

Comparison of Antioxidant Activities of Pileus and Stipe from White Beech Mushrooms (*Hypsizygus marmoreus*)

Su Cheol Kim^{1,2†}, Hyun Sook Kwon^{3†}, Chul Hwan Kim¹, Hye Soo Kim¹, Chang Yun Lee⁴ and Soo Jeong Cho^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongnam National University of Science and Technology, 33 Dongjin-ro, Jinju 52725, Korea

²Amicogen Inc., Jinju 52621, Korea

³National Development Institute of Korean Medicine, Gyeongsan 38540, Korea

⁴SBbio, 19 Donghwa-Road, Maejun-Myun, Cheongdo-Gun 38359, Korea

Received June 27, 2016 / Revised July 19, 2016 / Accepted August 8, 2016

Hypsizygus marmoreus (white cultivar), also called white beech mushrooms, are edible mushrooms commercially cultivated in Korea and Japan. This study was carried out to evaluate the antioxidant properties of *H. marmoreus*. *H. marmoreus* fruit bodies were divided into pileus and stipe. The pileus and stipe were extracted into water and 80% ethanol and their antioxidant activities were analyzed. The total polyphenol content was highest in the water extract (pileus 1137.39±0.38 mg of GAE (gallic acid equivalents)/100 g, stipe 700.86±0.06 mg of GAE/100 g) compared to the ethanol extract (pileus 923.47±0.18 mg of GAE/ 100 g, stipe 324.05±0.03 mg of GAE/100 g). Ethanol extracts from pileus showed better scavenging ability on DPPH (47.32±0.23% at 10 mg/ml) and ABTS (57.33±0.10% at 10 mg/ml) than the stipe and water extract groups. Water extract from pileus were more effective in reducing power and ORAC (oxygen radical absorbance capacity) value than stipe and ethanol extract. The toxicity of water and ethanol extracts was investigated using WST-1 (Water Soluble Tetrazolium salt) assay on the mouse macrophage cell line RAW 264.7. Overall, total polyphenol content and antioxidant activities of extracts from *H. marmoreus* increased in a dose dependent manner while pileus was showed better total polyphenol content and antioxidant activities than stipe.

Key words : Antioxidant property, *Hypsizygus marmoreus* (white cultivar), pileus, stipe, white beech mushroom

서 론

인체는 물질대사와 에너지 생산을 위해 산소를 필요로 하며 이 중 일부는 환원되지 못하고 superoxide (O₂), hydroxyl (OH), hydrogen peroxide (H₂O₂), singlet oxygen (¹O₂) 등의 활성산소(reactive oxygen)가 되며 화학적으로 불안정하고 반응성이 큰 활성산소는 생체 여러 물질과 빠르게 반응하고 체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키거나 암, 뇌졸중, 파킨슨병, 심장질환, 동맥경화, 염증 등의 질병과 노화를 유발할 수 있다[2, 16, 18, 19, 21, 24, 40, 45]. 인체는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) 등의 체내 항산화 효소를 이용하거나

항산화제 섭취를 통한 비효소적인 방법으로 활성산소와 자유라디칼의 연쇄반응을 제어하고 있다[1, 17, 19, 23, 44]. 항산화제에는 ascorbic acid, carotenoid, flavonoid, tocopherol 등의 천연 항산화제와 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tertiary butyl hydroquinone (TBHQ), propyl gallate (PG) 등의 합성 항산화제가 있다. 천연 항산화제는 인체에는 안전하지만 단독으로는 탁월한 효과를 나타내지 못하므로 거의 사용되지 않고 있고 합성 항산화제는 뛰어난 항산화력과 저렴한 가격으로 경제성이 높아 널리 사용되고 있으나 다량 섭취 시 간, 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 부작용이 나타날 수 있기 때문에 안정성이 확보된 천연물 유래 항산화제 개발이 요구되고 있다[5, 11, 14, 37, 44]. 항산화제에 관한 연구는 superoxide dismutase를 발견한 McCord와 Fridovich의 보고(1988)에 의해 시작되었으며[37] 초기에는 식품첨가물로 사용하기 위한 항산화제 개발이 중심이었으나 최근에는 질병과 노화가 활성산소로부터 기인된 것이라는 사실이 알려지면서 노화억제 및 질병치료 효과가 있는 천연물 유래 항산화제 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[20, 21, 45].

