

## Antioxidant activity of extracts with extraction methods from *Phellinus linteus* mycelium on *Mori ramulus*

Hye-Mi Park, Joo-Heon Hong\*

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

### 추출 방법에 따른 상지에 배양한 상황버섯 균사체 추출물의 항산화 활성

박혜미 · 홍주헌\*

대구가톨릭대학교 식품공학전공

#### Abstract

This study was conducted to examine the antioxidant activities of extracts derived with different extraction methods (HE, hot water extraction; UE, ultrasonic extraction; and PE, pressured extraction) from *Phellinus linteus* mycelium in *Mori ramulus*. The extraction yield of PE (7.73%) was higher than that of UE (6.03%) and of HE (5.44%). The total phenolic and flavonoid contents of PE were 9.87 g/100 g and 1.90 g/100 g, respectively. The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of PE (769.63  $\mu\text{M/g}$  FW) was higher than that of HE (622.96  $\mu\text{M/g}$  FW) and of UE (249.06  $\mu\text{M/g}$  FW). The DPPH and ABTS radical scavenging activities of PE at 1,000  $\mu\text{g/mL}$  were 35.85% and 51.42%, respectively. The superoxide radical scavenging activity of PE, 29.16-93.89%, was higher than that of other extracts. The ferric-reducing antioxidant power and the reducing power of PE were 180.60-607.93  $\mu\text{M}$  and 0.14-0.51, respectively. The tyrosinase inhibition activity of PE (9.66-24.05%) improved with an increase in the treatment concentration. The antioxidant and tyrosinase inhibition activities of PE were significantly higher than those of the other extracts. In conclusion, we provided experimental evidence that *Phellinus linteus* mycelium extracts from *Mori ramulus* have potential as functional materials.

**Key words :** *Phellinus linteus* mycelium, *Mori ramulus*, pressured extraction, antioxidant activity, tyrosinase inhibition activity

#### 서 론

인간은 호흡과정에서 노화 및 질병의 원인이 되는 활성 산소종(ROS, reaction oxygen species) 또는 활성질소종(RNS, reaction nitrogen species)의 과도한 발생으로 항산화 방어계(antioxidant defense system) 사이에 심각한 불균형을 초래하여 산화적 스트레스(oxidative stress)를 일으키고 각종 질환의 발생과 진행기전에 악영향을 미치는 것으로 알려져 있다(1). 이러한 자유라디칼은 비공유 전자(unpaired electron)를 갖고 있는 분자이기 때문에 불안정하여 세포구성 성분들과 쉽게 반응하게 되고 지질 과산화, 단백질 변성 또는 불활성화, DNA 합성 억제, 돌연변이 유발, 암의 유발

그리고 효소의 불활성 등을 초래한다(2). 인체는 체내 산화를 방어할 수 있는 다양한 항산화 물질을 생성하여 항산화성을 유지하지만, 체내 항산화 체계는 다량의 산화물을 모두 방어할 수 없으므로 항산화제를 추가 섭취하여 체내 산화를 막는 것은 노화방지 및 질병 예방에 매우 중요하다(3).

버섯류는 phenolic compounds, polyketides, terpenes, steroids 등과 같은 2차 대사산물을 축적하고, 특히 버섯류에서 얻어지는 phenolic compounds는 뛰어난 항산화효과를 나타내며 그 함량에 따라 항산화 활성이 농도 의존적으로 증가한다(4). 버섯류가 암, 뇌졸중, 심장질환 및 당뇨병 등의 만성 퇴행성 질환을 예방하고 개선한다는 보고에 따라 버섯류에 대한 관심이 고조되었다(5). 버섯류의 균사체에는 자실체보다 각종 영양소가 4배 정도 더 함유되어 있으며, 특히 균사체는 항암성분, 면역기능강화성분 등의 약용성분이 자실체보다 50~60배 정도 더 들어있다는 연구도 보고되고

\*Corresponding author. E-mail : jhhong@cu.ac.kr  
Phone : 82-53-850-3218, Fax : 82-53-850-3218

있다(6). 버섯균사체를 이용한 기술이 발달하여 버섯균사체 혼합 배양 추출물의 항균, 항산화 및 항암활성(7), 상황버섯 균사체 배양 쌀(6), 상황버섯균사체 배양액에 침지한 발아현미(8) 및 상황버섯 균사체 배양 수삼(9) 등 균사체를 이용한 상황버섯 기능 연구가 진행되고 있다.

