는 여름이라는 계절을 고려하여 낮 시간 동안 3일 건조하였다. 생 표고와 건조한 표고버섯에 100 mL의 유기용매(acetone, ethanol, methanol)를 각각 가하여 상온에서 3일 동안 추출하였으며, 90°C의 물 100 mL로써 3시간 추출하였다. 각각의 추출물은 여과지(Whatman No. 1, Tokyo, Japan)로 감압여과한 후, 유기용매 추출물은 회전진공농축기(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 37°C에서 농축하였으며, 물 추출한 시료는 Freeze Dryer(FD 5512, Ilshinlab Co., Yangju, Korea)로 동결 건조하였다. 각 농축물은 50 mg/mL의 농도로 DMSO에 녹여 -20°C에서 보관하면서 적당한 농도로 희석해서 실험에 사용하였다. ORAC value 측정 시에는 DMSO에 녹인 각 시료를 phosphate buffer로 희석하여 사용하였다. 물 추출하여 동결 건조한 시료의 총 페놀 함량 측정 시에는 시료를 50 mg/mL의 농도로 3차 증류수에 용해시켜 사용하였다.

총 페놀 함량

총 페놀 함량은 분석방법으로 널리 사용되고 있는 Folin-Denis 방법(19)으로 측정하였다. 즉, 시료 1 mL를 취하여 D.W 1 mL를 가하여 희석하고 1 N Folin-Ciocalteu 시약 2 mL를 가하여 실온에서 3분간 방치한 후, 10% Na₂CO₃용액 2 mL를 가하여 이 혼합액을 1시간 동안 상온에서 방치하였다. 이 혼합물에서 200 µL를 취하여 ELISA reader(Sunrise, Tecan Co. Ltd., Salzburg, Austria)를 사용하여 690 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 mg/100 g gallic acid equivalents (GAE) 단위로 나타내었다. 각 시료에 대한 실험은 최소 3회 반복 실험하였다.

DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 Mensor 등(20)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 80 µL의 0.2 mM DPPH 에탄올 용액을 농도별 시료 20 µL에 가한 후 10초 동안 잘 혼합해 주고 상온에서 10분간 반응시켜 ELISA reader를 사용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 무처리구에는 20 µL의 DMSO로 처리하여 흡광도를 측정하였다. 각 표고버섯 시료 자체의

흡광도를 희석용매인 DMSO를 가하여 측정하여 시료 자체 색의 간섭효과를 보정하였다. 각 시료의 DPPH radical 소거능은 아래의 식에 의해 계산하였으며, 각 용매별로 DPPH radical을 50% 저해하는 농도인 IC₅₀(half maximal inhibitory concentration)을 구하였다. 각 시료에 대한 실험은 최소 3회 반복 실험하였다.

Radical scavenging activity (RSA, %)=(1-A/B)×100
A: 시료 첨가구의 흡광도, B: 무처리구의 흡광도

Oxygen radical absorbance capacity(ORAC assay) 측정

건조 방법에 따른 표고버섯 추출물에 대하여 ORAC assay를 이용한 항산화 활성 측정은 Kurihara 등(21)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, peroxy radical generator로 AAPH를 사용하여 최종 반응 농도가 20 nM이 되도록 처리하였다. 형광 물질인 fluorescein의 최종 반응 농도는 40 nM이며, 최종 반응 농도 1 μM의 trolox를 control standard로 사용하였다. AAPH는 매일 신선하게 제조하여 실험에 사용하였다. Free radical에 의한 fluorescein의 감소는 Tecan GENios multi-functional plate reader(GENios; Tecan Trading AG, Salzburg, Austria)를 이용하여 excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 매 2분마다 2시간 동안 측정하였다. 표고버섯 추출물의 ORAC value는 각 시료의 형광이 감소하는 곡선 아래 부분의 총면적(net area under the curve)을 산출하여 1 μM trolox equivalents(TE)로 나타내었으며 각 시료에 대한 실험은 최소 3회 반복 실험하였다.

Net area under the curve: net AUC=AUC_{sample}-AUC_{blank}
ORAC value=net AUC_{sample}/net AUC_{trolox}

HepG2 세포배양

HepG2(ATCC 8065, human liver adenocarcinoma cell-line) 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. HepG2 세포는 비활성화한 Fetal Bovine Serum(FBS) 10%와 1% 항생제(Penicillin/Streptomycin)를 함유하는 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 환경의 incubator에서 배양하였다.