버섯은 자실체를 형성하는 담자균과 자낭균에 속하는 고등

† Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3397, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : sjcho@gntech.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

균류로서 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질, 비타민 등의 영양소를 골고루 함유하고 있을 뿐만 아니라 독특한 맛과 향미성분, 약리효과 등을 가지고 있어서 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 왔다[8, 22, 32, 33]. 국내에는 약 1,300여 종의 버섯이 보고되어 있으며 이 중 느티만가닥버섯(*Hypsizygus marmoreus*)은 한국, 일본, 중국 등지의 동아시아와 북유럽에 주로 분포하고 있는 담자균류, 주름버섯목, 송이과에 속하는 식용 버섯으로서 다발성이 강하고 단백질을 구성하는 아미노산 중 정미성분인 글루탐산(glutamic acid)을 많이 함유하고 있다[30, 41]. 느티만가닥버섯은 일본에서 처음으로 인공 재배되었으며 국내에서는 (주)풀무원에서 일본의 타카라주조와 기술 제휴로 2002년부터 시험재배를 시작하였다[27, 47]. 국내에서 재배되고 있는 느티만가닥버섯 품종은 농업기술연구소에서 육성하여 1987년에 보급한 만가닥1호, 1994년에 보급한 만가닥2호 등이 있으며 국내에서는 소량 재배되고 있지만 일본에서는 큰느타리와 함께 많이 소비되는 버섯이다[28]. 최근들어 버섯의 항산화, 항암, 성인병 예방 및 개선, 콜레스테롤 저하 등에 관한 연구결과들이 보고됨에 따라 버섯에 대한 관심이 높아지면서 질병 치료 및 예방에 효과적인 기능성 천연물소재로서 버섯이 주목받고 있으며 버섯의 생리활성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[12, 13, 17, 22, 23, 25, 28, 29, 35]. 느티만가닥버섯의 생리활성으로는 항종양 효과, 항산화 효과, 항동맥경화 효과, 항고혈압성 ACE 저해활성 등이 보고되고 있으며[35, 47], 버섯 부위별 생리활성에 관한 연구는 매우 드문 실정이다[27].

본 연구에서는 흰색 느티만가닥버섯을 갓(pileus)과 대(stipe)로 분리하여 부위별 총 폴리페놀 함량, DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, oxygen radical absorbance capacity (ORAC), 환원력(reducing power), 세포독성 등을 조사함으로써 천연물 유래 항산화 소재로서 흰색 느티만가닥버섯의 부위별 이용 가능성을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 제조

본 실험에 사용한 흰색 느티만가닥버섯은 (주)그린피스에 서 육중한 품종으로 자실체를 갓과 대로 분리한 후 동결건조한 다음 분쇄하여 사용하였다. 분쇄한 갓 부위와 대 부위는 각각 5배(v/v)의 열수와 80% 에탄올에 침지한 후 50°C에서 100 rpm의 조건으로 2시간 동안 3회 반복 추출하였다. 추출물은 whatman filter paper (No. 2)로 여과한 후 회전감압농축기(Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 용매를 완전히 제거한 다음 조추출물의 추출 수율을 구하였다. 열수 침지에서 갓 부위 조추출물의 추출 수율은 68.0%, 대 부위 조추출물의 추출 수율은 75.0%였고 에탄올 침지에서 갓 부위 조추출물의 추출 수율은 44.0%, 대 부위 조추출물의 추출 수율

은 53.0%였다.

총 폴리페놀 함량 측정

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물에 의해 환원되면 몰리브덴이 청색으로 발색되는 원리를 이용한 Singleton 등(1981)의 방법에 준하여 측정하였다[36]. 흰색 느티만가닥버섯 추출물 100 µl에 2% sodium carbonate (Na₂CO₃) 용액(Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 2 ml를 첨가한 후 3분 동안 방치한 다음 50% Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 100 µl를 첨가하였다. 혼합액은 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 multi-mode microplate reader (Molecular devices, SpectraMax M5, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 720 nm에서 흡광도를 측정하였으며 gallic acid (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 표준물질로 작성한 검량선을 이용하여 흰색 느티만가닥버섯 추출물의 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼에 대한 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 짙은 보라색을 띠는 안정한 라디칼인 DPPH가 항산화물질의 전자공여능에 의해 수소 혹은 전자를 받아 탈색되는 원리를 이용한 Blois 등(1985)의 방법에 준하여 측정하였다[4]. 흰색 느티만가닥버섯 추출물 50 µl에 0.15 mM DPPH 용액(Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 200 µl를 첨가한 후 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 multi-mode microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조구는 BHT (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였으며 DPPH 라디칼 소거 활성은 시료첨가구와 대조구 사이의 흡광도 차이를 구하여 백분율로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성(%)=(대조구 흡광도-시료첨가구 흡광도)/대조구 흡광도×100

ABTS 라디칼 소거 활성

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 라디칼 소거 활성은 청록색을 띠는 ABTS⁺ 라디칼이 항산화물질의 전자공여능에 의해 수소 혹은 전자를 받아 탈색되는 원리를 이용한 Re 등(1999)의 방법에 준하여 측정하였다[39]. 흰색 느티만가닥버섯 추출물 100 µl에 ABTS 용액(Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 900 µl를 첨가한 후 multi-mode microplate reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조구는 L(+)-ascorbic acid (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였으며 ABTS 라디칼 소거 활성은