상황버섯(*Phellinus linteus*)은 분류학적으로 소나무 비늘버섯과(*Hymenochaetaceae*) 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색부후균으로 이와 유사한 종류로는 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*), 말뚝진흙버섯(*Phellinus isnarius*), 찰진흙버섯(*Phellinus robustus*), 검은진흙버섯(*Phellinus nigricans*), 낙엽송충버섯(*Phellinus pini*) 등이 있다(10). 상황버섯의 자실체 열수 추출물은 소화기계통의 암에 저지효과가 있다고 알려지면서 많은 연구가 진행되어 항암활성(11) 및 대장암과 방광암 등의 원인효소인 장내세균 유해효소 저해효과(12) 등 상황버섯의 다양한 생리활성이 보고되고 있다. 상지(桑枝, *Mori ramulus*)는 뽕나무과(*Moraceae*)에 속하는 낙엽교목인 뽕나무(*Morus alba* L.)의 어린가지로 늦은 봄과 초여름에 절취하여 쇠건한 것으로 눈상지, 상조 등의 이명이 있다(13). 일반적으로 상황버섯의 재배는 뽕나무 원목을 절단하여 살균시킨 후 절단면 위에 상황버섯 종균을 접종하여 약 1~3개월 동안 균사배양공정을 거친 뒤, 종균을 제거하여 토양에 심어 약 15~20일 동안 자실체를 형성시켜 인공 재배한다.

본 연구에서는 뽕나무의 어린가지인 상지를 분쇄하여 톱밥 형태로 가공하여 살균한 뒤, 상황버섯 종균을 접종하여 배양한 균사체를 이용하였다. 그리고 상지에 배양된 상황버섯 균사체에 함유된 유용성분을 효율적으로 추출하고자 열수, 초음파 및 가압추출공정을 적용하였으며, 추출물의 항산화 활성을 조사하여 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 상황버섯 균사체(*Phellinus linteus* mycelium)는 경북 안동 소재의 (주)류충현약용버섯에서 제공받아 이용하였다. 즉, 균사체의 배양은 상지(桑枝, *Mori ramulus*)를 음지에서 자연건조하여 수분이 30~40% 일 때 절단 및 분쇄한 뒤, 121°C, 1.2기압에서 1시간 고압 살균한 다음 고체배지로 사용하였다. 상지 고체배지에 액체 종균 5%를 접종하고 25°C에서 15일간 정지 배양하여 상황버섯 균사체를 얻었으며, 균사체는 50°C에서 24시간 열풍건조하였고, 분쇄기(FM-909W, Hanil, Co., Sejong, Korea)로 분쇄하여 -20°C 이하의 암소에 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다.

### 추출물의 제조

추출물의 제조는 열수추출(HE, hot water extraction), 초음파추출(UE, ultrasonic extraction) 및 가압추출(PE, pressured extraction) 방법으로 30 g의 상황버섯 균사체 분말에 증류수를 고형분 대비 20배 첨가하여 아래와 같이 추출하였다.

열수추출은 100°C에서 3시간 동안 환류냉각추출기(CA-1112, Eyela Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 추출하였고 초음파추출은 ultrasonic processor(VCX 400, Sonic & Materials Inc., Connecticut, USA)를 이용하여 25°C, 40 kHz, 400 W에서 3시간 동안 추출하였다. 또한, 가압추출은 121°C, 1.2기압에서 3시간 동안 추출하였다. 각각의 추출물은 불순물을 제거하기 위하여 여과지(No.1, Whatman International Ltd., Leicestershire, England)를 이용하여 여과시켰다. 여과된 용액은 감압농축기(N-1N, Eyela Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 감압농축한 뒤, 동결건조(FreeZone 2.5, Labconco Co., Kansas, MO, USA)하여 -70°C 이하의 암소에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

### 추출수율, 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량

추출수율은 각각의 추출액을 동결건조 시켜서 건물 중량을 구한 다음 추출액 조제에 사용한 원료 건물량에 대한 백분율로 나타내었다.

총 페놀 함량은 Folin-Denis법(14)에 따라 시료 1 mL에 1 N Folin ciocalteu reagent 1 mL를 혼합하여 반응시킨 후 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL를 첨가하고 실온의 암소에서 30분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Amersham Co., Uppsala, Sweden)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 tannic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

총 플라보노이드 함량은 Jia 등(15)의 방법을 응용하여 측정하였다. 시료 1 mL에 5% NaNO<sub>2</sub> 150 µL를 혼합하여 실온에서 6분간 반응시킨 후 10% AlCl<sub>3</sub> 300 µL를 첨가하고 실온에서 5분간 반응시킨 다음 1 N NaOH 1 mL와 혼합한 후 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 rutin(Sigma-Aldrich Co.)을 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

### ORAC(oxygen radical absorbance capacity) 측정

ORAC 측정은 Talcott와 Lee(16)가 항산화 활성 측정에 사용한 분석법을 이용하였다. 본 균사체 동결건조 분말 및 Trolox를 농도별로 희석하였는데 실험용 시료의 제조에는 중성 phosphate buffer(61.6:38.9, v/v, 0.75 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.75 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)를 사용하였다. 검량 곡선을 작성하기 위하여 항산화 활성 비교 표준액으로 Trolox(Water soluble analogue of vitamin E, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-

2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich Co.) 10  $\mu$ L를 phosphate buffer 50 mL에 용해하여 제조하였고, 측정기기는 Multilabel Plate Readers(VICTOR<sup>3</sup>, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 485 nm에서 전자가 여기되고 538 nm에서 방출되게 조절하여 본 실험에 적용되었다.

#### DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical 소거활성 측정(17)은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)의 환원력을 이용하여 측정하였다. 즉, 시료 0.5 mL에  $4 \times 10^{-4}$  M DPPH용액(99.9% ethyl alcohol에 용해) 5 mL를 혼합하여 실온에서 15분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

#### ABTS radical 소거활성 측정

ABTS radical 소거활성(18)은 7.4 mM 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS, Sigma-Aldrich Co.)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS<sup>+</sup> 라디칼을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이  $0.70 \pm 0.02$ 이 되게 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)으로 희석하였다. 희석된 용액 180  $\mu$ L에 시료 20  $\mu$ L를 혼합하여 정확히 1분간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

#### Superoxide radical 소거활성 측정

Superoxide radical 소거활성은 Nishikimi(19)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료 500  $\mu$ L에 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.5) 100  $\mu$ L, 100  $\mu$ M PMS 200  $\mu$ L를 혼합하여 반응시킨 후 500  $\mu$ M NBT 200  $\mu$ L 및 500  $\mu$ M NADH 400  $\mu$ L를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide radical 소거활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{Superoxide radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

#### FRAP(ferric reducing antioxidant power) 측정

FRAP 측정은 Benzie와 Strain(20)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. FRAP reagent는 25 mL acetate buffer(300 mM, pH 3.6)를 37°C에서 가온한 후, 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma-Aldrich Co.) 2.5 mL와 20 mM ferric chloride( $\text{FeCl}_3$ ) 2.5 mL를 첨가하여 제조하였다. 시료 30  $\mu$ L에 제조된 FRAP reagent 900  $\mu$ L와 증류수 90  $\mu$ L를 넣은 후 37°C에서 10분간 반응시킨 후 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP는  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich Co.)을 정량하여 작성한 표준 곡선으로부터 계산하였다.

#### 환원력 측정

환원력 측정은 Oyaizu 등(21)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료 1 mL에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6) 2.5 mL와 1% potassium ferricyanide 용액 2.5 mL를 가한 후 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 10% trichloroacetic acid 용액 2.5 mL를 가한 후 원심분리한 뒤, 상등액 2.5 mL에 증류수 2.5 mL와 0.1%  $\text{FeCl}_3$ 용액 0.5 mL를 가한 후 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성은 Kameyama 등(22)의 방법을 응용하여 96 well plate에 시료 100  $\mu$ L, 0.175 M phosphate buffer(pH 6.8) 40  $\mu$ L, 5 mM L-DOPA 40  $\mu$ L를 순서대로 넣고 mushroom tyrosinase(2,000 U/mL, Sigma-Aldrich Co.) 20  $\mu$ L를 첨가하여 37°C 배양기에서 10분 동안 반응시킨 후 생성된 DOPA chrome을 microplate reader(UVM-340, ASYS Co., Eugendorf, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{Tyrosinase inhibition activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

#### 통계처리

실험결과는 3회 반복실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었고 SPSS(19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였고 각 측정 평균값의 유의성( $p < 0.05$ )은 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 추출수율, 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 ORAC