MTT 분석을 통한 생존률 측정

표고버섯 추출물에 대한 HepG2 세포의 생존율을 측정하기 위하여 MTT reduction assay를 실시하였다. 96-well plate에 HepG2 세포수를 5×10⁵ cells/mL로 계산하고 96-well plate에 100 μL씩 가하여 37°C, 5% CO₂의 incubator에서 배양하였다. 24시간 후 DMSO에 녹인 시료를 최종농도가 100 μg/mL이 되도록 well에 처리하였다. 37°C에서 4시간 배양하고 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT(5 mg/mL) 용액을 10 μL씩 첨가하여 다시 1시간 동안 배양하였다. Formazan 형성을 확인한 후, 배지를 조심스럽게 제거하고 100 μL의 DMSO를 첨가하여 well 바닥에 형성된 formazan

을 용해시켜 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표고버섯 추출물을 처리하지 않고 배양시킨 대조군 세포를 100%로 하여 상대적인 세포 생존율을 산출하였다. 각 시료에 대한 실험은 최소 3회 반복 실험하였다.

Cellular antioxidant capacity(CAC) assay

살아 있는 세포 내에서 표고버섯 시료의 항산화 활성을 검색하기 위해 HepG2 세포를 이용하여 CAC assay를 실시하였다. CAC assay는 DCFH-DA method(22)를 변형하여 측정하였다. 즉, 96-well plate에 HepG2 세포수를 5×10⁵ cells/mL로 계산하여 96-well plate(655090, Greiner, Frick-enhausen, Germany)에 100 μL씩 가하여 37°C, 5% CO₂의 incubator에서 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 형광에 안정한 Hank's balanced salt solution(HBSS)을 각 well에 200 μL 분주한 후 최종농도가 100 μg/mL가 되도록 각 시료 2 μL를 처리하여 30분 동안 배양하였다. HBSS 50 μL로 각 well을 세척하고 다시 HBSS 200 μL 분주한 후 peroxy radical generator로 8 mM AAPH 2 μL를 가하여 30분 동안 배양하였다. 이때 AAPH는 매일 신선하게 제조하여 사용하였다. 형광 probe로 40 mM DCFH-DA 2 μL를 가한 후 빛을 차단하여 30분 동안 배양한 후 Tecan GENios multi-functional plate reader를 이용하여 excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 형광의 발생 정도를 측정하였다. Control은 DCFH-DA만을 처리하였으며, AAPH와 DCFH-DA를 처리하여 positive control로 하였다. Control의 형광값을 100%로 하여 각 시료와 AAPH의 상대적인 형광값을 비교하였다. 각 시료에 대한 실험은 최소 3회 반복 실험하였다.

혈액 내 백혈구 세포 분리

건강한 성인남성으로부터 채혈한 신선한 전혈을 histopaque 1077을 이용해 백혈구만을 분리해 낸 후 본 실험에 사용하였다.

시료의 처리 및 산화적 스트레스 유발

분리해 놓은 백혈구에 DMSO로 희석한 각 추출물을 50 μg/mL의 농도로 처리하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 백혈구를 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후 인위적으로 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 200 μM의 H₂O₂를 백혈구에 처리하여 4°C에 5분간 반응시킨 다음 다시 PBS로 세척하였다. Positive control을 위해 표고버섯 시료 대신 용매인 DMSO를 처리한 후 200 μM H₂O₂를 처리하였고, negative control인 용매(DMSO) 처리 세포에는 H₂O₂를 처리하지 않았다.

DNA 손상 측정(Comet assay)

DNA 손상의 측정은 Singh 등(23)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 반응을 끝낸 백혈구를 75 μL의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 후, 1.0% normal melting agar-

ose(NMA)가 precoating된 normal slide 위로 cell suspension과 low melting agarose(LMA)의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 µL로 중층하였다. 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris)에 사용 직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 DNA의 double strand를 풀어 주었다. Lysis가 끝난 후, slide를 electrophoresis tank에 배열하고 4°C의 차가운 전기영동 buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA, pH>13)를 채워 20분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300±3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 전기영동 tank를 어두운 천으로 덮은 채 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M tris buffer(pH 7.4)에 5분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하고 에탄올로 slide를 건조시켰다. 20 µg/mL 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 cover glass로 덮은 뒤(LEICA DMLB, Wetzlar, Germany) CCD camera(Nikon, Tokyo, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image를 comet image analyzing system(Komet version 5.0, Kinetic Imaging, Liverpool, UK)을 통해 분석하였다. 백혈구의 hydrogen peroxide에 의한 DNA 손상 및 각 추출물에 의한 손상억제 정도는 핵으로부터 이동해서 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분 내 DNA %함량(% Tail DNA)을 측정하여 나타내었다. 각각의 처리구에서 2개의 slide를 만들어 각각 100개 세포의 DNA 손상 정도를 측정하고 각 처리구는 최소 3회 반복 실험하였다.