시료첨가구와 대조구 사이의 흡광도 차이를 구하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거 활성(\%)} = (\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}) / \text{대조구 흡광도} \times 100$$

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 측정

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 peroxy 라디칼 소거능을 나타내는 oxygen radical absorbance capacity (ORAC)는 peroxy 라디칼의 생성과 소멸에 의한 fluorescent의 감소율을 측정하는 Cao 등의 방법(1993)에 준하여 측정하였다[6]. 흰색 느티만가닥 추출물 10 ul에 300 mM 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH, Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액 20 ul와 250 nM fluorescein (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액 2.7 ml를 첨가한 다음 multi-mode microplate reader를 이용하여 485 nm (excitation wavelength)와 535 nm (emission wavelength)에서 1시간 동안 2분마다 형광을 측정하였다. 흰색 느티만가닥버섯 추출물의 ORAC 지수는 trolox (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 표준물질로 작성한 검량선을 이용하여 구하였다.

환원력(Reducing power) 측정

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 환원력은 추출물이 수소를 공여하여 ferric ion (Fe³⁺)을 ferrous ion (Fe²⁺)으로 환원시키는 능력을 측정하는 potassium ferricyanide법을 이용한 Oyaizu (1986)의 방법에 준하여 측정하였다[34]. 흰색 느티만가닥버섯 추출물 500 ul에 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) 500 ul와 10% potassium ferricyanide (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 500 ul를 혼합한 후 50°C에서 20분 동안 반응시켰다. 이 혼합액에 10% trichloroacetic acid (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 500 ul를 첨가한 후 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 상등액 1 ml와 증류수 1 ml를 혼합한 다음 1% ferric chloride (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 200 ul를 첨가한 후 multi-mode microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

WST-1 assay를 이용한 세포독성 측정

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 세포 독성은 WST (Water Soluble Tetrazolium salt)-1 assay를 이용하여 추출물이 대식세포 RAW 264.7의 세포생존율에 미치는 영향을 조사하여 확인하였다[15]. 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB 10092)으로부터 분양받은 대식세포 RAW 264.7은 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Rockville, Md, USA)과 1%의 penicillin-streptomycin (Gibco, Rockville, Md, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco, Rock-

vile, Md, USA) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 2일 동안 배양하였다. 배양된 대식세포 RAW 264.7는 24-well plate에 10⁵-10⁶ cells/well로 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 배양한 후 추출물을 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 다시 배양하였다. 각 well에 WST-1 용액(TAKARA Bio Inc., Shiga, Japan) 50 ul를 첨가하여 30분 동안 반응시킨 다음 multi-mode microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 5회 이상 반복실험을 수행하여 얻어진 결과이며 실험결과와 평균값과 표준오차는 SAS (Statistical analysis system, USA) program을 사용하여 구하였고 Duncan's 다중검정법으로 p<0.05 수준에서 통계적 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 총 폴리페놀 함량

흰색 느티만가닥버섯 갓 부위와 대 부위의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid equivalents (GAE)으로 구하였으며 Fig. 1과 같다. 흰색 느티만가닥버섯 열수 추출물 중 갓 부위와 대 부위의 총 폴리페놀 함량은 각각 1137.39±0.38 mg GAE/100 g과 700.86±0.06 mg GAE/100 g였고 에탄올 추출물 중 갓 부위와 대 부위의 총 폴리페놀 함량은 각각 923.47±0.18 mg GAE/100 g과 324.05±0.03 mg GAE/100 g으로 에탄올 추출물에 비해 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량이 높게 나타났으며 대 부위보다는 갓 부위의 총 폴리페놀 함량이 더 높게 나타났다. 시판 버섯의 부위별 항산화능에 관한 연구, 부위별 새송이 추출물의 항산화 효과, 갈색 느티만가닥버섯 메탄올 추출물의 항산

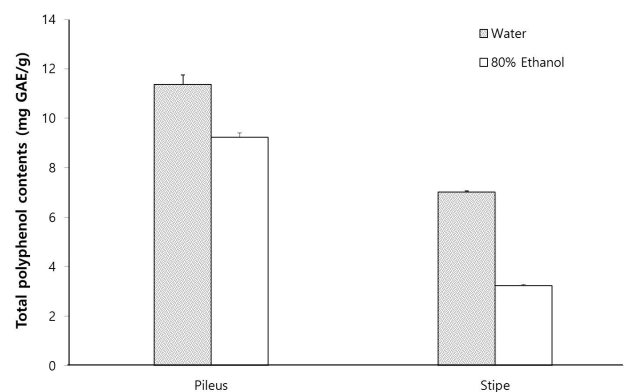


Fig. 1. Total polyphenol contents of extracts from pileus and stipe of *H. marmoreus* (white cultivar). Values are expressed as mean±SD (n=5), values with different superscript letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