추출 방법에 따른 상지에 배양한 상황버섯 균사체 추출물의 추출수율, 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 ORAC은 Table 1과 같다. 추출수율은 열수추출(HE, hot water extraction), 초음파추출(UE, ultrasonic extraction) 및 가압추출(PE, pressured extraction)에서 각각 5.44%, 6.03% 및 7.73%로 추출 공정에 따라 유의적인 차이를 나타내었으며, 가압추출, 초음파추출, 열수추출 순이었다. 가압추출 시 높은 수율을 나타내는 것은 열과 압력에 의해서 불용성 성분들이 가용화 됨에 따라 용출이 용이하게 된 것이라 판단되며, 이는 Han 등(23)의 고압 추출공정이 길어짐에 따라 수율 또한 증가한다는 보고와 일치하였다. 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 PE에서 100g 당 각각 9.87 g 및 1.90 g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, UE에서 100g 당 각각 3.18 g 및 1.03 g으로 가장 낮은 함량을 나타내었다. 페놀화합물은 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화 활성 등의 생리활성기능을 가지는 것으로 알려져 있어(24), 추출물에 함유된 페놀성 화합물의 함량이 높은 PE에서 높은 항산화 활성을 나타낼 것이라 판단된다. Hong 등(25)은 상황버섯 균사체 열수 및 80% 에탄올 추출물의 총 페놀 함량을 조사한 결과 각각 0.66 mg/mL 및 0.69 mg/mL 함량을 나타내었으며, 총 플라보노이드 함량은 열수추출물이 0.22 mg/mL 였고 80% 에탄올추출물에서 0.16 mg/mL 였다고 보고하였다. Lee 등(26)은 상황버섯 자실체 열수 및 80% 에탄올 추출물의 총 페놀 함량을 조사한 결과 각각 4.02 mg/100mL 및 28.36 mg/100mL 함량을 나타낸다고 보고하여 상황버섯 균사체가 자실체보다 낮은 총 페놀 및 총 플라보노이드를 함유하고 있음을 알 수 있었다. 본 연구의 상지에 배양한 상황버섯 균사체 추출물을 Hong 등(25)의 상황버섯 균사체 추출물과 같은 농도에서 비교하였을 때, PE에서 9.868 mg/mL의 총 페놀을 함유하고 있어 상황버섯 고체배양에 따른 배지의 종류에 따라 유용성분의 차이가 있음을 확인하였다. ORAC(oxygen radical absorbance capacity) assay는 측정 방법이 간단하고 재현성이 뛰어나 폭넓게 활용되고 있는 방법이다. AAPH(2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride)로부터 유도된 peroxy radical에 대한 소거 활성을 형광도로 측정하며, peroxy radical 손상에 대한 억제 시간과 억제율을 모두 반영하는 측정 방법이다(27). 추출 공정별 상황버섯 균사체 추출물의 ORAC 값은 100 µg/mL의 농도로 측정하였는데 PE에서 g당 769.63 µM로 가장 우수한 값을 나타냈으며, HE 622.96 µM, UE 249.06 µM 순으로 나타났다. 초음파 추출물에서 특히 낮은 값을 나타냈는데, 이는 높은 추출수율에 관계없이 항산화 효과에 관

여도가 높은 총 페놀 및 총 플라보노이드의 함량과 비례하는 것으로 판단된다.

**Table 1. Extraction yield, total phenolic, total flavonoid contents, and ORAC (oxygen radical absorbance capacity) of extracts from *Phellinus linteus* mycelium on *Mori ramulus***

Extraction method <sup>1)</sup>	Yield (dry basis, %)	Total phenolic (TA <sup>2)</sup> g/100g	Total flavonoid (Rutin g/100g)	ORAC (Trolox µM/g FW)
HE	5.44±0.07 <sup>c3)</sup>	8.30±0.14 <sup>b</sup>	1.71±0.09 <sup>b</sup>	622.96±37.41 <sup>b</sup>
UE	6.03±0.14 <sup>b</sup>	3.18±0.05 <sup>c</sup>	1.03±0.20 <sup>b</sup>	249.06±41.59 <sup>c</sup>
PE	7.73±0.11 <sup>a</sup>	9.87±0.16 <sup>a</sup>	1.90±0.08 <sup>a</sup>	769.63±44.77 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>HE, hot water extraction; UE, ultrasonic extraction; PE, pressured extraction.

<sup>2)</sup>TA, tannic acid.

<sup>3)</sup>Means±SD (n=3) within each column(a-c) followed by the same letter are not significantly different (p<0.05).

### DPPH 및 ABTS radical 소거활성

추출 방법에 따른 상황버섯 균사체 추출물의 DPPH 및 ABTS radical 소거활성은 Fig. 1과 같다. 상황버섯 균사체 추출물의 DPPH radical 소거활성은 100~1,000 µg/mL 농도에서 PE가 13.04~35.85%로 가장 높은 활성을 나타내었으며, UE가 6.34~12.91%로 가장 낮은 활성을 나타내었다. Jung 등(8)은 상황버섯균사체 배양액에 침지한 발아현미를 개발하기 위하여 균사체 배양액의 DPPH radical 소거활성을 조사한 결과 약 60% 이상의 소거활성을 나타낸다고 보고하였으며, 상황버섯균사체 배양액 침지 발아현미의 메탄올 추출물은 5 mg/mL에서 65% 이상의 소거활성을 나타낸다고 보고하였다. 또한 Kim 등(28)은 상황버섯 열수 및 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거활성을 조사한 결과 에탄올 추출물과 ascorbic acid의 IC<sub>50</sub>이 295.71 µg/mL 및 120.63 µg/mL인데 반해 열수 추출물의 IC<sub>50</sub>은 947.67 µg/mL로 낮은 항산화 활성을 나타낸다고 하였으며 이러한 결과는 총 페놀 화합물에 기인하는 결과라고 보고 하였는데, 본 연구 결과와 유사한 경향이였다. ABTS radical 소거활성 분석 방법은 극성과 비극성 시료의 항산화 활성을 모두 측정할 수 있어 DPPH radical 소거활성보다 적용범위가 넓다는 특징을 가진다(18). 상황버섯 균사체 추출물의 ABTS radical 소거활성은 모든 시료에서 농도가 증가함에 따라 소거활성이 증가하였으며, 특히 PE 1,000 µg/mL 농도에서는 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid (92.55%)의 약 0.55배의 활성을 나타내었다. 모든 시료에서 ABTS radical 소거활성이 DPPH radical 소거활성에 비하여 높은 활성을 나타내는 것은 radical을 제거하는 기작이 다르고, 기질이 결합하는 정도가 다르다는 점에서 낮은 농도에서도 높은 활성을 나타내는 것으로 판단된다(18).