통계처리

모든 데이터의 통계처리는 각 항목에 따라 SPSS/Windows 12.0(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였고 평균과 표준편차를 구하여 신뢰수준 95%($p < 0.05$)에서 평균값들에 대해 유의성을 검증하였다. 각 항목은 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

총 페놀 함량

생 표고버섯과 오븐건조 및 일광건조 한 표고버섯의 총 페놀 함량을 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 아세톤과 에탄올 추출물에서는 일광건조 한 표고버섯의 총 페놀 함량이 각각 58.6 mg/100g GAE와 44.0 mg/100g GAE로서 생 표고나 오븐건조 한 표고버섯의 함량보다 유의적으로 높았다. Springob 등(24)은 식물에 UV-C light를 처리하면 플라보노이드 생합성의 첫 단계를 촉매 하는 효소인 chalcone synthase를 활성화시킨다고 보고하였다. 이로 미루어 일광건조

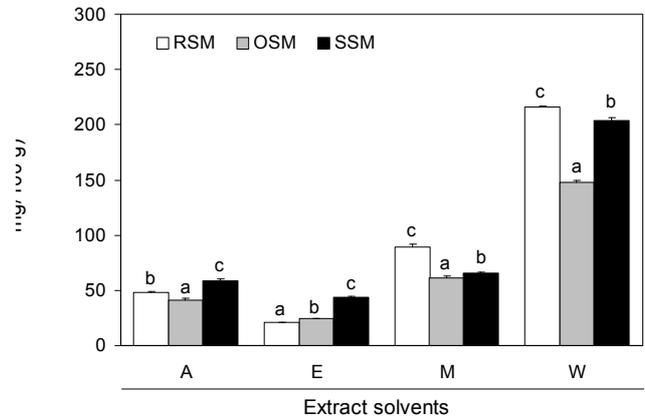


Fig. 1. Total phenolic content of extracts from shiitake mushroom by different drying methods when extracted various solvents. A: acetone, E: ethanol, M: methanol, W: water. RSM: raw shiitake mushroom, OSM: oven-dried shiitake mushroom, SSM: sun-dried shiitake mushroom. Values are mean with standard deviation. Values not sharing the same letter (a-c) are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

과정에서 표고버섯이 완전히 건조되기 전에 자외선에 의해 약간의 플라보노이드가 생합성된 것이라 추측할 수 있다. 반면 메탄올과 물 추출물의 경우에는 일광건조 한 표고버섯의 총 페놀 함량이 오븐건조 한 표고버섯에 비해 유의적으로 높긴 하나 생 표고에 비해서는 유의적으로 낮은 결과를 보였다. 이는 추출 용매의 차이로 보인다. 물 추출한 표고버섯 시료의 총 페놀은 유기용매로 추출한 시료보다 최소 2배 이상 월등히 높은 함량을 나타내었다(RSM: 216.3 mg/100 g GAE, OSM: 147.9 mg/100 g GAE, SSM: 203.9 mg/100 g GAE). Cheung 등(25)은 식품 속의 페놀 성분은 극성 용매에서 더 높은 추출수율을 얻을 수 있다고 하였으며, Choi 등(26)은 121°C에서 10~30분 열처리를 한 표고버섯 시료의 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량이 전체적으로 증가하였다고 보고하였다. 열처리는 세포벽을 파괴하여 페놀 성분과 플라보노이드가 좀 더 쉽게 분리되도록 한다(27). 물은 극성이 강한 용매이며 본 실험의 물 추출 조건이 90°C 3시간이므로 추출 시 총 페놀 성분의 용출이 증가한 것으로 사료된다.

DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능 측정법은 적은 양의 시료만으로도 빠르고 간단하게 시료의 항산화 활성을 측정할 수 있는 방법으로 널리 사용되고 있다(28). 짙은 보라색의 DPPH radical은 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 매우 빠른 속도로 비가역적으로 환원되어 색이 없어지는 특징을 가진다(29). 생 표고버섯과 오븐건조 및 일광건조 한 표고버섯의 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과를 IC₅₀으로 Fig. 2에 나타내었다. IC₅₀은 DPPH 라디칼을 50% 저해하는 시료의 농도로서 값이 낮을수록 활성이 좋은 것을 의미한다. 생 표고버섯의 IC₅₀ 값은 아세톤에서 1789.1 µg/mL, 에탄올에서 1696.1 µg/mL, 메탄올에서 3922.6 µg/mL, 물에서 3306.5 µg/mL로 모든 용