화 효과에 관한 연구에서도 대 부위보다 갓 부위의 총 폴리페놀 함량이 높은 것으로 보고되었으며[22, 25, 28] 본 실험에 사용된 흰색 느티만가닥버섯은 새송이(메탄올 추출물 갓 부위 374.5 mg/100 g, 대 부위 212.6 mg/100 g), 팽이(메탄올 추출물 갓 부위 341.8 mg/100 g, 대 부위 211.5 mg/100 g), 만가닥버섯(열수 추출물 506.71 mg/100 g), 갈색 느티만가닥버섯(메탄올 추출물 갓 부위 870 mg/100 g, 대 부위 560 mg/100 g)에 비해 총 폴리페놀 함량이 높게 나타났다[9, 21, 26]. 일반적으로 버섯의 일반 성분 및 생리활성물질은 버섯의 품종, 생육배지, 수확시기, 재배방법 등에 따라 달라질 수 있을 뿐만 아니라 생육 중 환경적 스트레스가 높아지면 2차 대사산물인 생리활성물질의 생성량은 증가될 수 있다[3, 7, 23].

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하여 확인하였으며 Fig. 2와 같다. 항산화 활성을 측정하는 방법 중 DPPH 라디칼 소거 활성은 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 화합물인 DPPH가 황 함유 아미노산, ascorbic acid, 페놀성 화합물 등의 항산화 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 환원되면서 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하는 방법으로 환원력이 클수록 항산화 활성이 높다[31]. 흰색 느티만가닥버섯 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 갓 부위와 대 부위 모두 농도 의존적으로 증가하였으며 대 부위보다는 갓 부위의 DPPH 라디칼 소거능이 높게 나타났고 열수 추출물에 비해 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 높게 나타났다. 흰색 느티만가닥버섯의 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 우수한 DPPH 라디칼 소거능을 나타낸 이유는 흰색 느티만가닥버섯에는 친수성보다는 소수성의 항산화물질이 더 많이 함유되어 있기 때문으로 판단된다. 열수 추출물 10 mg/ml의 농도에서 갓 부위와 대 부위의 DPPH 라디칼 소거능은 각각 31.02±0.16%, 21.50±0.06%였고 에탄올 추출물 10 mg/ml의 농도에서 갓 부위와 대 부위의 DPPH 라디칼 소거능은 각각 47.32±0.23%, 35.31±0.39%였다 (Fig. 2). 시판버섯의 부위별 항산화 활성에 관한 연구에서도 갓 부위의 DPPH 라디칼 소거능이 대 부위보다 높은 것으로 보고되었다[23]. 10 mg/ml의 농도에서 흰색 느티만가닥버섯 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 새송이 메탄올 추출물(갓 부위 86.7%, 대 부위 69.3%), 갈색 만가닥버섯 메탄올 추출물(갓 부위 85.8%, 대 부위 79.4%)보다 낮게 나타났으며[23] 이는 추출 용매 및 추출 조건에 따른 차이로 판단된다.

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성

ABTS 라디칼 소거 활성은 DPPH 라디칼 소거능과 함께 항산화 활성을 스크리닝하는데 많이 이용되는 방법이다. ABTS는 비교적 안정한 free radical로서 hydrogendonating antioxidants와 chain breaking antioxidants 물질의 항산화력

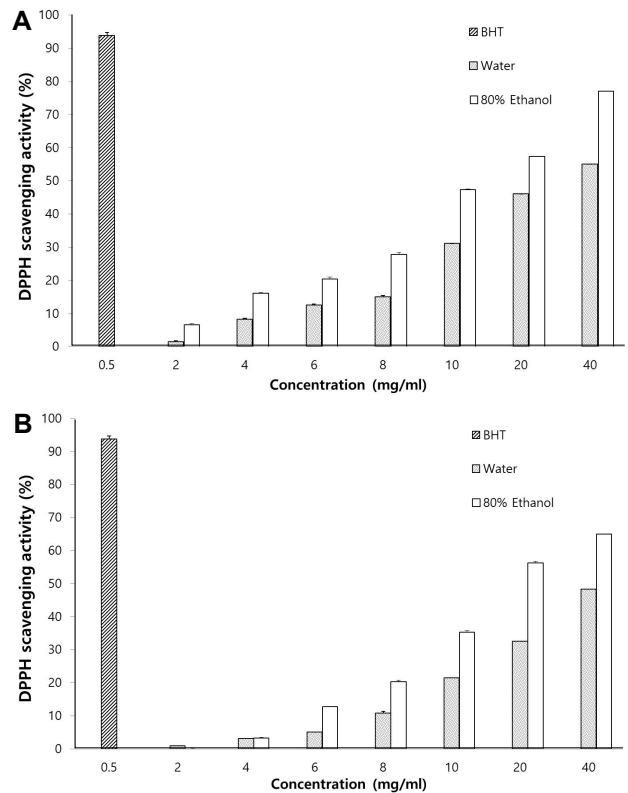


Fig. 2. DPPH radical scavenging of extracts from pileus (A) and stipe (B) of *H. marmoreus* (white cultivar). Values are expressed as mean±SD (n=5), values with different superscript letters are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