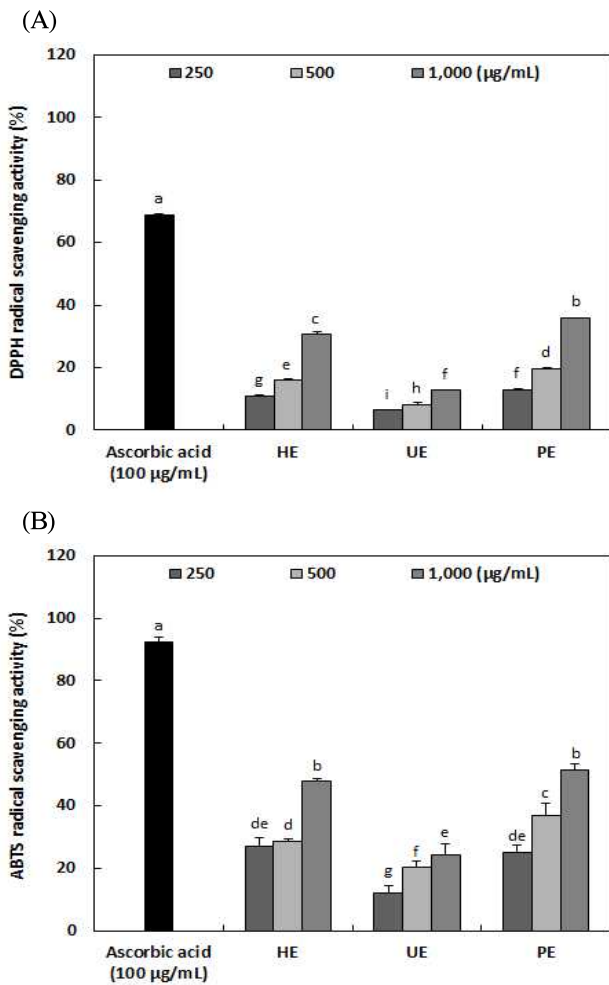


Fig. 1. DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activity of extracts from *Phellinus linteus* mycelium on *Mori ramulus*.

Means±SD (n=3) with different letters above a bar are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

**Superoxide radical 소거활성**

추출 방법에 따른 상지에 배양한 상황버섯 균사체 추출물의 superoxide radical 소거활성은 Fig. 2와 같다. 생체 내에서 다양한 전자전달 시스템에서 발생하는 superoxide radical은 활성 산소종 생성의 주요한 원인인자로 세포와 조직의 손상 및 사멸을 야기시킨다고 알려져 있다(29). 추출 방법별 상황버섯 균사체 추출물의 superoxide radical 소거활성은 모든 시료에서 29.16~96.03%로 높은 소거활성이 나타남을 확인하였다. 특히 모든 시료 500 µg/mL 농도에서는 양성 대조군으로 사용한 catechin (87.02%)보다 높은 활성을 나타내어 상지에 배양한 상황버섯 균사체 추출물의 superoxide radical 소거활성이 우수함을 확인하였다. Rhyu 등(29)은 상황버섯 대비 2배의 열수로 추출한 추출물에 대한 superoxide radical 소거활성을 조사한 결과 5 µg/mL에서 28% 및 10 µg/mL에서 41%로 양성대조군인 ascorbic acid와 유사한 결과를 나타내었으며, 농도의존적으로 높은 활성을

나타낸다고 보고하여 본 연구 결과와 일치하였다. Takashi 등(30)은 총 페놀과 플라보노이드 함량 및 종류에 따라 radical 소거활성에 차이는 있으나 유용성분의 함량이 높을수록 radical 소거활성이 높아진다고 보고하였다.

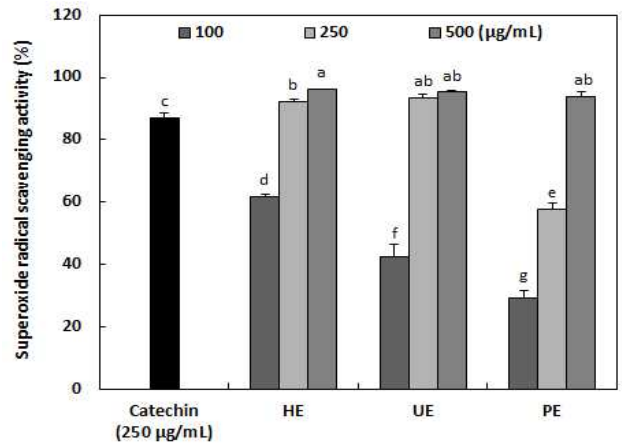


Fig. 2. Superoxide radical scavenging activity of extracts from *Phellinus linteus* mycelium on *Mori ramulus*.