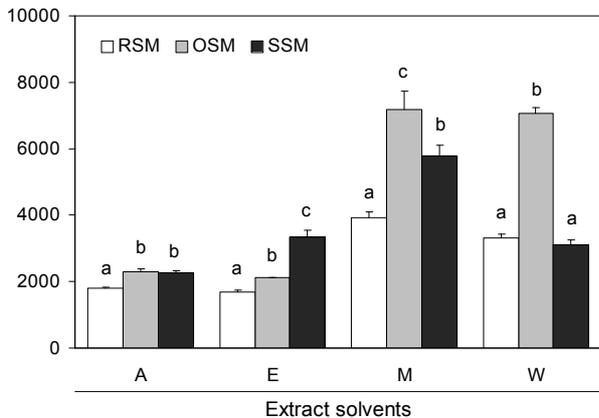


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity, expressed by IC₅₀, of extracts from shiitake mushroom by different drying methods when extracted various solvents. A: acetone, E: ethanol, M: methanol, W: water. RSM: raw shiitake mushroom, OSM: oven-dried shiitake mushroom, SSM: sun-dried shiitake mushroom. Values are mean with standard deviation. Values not sharing the same letter (a-c) are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

매추출에서 유의적으로 가장 낮은 값을 나타내었으며 특히 일광건조 시료는 물 추출에서 생 표고 물 추출물과 거의 비슷한 활성(3097.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 보였다. 오븐건조 표고버섯의 경우 메탄올과 물추출에서 각각 7174.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 7059.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었다. Kang 등(30)은 생 표고버섯보다는 건조 표고버섯의 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능이 훨씬 우수하다고 보고하였는데 이는 본 실험의 결과와는 대조를 이룬다. 총 페놀 함량은 DPPH 라디칼 소거능에 중요한 역할을 한다고 보고되어진다(31). 그러나 본 연구에서는 총 페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능 간에 상관관계는 보이지 않았다. 이는 추출 용매별로 페놀 화합물 외에 용출되는 성분이 다르며 이에 따라 페놀 성분 이외의 다른 항산화 활성 물질이 DPPH 라디칼을 소거하는 데 작용하였을 것으로 사료된다.

Oxygen radical absorbance capacity(ORAC)

ORAC assay는 측정 방법이 간단하고 재현성이 뛰어나 제1회 International Congress on Antioxidant Method에서 승인받은 것으로 AAPH로부터 유도된 peroxy radical에 대한 항산화능을 측정하는 방법이다. Fig. 3에 생 표고버섯과 오븐건조 및 일광건조 한 표고버섯의 ORAC 값을 제시하였다. 거의 모든 시료에서 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 측정했을 때 농도 의존적인 결과를 나타내었다(data not shown). 각 시료 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 ORAC value를 비교했을 때 아세톤 추출물에서 생 표고버섯 시료가 2.6 μM TE로 가장 높았고 에탄올 추출물에서는 일광건조 시료가 각각 3.4 μM TE로 가장 높았다. 메탄올과 물 추출물에서는 일광건조 시료가 각각 3.0 μM TE와 3.2 μM TE로 가장 높은 활성을 보였다. 이로써 peroxy radical에 대한 ORAC 활성이 오븐건조 한 표고버섯보다 생 표고나 일광건조 한 표

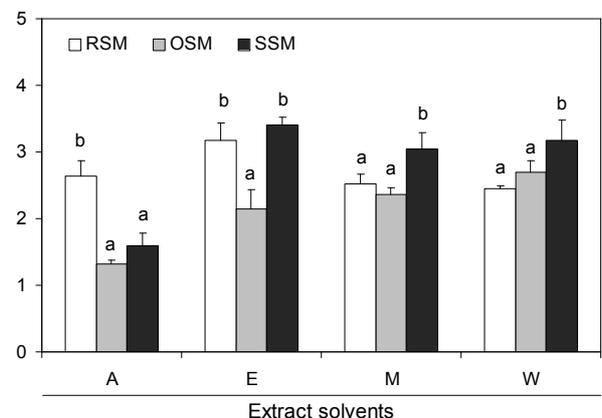


Fig. 3. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) values of extracts from shiitake mushroom (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) by different drying methods when extracted various solvents. A: acetone, E: ethanol, M: methanol, W: water. RSM: raw shiitake mushroom, OSM: oven-dried shiitake mushroom, SSM: sun-dried shiitake mushroom. Values are mean with standard deviation. Values not sharing the same letter (a,b) are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

고버섯이 더 뛰어난 것을 알 수 있었다. 식품 건조 시 높은 온도는 카라멜화, 마이야르 반응, 효소반응, 색소의 분해 및 ascorbic acid의 산화로 인해 그 생성물의 품질이 저하된다(32). 오븐건조 한 표고버섯의 peroxy radical 소거능이 낮았던 것은 일광에 비해 높은 온도에서 건조됨으로 인해 ascorbic acid를 비롯한 표고버섯의 항산화 물질의 활성이 저하된 것으로 보인다. 다수의 연구 보고에서 총 페놀 함량과 ORAC value 간의 뚜렷한 상관관계를 보고하였으나(33), 본 연구에서는 상관관계가 나타나지 않았다. 또한 DPPH 라디칼 소거능과도 다른 경향을 보이는데 이는 각 실험에 사용되는 라디칼이 서로 다르며 이를 저해하는 활성을 가진 물질들의 용출도 각 시료마다 차이가 있는 것으로 사료된다.