측정이 가능하며 ABTS 라디칼을 억제하거나 소거하는 것에 의해 항산화 활성을 평가한다[25]. 흰색 느티만가닥버섯 추출물의 ABTS 양이온 소거능을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 흰색 느티만가닥버섯 추출물의 ABTS 양이온 소거능은 갓 부위와 대 부위 모두 농도 의존적으로 증가하였으며 대 부위보다는 갓 부위의 ABTS 양이온 소거능이 높게 나타났고 열수 추출물에 비해 에탄올 추출물의 ABTS 양이온 소거능이 높게 나타났다. 10 mg/ml의 농도에서 열수 추출물 갓 부위와 대 부위의 ABTS 양이온 소거능은 각각 45.01±0.43%, 29.78±0.44%였고 에탄올 추출물 갓 부위와 대 부위의 ABTS 양이온 소거능은 각각 57.33±0.10%, 48.02±0.12%였다. 시판버섯의 부위별 항산화 활성에 관한 연구에서도 갓 부위의 ABTS 양이온 소거능이 대 부위보다 높은 것으로 보고되었다[23]. 10 mg/ml의 농도에서 흰색 느티만가닥버섯 에탄올 추출물의 ABTS 양이온 소거 활성은 새송이 메탄올 추출물(갓 부위 88.5%, 대 부위 77.9%), 갈색 만가닥버섯 메탄올 추출물(갓 부위 96.7%, 대 부위 82.8%)보다 낮게 나타났으며[23] 이는 추출 용매 및 추출 조건에 따른 차이로 판단된다. 양성 대조구인 Ascorbic acid는 0.1 mg/ml의 농도에서 92.17±0.11%의 ABTS 양이온 소거활성을 나타내었다. 일반적으로 ABTS 양이온 소거능은 친수성 물질과 소수

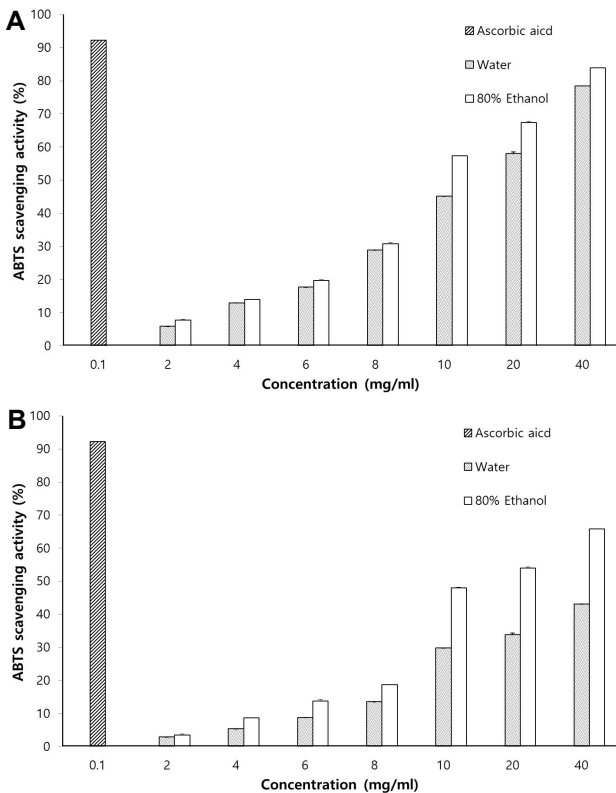


Fig. 3. ABTS radical scavenging of extracts from pileus (A) and stipe (B) of *H. marmoreus* (white cultivar). Values are expressed as mean±SD (n=5), values with different superscript letters are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

성 물질의 항산화력 측정이 가능하기 때문에 DPPH 라디칼 소거능보다는 높은 활성을 나타낸다[38, 46].