Means±SD (n=3) with different letters above a bar are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

**FRAP 및 환원력**

상황버섯 균사체 추출물의 FRAP(ferric reducing antioxidant power) 및 환원력은 Fig. 3과 같다. 추출 방법에 따른 FRAP는 100~1,000 µg/mL 농도에서 PE가 180.60~607.93 µM로 가장 높은 함량을 나타내었으며, HE 및 UE가 각각 126.39~453.44 µM와 91.78~363.34 µM로 모든 시료에서 농도 의존적으로 증가하였다. 상황버섯 균사체 추출물의 환원력은 1,000 µg/mL에서 PE, HE 및 UE에서 각각 0.51, 0.44 및 0.27로 가압추출에서 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 시료 농도가 증가할수록 환원력도 유의적으로 증가하였으며 FRAP와 유사한 경향을 나타내었다. Kim 등(31)은 버섯 균사체를 달리한 발효가시오가피 추출물의 환원력을 조사한 결과 상황버섯균사체 접종시료 5,000~10,000 µg/mL에서 열수추출물 0.33~0.64, 에탄올추출물 0.29~0.51의 활성을 나타내었다. 발효가시오가피의 항산화활성 결과와 비교할 때 상지에 배양한 상황버섯 균사체 추출물이 보다 높은 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

이와 같이 가압추출에서 항산화활성이 우수한 것은 상지에 배양한 관계로 추출공정을 통해 페놀 및 플라보노이드 등 유용성분의 함량이 증가된 까닭으로 사료되며, 단일 성분이 아닌 추출물임을 고려하였을 때 향후 생리활성 성분의 분리 및 정제를 통한 구조 동정이 요구된다.

**Tyrosinase 소거활성**

추출 방법에 따른 상지에 배양한 상황버섯 균사체 추출물의 tyrosinase 저해활성은 Fig. 4와 같다. 기미 또는 홍반을

일으키는 피부의 멜라닌 생성 과정은 비교적 안정한 물질인 tyrosine에서 출발하는 일련의 산화 중합반응이다. 이 과정에서 tyrosinase가 중요한 역할을 하며, 이 효소의 작용으로 생성되는 중간체인 DOPA chrome을 거쳐 멜라닌 색소로 산화 중합하게 된다. 따라서 tyrosinase 효소의 활성이 저해되거나 그 중간체들의 산화반응이 억제됨으로써 멜라닌 색소가 감소될 것으로 판단된다(32). 상황버섯 균사체 추출물의 tyrosinase 저해활성은 500 µg/mL에서 PE, HE 및 UE가 각각 24.05%, 19.43% 및 13.52%로 가압추출에서 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 시료 농도가 증가할수록 tyrosinase 저해활성도 유의적으로 증가하였으며 이는 다른 항산화 활성 분석 결과와 유사한 경향을 나타내었다. Tyrosinase 저해활성이 높은 천연물질로 알려져 있는 ascorbic acid는 250 µg/mL에서 78% 이상의 높은 활성을 나타내었다. Kim 등(28)은 상황버섯 열수 및 에탄올 추출물

의 tyrosinase 저해활성을 조사한 결과 100~1,000 µg/mL에서 열수 추출물 4.77~10.11%, 에탄올 추출물 10.51~28.09%의 저해활성을 나타냈으며, 농도가 높아짐에 따라 유의적으로 증가하였다고 보고하였다. 따라서 상황버섯 균사체 추출에서는 가압추출 공정이 높은 항산화 활성을 나타냄을 확인할 수 있어 적합한 추출공정이라 판단되었다.