Cellular antioxidant capacity(CAC)

CAC assay는 살아있는 세포 내의 활성 산소종의 양을 형광으로 측정하는 방법으로 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) probe를 이용하는 실험 방법이다. DCFH-DA는 세포막을 통과할 때 세포막의 esterase에 의해 DCFH로 전환되며 세포 내에 활성 산소종 존재 시 형광을 발하는 DCF로 전환된다. 시료의 항산화 활성이 클수록 AAPH로 유도된 peroxy radical을 소거하여 측정되는 형광값이 작아진다. CAC assay의 적합성을 위해서는 실험에 사용하는 cell line이 시료로 인해 생존율이 감소하지 않아야 한다. 세포독성으로 인해 세포가 사멸된다면 줄어든 세포수로 인해 형광값이 감소하게 되어 시료의 항산화 활성이 높은 결과로 오인될 수 있기 때문이다. 따라서 각 표고버섯의 CAC를 측정하기에 앞서, MTT assay를 실시하여 HepG2 세포의 생존율을 측정하였다. CAC assay와 같은 농도(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 실시하였을 때 세포 생존율이 80% 이상으로 시료에 의한 세포 독성은 나타나지 않았다(data not shown). Fig. 4에서 보

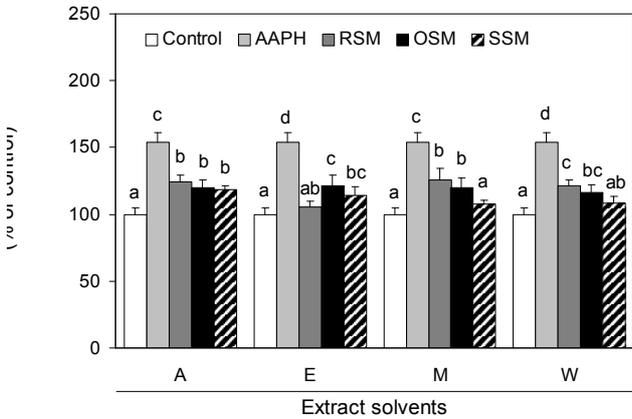


Fig. 4. Protective effect of extracts from shiitake mushroom by different drying methods when extracted various solvents against AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cells. A: acetone, E: ethanol, M: methanol, W: water. RSM: raw shiitake mushroom, OSM: oven-dried shiitake mushroom, SSM: sun-dried shiitake mushroom. Values are mean with standard deviation. Values not sharing the same letter (a-d) are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

이듯이 control을 100%로 했을 때 모든 표고버섯 추출물이 positive control인 AAPH에 비해 낮은 형광값을 보이며 CAC 활성을 나타내었다. 일광건조 한 표고버섯의 활성이 두드러지게 가장 높은 활성을 보였는데 특히 메탄올과 물 추출 시료에서는 각각 107.5%와 108.1%로 AAPH를 처리하지 않은 control과 비슷한 값을 나타내었다. 이는 일광건조 표고버섯에서 추출된 항산화 물질이 AAPH에 의해 발생된 peroxy radical에 대한 저해능이 상당히 크거나 세포막 투과성이 좋은 것을 의미한다고 할 수 있다. Kim 등(34)은 citrus hydroxyflavanone의 CAC 활성을 실험한 결과 glycoside 형태보다 aglycone 형태가 세포막을 잘 침투한다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 일광건조 표고버섯의 어떠한 성분으로 인해 항산화 활성이 증가하였는지 확인할 수 없다. 따라서 향후 생 표고와 오븐건조 및 일광건조 표고버섯 추출물

의 주요한 성분 분석과 그에 따른 DPPH 라디칼 소거능 및 ORAC assay 등 다양한 항산화 활성에 대한 추가적인 연구를 수행하여야 할 것이다.