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

ORAC 지수는 수소전자의 전달이론을 바탕으로 radical chain breaking antioxidant capacity를 측정하는 방법으로 친수성 및 소수성 성분 모두에 반응하기 때문에 응용범위가 넓다는 장점을 가지고 있다[34, 35]. 흰색 느티만가닥버섯 갓 부위와 대 부위의 ORAC 지수는 Trolox equivalents (TE)로 구하였으며 Fig. 4와 같다. 흰색 느티만가닥버섯 열수 추출물 중 갓 부위와 대 부위의 ORAC 지수는 각각 93.34 ± 1.00 uM TE/g과 58.33 ± 0.48 uM TE/g이었고 에탄올 추출물 중 갓 부위와 대 부위의 ORAC 지수는 각각 64.76 ± 0.98 uM TE/g와 46.22 ± 1.12 uM TE/g으로 에탄올에 비해 열수 추출물의 ORAC 지수가 높게 나타났으며 대 부위보다는 갓 부위의 ORAC 지수가 더 높게 나타났다. 목이 품종간 생리활성 비교에 관한 보고에 의하면 털목이의 ORAC 지수는 101.16 uM/g, 갈색목이는 91.57 uM/g, 흑목이는 83.87 uM/g이었으며[26] 버섯의 폴리페놀과 에르고피오네인 함량 및 총 항산화능에 관한 보고에

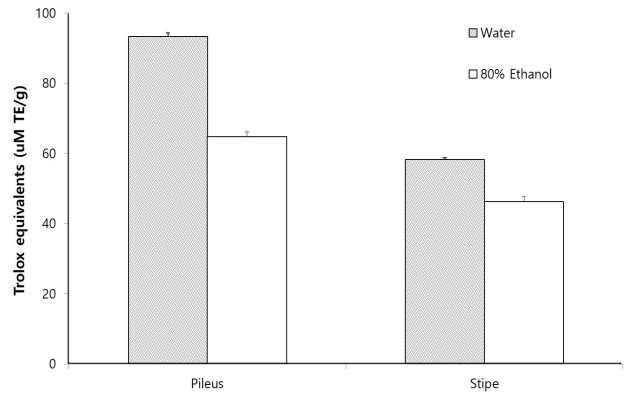


Fig. 4. Oxygen radical absorbance capacity of extracts from pileus and stipe of *H. marmoreus* (white cultivar). Values are expressed as mean±SD (n=5), values with different superscript letters are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

의하면 양송이의 ORAC 지수는 86.33 uM/g, 잎새버섯은 39.33 uM/g, 표고 버섯은 62.67 uM/g이었다[10]. 흰색 느티만가닥버섯 열수 추출물 갓 부위의 ORAC 지수는 이전에 보고된 갈색목이, 흑목이, 양송이, 잎새버섯, 표고 버섯에 비해 높게

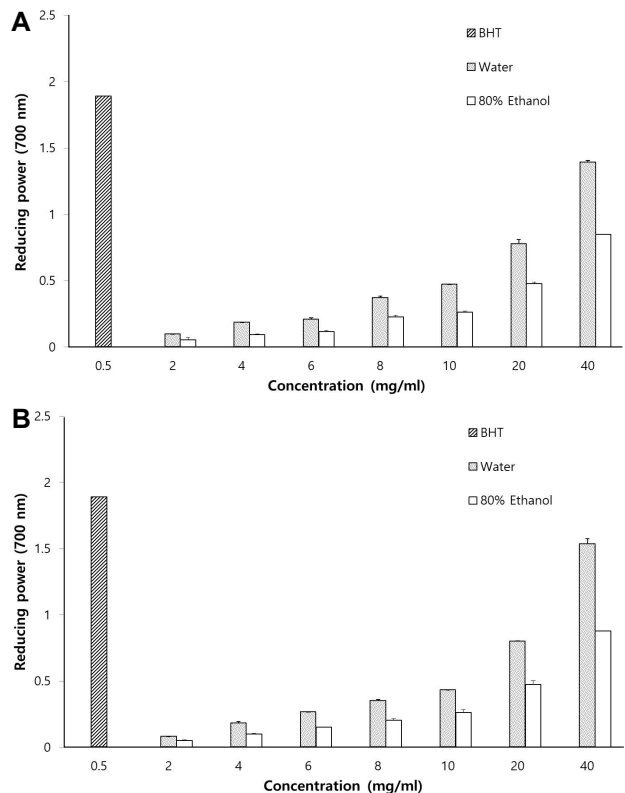


Fig. 5. Reducing power of extracts from pileus (A) and stipe (B) of *H. marmoreus* (white cultivar). Values are expressed as mean±SD (n=5), values with different superscript letters are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

나타났으며 이는 열수 추출물 갖 부위의 총 폴리페놀 함량이 높기 때문에 ORAC 지수도 높은 것으로 판단된다.