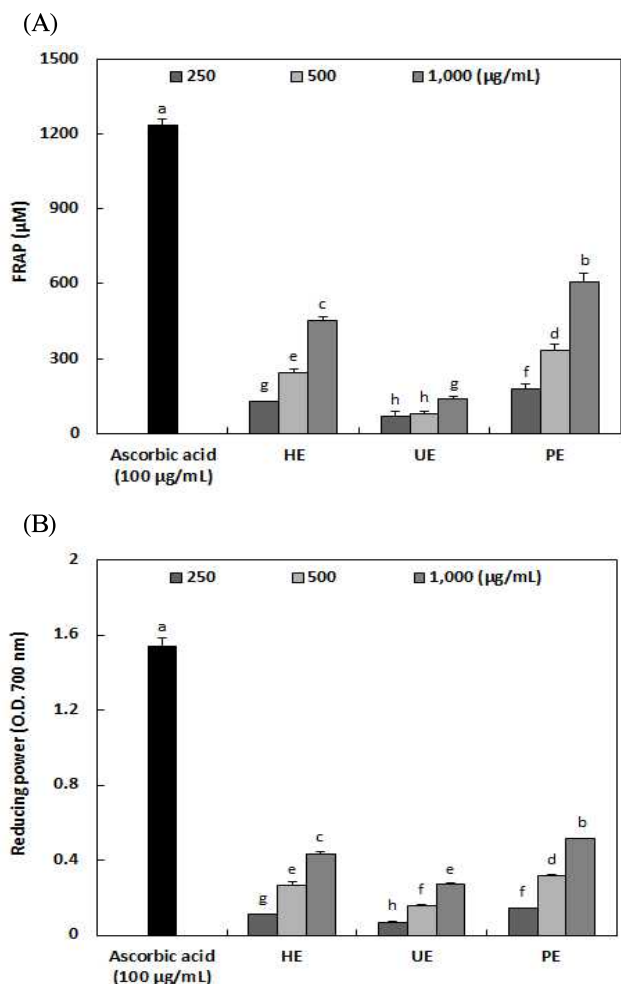


Fig. 3. FRAP (ferric reducing antioxidant power) (A) and Reducing power (B) of extracts from *Phellinus linteus* mycelium on *Mori ramulus*.

Means±SD (n=3) with different letters above a bar are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

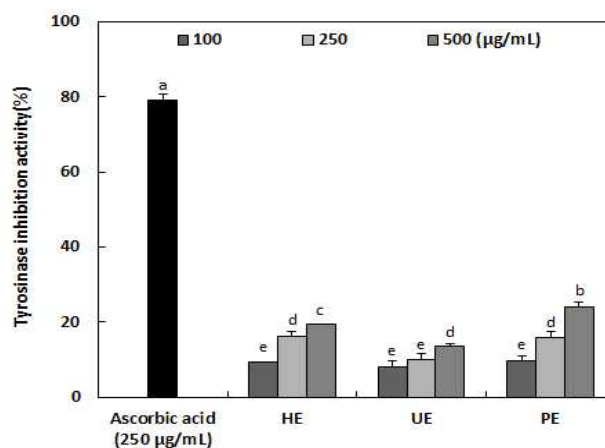


Fig. 4. Tyrosinase inhibition activity of extracts from *Phellinus linteus* mycelium on *Mori ramulus*.

Means±SD (n=3) with different letters above a bar are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

### 요 약

본 연구에서는 추출 방법에 따른 상지에 배양한 상황버섯 균사체 추출물의 항산화 활성을 확인하고자 열수추출, 초음파추출 및 가압추출 방법을 이용하여 항산화 활성 및 tyrosinase 저해활성을 조사하였다. 추출 수율은 가압추출, 초음파추출, 열수추출 순으로 높은 수율을 나타내었으며, 총 페놀함량 및 총 플라보노이드함량은 가압추출에서 100g 당 각각 9.87 g 및 1.90 g으로 높은 함량을 나타내었다. ORAC은 가압추출에서 g당 769.63 µM로 가장 높은 값을 나타내었으며, DPPH 및 ABTS radical 소거활성은 가압추출 1,000 µg/mL에서 각각 35.85% 및 51.42%로 높은 활성을 나타내었다. Superoxide radical 소거활성은 가압추출 100~500 µg/mL에서 29.16~93.89%로 높은 활성을 나타내었다. FRAP 및 환원력은 가압추출 100~1,000 µg/mL에서 180.60~607.93 µM 및 0.14~0.51로 나타나 모든 항산화 활성 분석에서 가압추출이 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. Tyrosinase 저해활성은 가압추출 100~1,000 µg/mL에서 9.66~24.05%로 유의적으로 우수한 활성을 나타내었으며 시료 농도에 따라 농도의존적으로 증가하였다. 따라서 상황버섯 균사체 추출에 있어 항산화 활성을 나타내는 유용성분의 효율적인 추출에 가압추출 공정이 적합하다 판단되었다.