DNA 손상에 미치는 표고버섯 추출물의 효과

Comet assay는 1984년 Ostling과 Johanson(35)에 의해 개발된 micro gel electrophoresis 방법으로 인체에 유해한 독성물질에 의한 DNA 손상정도를 간단하고 빠르게 측정하여 유전 독성의 발생 여부를 알아내는 좋은 도구로 이용된다. 이러한 점에서 comet assay는 산화적 스트레스로부터 DNA를 보호하는 항산화제 효과에 대한 연구에 적합한 방법이다. Comet assay를 이용하여 H_2O_2 에 의해 유도된 백혈구의 손상 정도를 형광현미경상에서 관찰한 결과와 각 표고버섯 추출물의 H_2O_2 에 의한 산화적 DNA 손상 억제 효과 실험의 결과는 Fig. 5와 Fig. 6에 제시하였다. 분리된 백혈구에 각 표고버섯 추출물을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 후 DNA 손상을 인위적으로 유도하기 위해 200 μM 의 H_2O_2 를 처리하였다. DNA가 손상되면 전기영동에 의해 혜성(comet)과 같은 꼬리 모양을 형성한다. 손상된 DNA tail의 DNA 함량을 측정한 결과 모든 표고버섯 추출물이 H_2O_2 만을 처리한 양성 대조구(positive control)에 비해 DNA 손상에 대한 보호 효과를 나타내었다. 특히 생 표고버섯의 항 유전독성 효과는 아세톤에서 8.9%, 에탄올에서 8.5%, 메탄올에서 11.1%, 물에서 8.3%로 건조 표고버섯에 비해 뛰어났다.

버섯을 일광건조하면 건조과정 중에 기후의 영향을 크게 받으며 안전저장 수분함량까지 건조하는 데 시간과 노력이 많이 소요된다. 또한 건조과정 중에 포자의 비산 및 조직의 교질화가 발생할 수 있으며, 곤충의 피해와 미생물의 오염 등으로 변질되기 쉽다는 단점이 있다(36). 반면 버섯을 건조기를 이용하여 건조할 경우 건조시간이 짧고 간편하며 균일하게 건조가 되지만 빠른 수분손실로 인해 수축현상, 표면경화 현상, 건조물의 낮은 복원력, 조직감을 비롯한 맛 및 영양

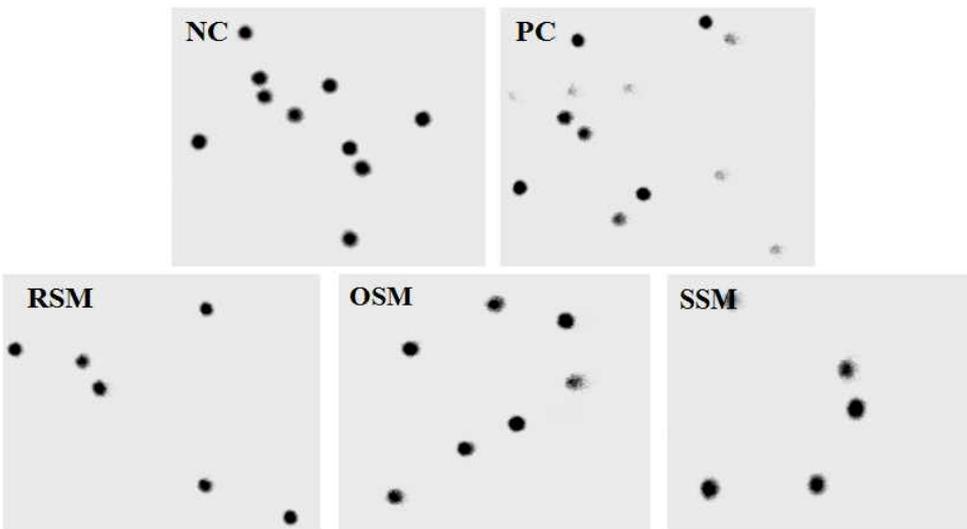


Fig. 5. Comet images of human leukocytes. NC: negative control, PC: 200 μM H_2O_2 -treated positive control, RSM: raw shiitake mushroom water extract 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 200 μM H_2O_2 , OSM: oven-dried shiitake mushroom water extract 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 200 μM H_2O_2 , SSM: sun-dried shiitake mushroom water extract 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 200 μM H_2O_2 .

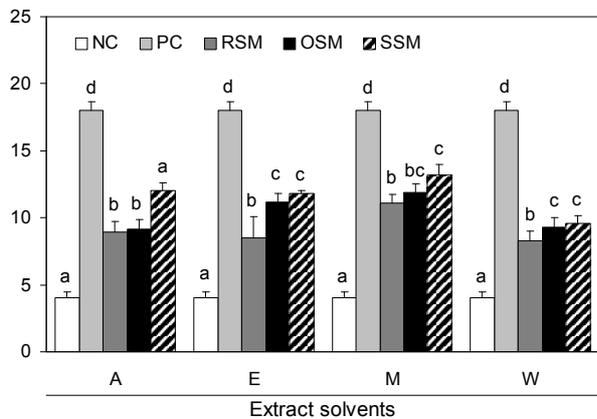


Fig. 6. Effect of supplementation *in vitro* with 50 µg/mL of shiitake mushroom on H₂O₂-induced DNA damage in human leukocytes. A: acetone, E: ethanol, M: methanol, W: water. NC: DMSO-treated normal control, PC: 200 µM H₂O₂-treated positive control, RSM: raw shiitake mushroom, OSM: oven-dried shiitake mushroom, SSM: sun-dried shiitake mushroom. Values are mean with standard deviation. Values not sharing the same letter (a-d) are significantly different from one another (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