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 환원력(Reducing power) 측정

흰색 느티만가닥버섯 추출물의 환원력 측정 결과는 Fig. 5와 같다. 흰색 느티만가닥버섯 추출물의 환원력은 갖 부위와 대 부위 모두 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 에탄올 추출물에 비해 열수 추출물의 환원력이 높게 나타났으며 갖 부위와 대 부위의 차이는 없었다. 흰색 느티만가닥버섯 열수 추출물은 10 mg/ml의 농도에서 갖 부위와 대 부위의 환원력은 각각 0.47 ± 0.01 , 0.43 ± 0.01 였고 에탄올 추출물 갖 부위와 대 부위의 환원력은 각각 0.26 ± 0.01 , 0.26 ± 0.02 였다. 해송이 열수 추출물의 항산화 효과에 관한 연구에 의하면 해송이는 버섯의 채집 시기와 물질의 추출시간에 따라 환원력에 차이가 나타나며 10 mg/ml의 농도에서 8월에 채집한 버섯의 환원력은 0.5, 11월에 채집한 버섯의 환원력은 0.69였다[43]. 해송이 열수 추출물의 항산화 효과에 관한 연구에 의하면 해

송이는 열수 추출할 경우 추출시간에 따라 아미노산과 탄수화물이 분리되기 때문에 추출시간이 경과함에 따라 추출물의 환원력이 증가된다고 보고하였으며[43] 흰색 느티만가닥버섯도 추출시간 및 조건에 따라 환원력이 달라질 수 있으므로 이에 관한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

흰색 느티만가닥버섯 추출물이 대식세포 RAW 264.7의 세포생존율에 미치는 영향

대식세포인 RAW 264.7에 대한 흰색 느티만가닥버섯 추출물의 세포 독성은 대식세포 RAW 264.7에 추출물을 처리한 다음 WST-1 assay를 이용하여 확인하였다. 세포의 증식능력이나 세포생존력을 정량하는 대표적인 실험방법 중 하나인 WST assay는 세포 내 미토콘드리아의 탈수소 효소에 의해 엷은 붉은색의 수용성 기질인 water soluble tetrazolium salts가 짙은 붉은색의 formazan으로 변환되는 성질을 이용하는 검사법으로 살아있는 세포수에 비례해서 흡광도를 나타낸다[42]. 대식세포 RAW 264.7 세포에 흰색 느티만가닥버섯 추출물을 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40 mg/ml의 농도로 처리한 다음 WST-1 assay에 의한 세포생존율을 조사한 측정된 결과, 모든 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내어 세포독성은 나타나지 않는 것으로 판단된다(Fig. 6).

감사의 글

본 연구는 2014년 경남과학기술대학교 기성회연구비 지원 사업에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

References

1. Aitken, R. J., Buckingham, D. and Harkiss, D. 1993. Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **97**, 441-450.
2. Ames, B. N. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* **221**, 1256-1264.
3. Barros, L., Ferreira, M. J., Queiros, B., Ferreira, I. C. F. R. and Baptista, P. 2007. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem.* **103**, 413-419.
4. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
5. Branen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**, 59-63.
6. Cao, G., Alessio, H. M. and Cutler, R. G. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 303-311.
7. Chang, S. T., Buswell, J. A. and Chiu, S. W. 1993. Mushroom biology and mushroom products. The Chinese University

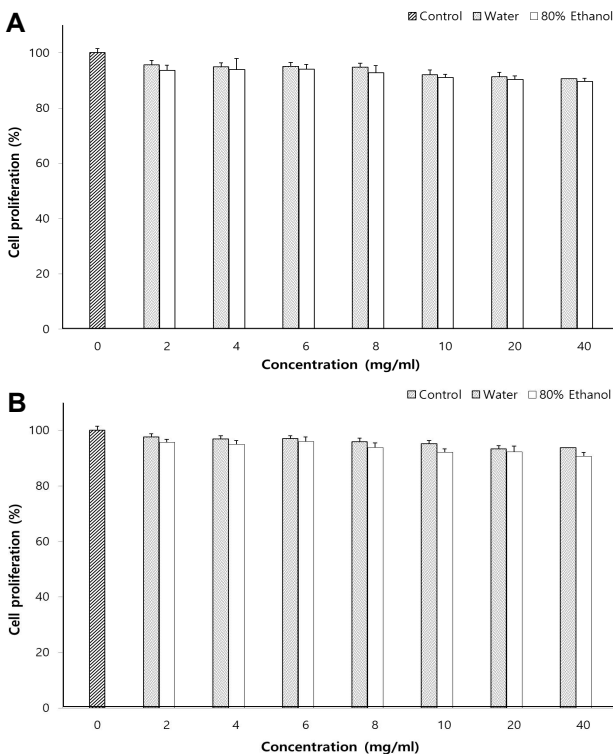


Fig. 6. Effects of extract from pileus (A) and stipe (B) of *H. marmoreus* (white cultivar) on cell proliferation in mouse macrophage cell line RAW 264.7. The RAW 264.7 cell was incubated for 24 hr in DMEM media with different concentration of extract form *H. marmoreus* (white cultivar). The cell proliferation was determined using WST-1 assay. Values are expressed as mean \pm SD (n=5), Values with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