## 감사의 글

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2013년도 산학연협력 기술개발사업(No.C0135499)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

## References

- Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane K, Ghaskadbi S, Lele R (2004) Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*, 52, 794-804
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84
- Woo JH, Shin SL, Chang YD, Lee CH (2010) Antioxidant effect according to extraction method in extracts of *Dendranthema zawadskii* var. *yezoense* and *Cosmos bipinnatus*. *Korean J Hort Sci Technol*, 28, 462-468
- Ishikawa Y, Morimoto K, Hamasaki T (1984) Flavoglucin, a metabolite of *Eurotium chevalieri*, its antioxidation and synergism with tocopherol. *J Am Oil Chem Soc*, 61, 1864-1868
- 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
- Kim HS, You JH, Jo YC, Lee YJ, Park IB, Park JW, Jung MA, Kim YS, Kim SO (2013) Inhibitory effects of *Phellinus linteus* and rice with *Phellinus linteus* mycelium on obesity and diabetes. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 42, 1029-1035
- Kim MC, Kim JS, Heo MS (2008) Antibacterial, antioxidant and antitumor activities of mushroom mycelium mixed culture extracts. *Korean J Biotechnol Bioeng*, 23, 158-163
- Jung IS, Kim YJ, Choi IS, Choi EY, Shin SH, Gal SW, Choi YJ (2007) Studies on antioxidant activity and inhibition of nitric oxide synthesis of germinated brown rice soaked in mycelial culture broth of *Phellinus linteus*. *J Life Sci*, 17, 1141-1146
- Kim H, Yoon HS, Jeong JH, Jeong HS, Hwang JH, Yu KW (2010) Enhancement of immunostimulation by fractionation of active polysaccharide from fermented ginseng with *Phellinus linteus* mycelium in solid culture. *Korean J Food Sci Technol*, 42, 223-232
- Ren G, Liu XY, Zhu HK, Yang SZ, Fu CX (2006) Evaluation of cytotoxic activities of some medicinal polypore fungi from China. *Fitoterapia*, 77, 408-410
- Chung KS, Kim SS, Kim HS, Han MW (1994) Antitumor activity of Kp, a protein-polysaccharide from the mycelial culture of *Phellinus linteus*. *J Pharm Soc Korea*, 38, 158-158
- Kim DH, Choi HJ, Bae EA, Han MJ, Park SY (1998) Effect of artificially cultured *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacterial enzymes and rat intestinal  $\alpha$ -glucosidases. *J Fd Hyg Safety*, 13, 20-23
- The Food and Drug Administration of Republic of Korea (2006) National Standard of Traditional Medicinal(Herbal and Botanical) Materials. Seoul, Republic of Korea, p 209
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult*, 16, 144-158
- Jia Z, Tang M, Wu J (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effect on superoxide radicals. *Food Chem*, 64, 555-559
- Talcott ST, Lee JH (2002) Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *J Agri Food Chem*, 50, 3186-3192
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200
- RE R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*, 26, 1231-1237
- Nishikimi M, Rao NA, Yagi K (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commu*, 46, 849-854
- Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma(FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem*, 230, 70-76
- Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction-antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*, 44, 307-315
- Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishiyama S, Urabe K, Hearing VJ (1993) Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPachrome tautomerase (TRP2), and a melanogenic

- inhibitor. J Invest Dermatol, 100, 126-131
23. Han JG, Ha JH, Choi YB, Go JL, Kang DH, Lee HY (2009) The comparison of extraction process for enhancement of immunomodulating activities of *Ulva pertusa kjellman*. Korean J Food Sci Technol, 41, 380-385
  24. Dural B, Shetty K (2001) The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed anise root extract. J Food Biochem, 25, 361-377
  25. Hong SS, Jung EK, Kim AJ (2013) Quality characteristics of yanggaeng supplemented with sangwang mushroom (*Phellinus linteus*) mycelia. J Korean Diet Assoc, 19, 253-264
  26. Lee KH, Kwon HJ, Chun SS, Kim JH, Cho YJ, Cha WS (2006) Biological activities of extracts from *Phellinus linteus*. J Korean Soc Appl Biol Chem, 49, 298-303
  27. Alarcon E, Campos AM, Edwards AM, Lissi E, Lopez-Alarcon C (2008) Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. Food Chem, 107, 1114-1119
  28. Kim JO, Jung MJ, Choi HJ, Lee JT, Lim AK, Hong JH, Kim DI (2008) Antioxidative and biological activity of hot water and ethanol extracts from *Phellinus linteus*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 684-690
  29. Rhyu DY, King MS, Min OJ, King DW (2008) Antioxidative effects of *Phellinus linteus* extract. Korean J Plank Res, 21, 91-95
  30. Yamada T, Yamamoto M, Tanimar A (1987) Studies on the formation of nitrosamines, 7: The effects of some polyphenols on nitrosation of diethylamine. J Food Hyg Soc Jpn, 19, 224-227
  31. Kim DB, Shin GH, Lee JS, Lee OH, Park IJ, Cho JH (2014) Antioxidant and nitrite scavenging activities of *Acanthopanax senticosus* extract fermented with different mushroom mycelia. Korean J Food Sci Technol, 46, 205-212
  32. Shin JY (2001) Screening of natural products that have activities against skin-aging J Korean Soc Food Sci Nutr, 14, 568-572
- 
- (접수 2014년 6월 10일 수정 2014년 7월 1일 채택 2014년 7월 7일)