성분 감소 등의 문제점이 발생된다(37). 생 표고와 오븐건조 및 일광건조 표고버섯의 항산화효과와 항 유전 독성을 살펴본 결과 표고버섯을 식품으로 섭취 시 생 표고를 이용하면 항산화 효과와 더불어 항 유전독성 효과를 기대할 수 있으며 부득이 저장을 위해 건조를 한다면 일광을 이용하는 것이 높은 페놀 함량과 항산화 활성을 기대할 수 있을 것이다. 또한 물 추출 시료의 활성이 높았던 점을 감안하면 전통 한국 식단에 있어 빠질 수 없는 국물 요리에 표고버섯을 사용하거나 건조 표고버섯을 불릴 때 이용한 물을 버리지 않고 활용한다면 건강에 이로움을 줄 수 있을 것이다.

요 약

생 표고버섯을 5 g씩 나누어 실험용 건조기와 일광을 이용하여 건조한 후 100 mL의 유기용매(acetone, ethanol, methanol)와 90°C의 물 100 mL로써 추출하였다. 총 페놀 함량을 측정하고 농축 또는 동결 건조하여 DMSO에 녹인 후 적당한 농도로 희석하여 DPPH 라디칼 소거능, ORAC value 및 CAC 등의 항산화 활성을 측정하였으며 comet assay를 이용하여 항 유전독성을 조사하였다. 그 결과, 아세트산과 에탄올 추출물에서 일광건조 한 표고버섯의 총 페놀 함량이 생 표고나 오븐건조 한 표고의 함량보다 유의적으로 높았으며 물 추출한 표고버섯 시료의 총 페놀이 유기용매로 추출한 시료보다 최소 2배 이상 월등히 높은 함량을 나타내었다. IC₅₀으로 나타낸 표고버섯의 DPPH 라디칼 소거능은 생 표고버섯이 모든 용매에서 유의적으로 가장 낮은 값을 나타내었으며, 특히 물 추출에서는 일광건조 시료가 생 표고와 거의 비슷한 활성을 보였다. AAPH로 유도된 peroxy radical 소거능은 50 µg/mL 농도에서 오븐건조 한 표고버섯보다 생

표고나 일광건조 한 표고버섯이 더 뛰어난 것을 알 수 있었다. HepG2 cell을 이용하여 세포 내에서의 peroxy radical에 대한 항산화 활성 검색에서는 시료의 최종농도를 100 µg/mL로 처리했을 때 일광건조 한 표고버섯의 활성이 두드러지게 높은 활성을 보였으며 특히 메탄올과 물 추출 시료에서 각각 107.5%와 108.1%로 AAPH를 처리하지 않은 control과 비슷한 값을 나타내었다. 또한 comet assay에서는 표고버섯 추출물을 50 µg/mL의 농도로 백혈구에 처리한 후 H₂O₂ 200 µM의 농도로 처리하여 DNA 손상을 유도한 결과 모든 표고버섯 추출물이 H₂O₂만을 처리한 positive control에 비해 DNA 손상에 대한 보호 효과를 나타내었으며 특히 생 표고버섯의 항 유전독성 효과가 건조 표고버섯에 비해 뛰어났다. 총 페놀 함량과 항산화 활성 및 항 유전독성 활성 간에 상관관계는 나타나지 않았다. 이는 페놀 화합물 외에 표고버섯에 함유되어 있는 여러 가지 다른 생리활성 물질이 건조 조건에 따라 각각 다른 용매에 용출되어 작용한 것으로 사료되며 이에 대하여 앞으로 더욱 심도 있는 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다. 결론적으로 표고버섯을 식품으로 섭취 시 생 표고를 이용하며 장기간 보존을 위해 건조를 한다면 일광을 이용하는 것이 높은 페놀 함량과 항산화 활성을 기대할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 경남대학교 학술연구장려금의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Yim SB, Kim MO, Koo SJ. 1991. Determination of dietary fiber contents in mushrooms. *Korean J Soc Food Sci* 7: 69-76.
2. Ishikawa Y, Morimoto K, Hamasaki T. 1984. Flavoglaucin, a metabolite of *Eurotium chevalieri*, its antioxidation and synergism with tocopherol. *J Am Oil Chem Soc* 61: 1864-1868.
3. Kim GJ, Kim HS, Chung SY. 1992. Effects of varied mushroom on lipid compositions in dietary hypercholesterolemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 21: 131-135.
4. Kurashige S, Akuzawa Y, Endo F. 1997. Effects of *Lentinus edodes*, *Griñola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* administration on cancer outbreak, and activities of macrophages and lymphocytes in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N-butanolnitrosoamine. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 19: 175-183.
5. Kim BK, Shin GG, Jeong BS, Cha JY. 2001. Cholesterol-lowering effect of mushrooms powder in hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 510-515.
6. Sung JM, Yoo YB, Cha DR. 1998. *Mushroom science*. Kyo-haksa, Seoul. Korea. p 64.
7. Chang ST. 1999. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. *Int J Med Mushrooms* 1: 291-300.

8. Chang HW, Lee C. 2008. *Medicinal mushrooms for good health*. Munyeimadang, Seoul, Korea. p 25.
9. Choi MY, Jung TY, Hahm KJ. 1995. Cytotoxic effects of hot water soluble polysaccharides from mushroom. *Lentinus edodes* and vitamin A & E supplementation against P₃₈₈ cells. *Kor J Nutr* 28: 1091-1099.
10. Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, Sasaki T, Fukuoka F. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* 222: 687-688.
11. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14.
12. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922.
13. Stapelfeldt H, Nielsen BR, Skibsted LH. 1997. Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. *Int Dairy J* 7: 331-339.
14. Li H, Choi YM, Lee JS, Park JS, Yeon KS, Han CS. 2007. Drying and antioxidant characteristics of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom in conveyer-type far-infrared dryer. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 250-254.
15. Arslan D, Özcan MM. 2011. Dehydration of red bell-pepper (*Capsicum annuum* L.): change in drying behavior, color and antioxidant content. *Food Bioprod Process* 89: 504-513.
16. Oboh G, Akindahunsi AA. 2004. Change in the ascorbic acid, total phenol and antioxidant activity of sun-dried commonly consumed green leafy vegetables in Nigeria. *Nutr Health* 18: 29-36.
17. Yang J, Chen JF, Zhao YY, Mao LC. 2010. Effect of drying processes on the antioxidant properties in sweet potatoes. *Agric Sci China* 9: 1522-1529.
18. Seo JS, Kang SK, Choi BM. 1997. Drying characteristics and content change of major components of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Korean J Post-harvest Sci Technol Agric Products* 4: 279-286.
19. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-249.
20. Mensor LL, Menezes FS, Leitao GG, Reis AS, Santos TC, Coube CS, Leitao SG. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res* 15: 127-130.
21. Kurihara H, Fukami H, Asami S, Totoda Y, Nakai M, Shibata H, Yao XS. 2004. Effects of oolong tea on plasma antioxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *Biol Pharm Bull* 27: 1093-1098.
22. Lautraite S, Bigot-Lasserre D, Bars R, Carmichael N. 2003. Optimization of cell-based assays for medium through screening of oxidative stress. *Toxicol* 7: 207-220.
23. Singh PN, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
24. Springob J, Nakajima JI, Yamazaki M, Saito K. 2003. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat Prod Rep* 20: 288-303.
25. Cheung LM, Cheung Peter CK, Ooi Vincent EC. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem* 81: 249-255.
26. Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compound of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 99: 381-387.
27. Peleg H, Naim M, Rouseff RL, Zehavi U. 1991. Distribution of bound and free polyphenolic acids in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruit (*Citrus paradisi*). *J Sci Food Agric* 57: 417-426.
28. Shi J, Gong J, Liu J, Wu X, Zhang Y. 2009. Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. *J Food Sci Technol* 42: 477-482.
29. Wisanu T, Boonsom L, Saisunee L. 2009. Flow injection analysis of total curcuminoids in turmeric and antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Food Chem* 112: 494-499.
30. Kang MY, Kim SY, Yun HJ, Nam SH. 2004. Antioxidant activity of extracts from browned oak mushroom (*Lentinus edodes*) with unmarketable quality. *Kor J Food Sci Technol* 36: 648-654.
31. Siddhuraju P, Mohan PS, Becker K. 2002. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers, and fruit pulp. *Food Chem* 79: 61-67.
32. Perez-GiAlves A, Hornero-Mendez D, Minguez-Mosquera MI. 2005. Dependence of carotenoid content and temperature-time regimes during the traditional slow drying of red pepper for paprika production at La Vera county. *Eur Food Res Technol* 221: 645-652.
33. Ronald LP, Xianli W, Karen S. 2005. Standardized method for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.
34. Kim GN, Jung HM, Jang HD. 2008. Structure-activity relationship of citrus hydroxyflavanone glycosides and their aglycones against oxidative damage in HepG2 cells. *J Clin Biochem Nutr* 43: 508-511.
35. Ostling O, Johanson KJ. 1984. Microgel electrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298.
36. Jin CF. 2004. Drying characteristics of oak mushroom using stationery far infrared dryer. *MS Thesis*. Chungbuk National University, Chungju, Korea.
37. Holdsworth SD. 1971. Dehydration of food products. *J Food Technol* 6: 331-336.

(2012년 4월 9일 접수; 2012년 5월 8일 채택)