- Press. Hong Kong. pp. 3-17.
8. Choi, S. J., Lee, Y. S., Kim, J. K., Kim, J. K. and Lim, S. S. 2010. Physiological activities of extract from edible mushrooms. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 1087-1096.
 9. Choi, Y. M., Chang, W. B., Choi, S. Y., Choi, J. S., Noh, J. G., Song, I. G., Min, K. B. and Lee, J. S. 2008. Biological activities of *Lyophyllum ulmarium* extracts. *J. Agri. Life Sci.* **42**, 35-41.
 10. Dubost, N. J., Ou, B. and Beelman, R. B. 2007. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chem.* **105**, 727-735.
 11. Duh, P. D., Tu, Y. Y. and Yen, G. C. 1999. Antioxidant activity of water extract of Harnj yjur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT-Food Sci. Technol.* **32**, 269-277.
 12. Ferreira, I., Barros, L. and Abreu, R. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. *Curr. Med. Chem.* **16**, 1543-1560.
 13. Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Vilas-Boas, M. and Barros, L. 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chem.* **100**, 1511-1516.
 14. Feskanich, D., Ziegler, R. G., Michaud, D. S., Giovannucci, E. L., Speizer, F. E., Willett, W. C. and Colditz, G. A. 2000. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1812-1823.
 15. Francoeur, A. M. and Assalian, A. 1996. Microcat: A novel cell proliferation and cytotoxicity assay based on WST-1. *Biochemica* **3**, 19-25.
 16. Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 1-11.
 17. Guk, M. H., Kim, D. H., Lee, C., Jeong, E. S., Choi, E. J., Lee, J. S. and Lee, T. S. 2013. Antioxidant and skin whitening effects of *Inonotus obliquus* methanol extract. *J. Mushroom Sci. Prod.* **11**, 99-106.
 18. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1-14.
 19. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
 20. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. 1993. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Clarendon press, Oxford, UK. pp. 86-133.
 21. Hanato, T. 1995. Constituents of natural medicines with scavenging effect on active oxygen species-tannins and related polyphenols. *J. Nat. Med.* **49**, 357-363.
 22. Hirase, S., Nakai, S., Akatsu, T., Kobayashi, A. and Oohara, M. 1976. Structural studies on the anti-tumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes). I. Fractionation with barium hydroxide. *Yakugaku Zasshi* **96**, 413-418.
 23. Hong, M. H., Jin, Y. J. and Pyo, Y. H. 2012. Antioxidant properties and ubiquinone contents in different parts of several commercial mushrooms. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1235-1241.
 24. Hyun, J. M., Park, K. J., Kim, S. S., Park, S. M., Lee, Y. J. and An, H. J. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory effects of solvent fractions from the peel of the native jeju citrus 'Hongkyool' and 'Pyunkyool'. *J. Life Sci.* **25**, 1132-1138.
 25. Ikekawa, T. 1995. Bunashimeji, *Hypsizygus marmoreus* anti-tumor activity of extracts and polysaccharides. *Food Rev. Int.* **11**, 207-209.
 26. Jo, S. H., Kim, T. H., Yu, Y. B., Oh, J. N., Jang, M. J. and Park, K. M. 2012. A comparative study on the physiological activities of *Auricularia* spp. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 350-355.
 27. Kim, S. C., Ryu, H. M., Jung, S. M., Lee, Y. H., Kim, H. S., Kim, J. O., Cho, Y. U. and Cho, S. J. 2013. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of *Hypsizygus marmoreus* (brown cultivar) methanol extracts. *J. Mushroom Sci. Prod.* **11**, 254-260.
 28. Kim, H. J., Ahn, M. S., Kim, G. H. and Kang, M. H. 2006. Antioxidative and antimicrobial activities of *Pleurotus eryngii* extracts prepared from different aerial part. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**, 799-804.
 29. Oh, S. I. and Lee, M. S. 2007. Antioxidative stress and anti-mutagenic effects of *Lentinus edodes* ethanol extracts. *Kor. J. Food Nutr.* **20**, 341-348.
 30. Bolormaa, Z., Kim, M. K., Seo, G. S., Lee, Y. W. and Lee, J. S. 2011. Screening and physiological functionality of *Hypsizygus marmoreus* (White Cultivar) fruiting body. *Kor. J. Mycol.* **39**, 185-188.
 31. Lee, S. Y., Choi, H. D., Yu, S. N., Kim, S. H., Park, S. K. and Ahn, S. C. 2015. Biological activities of *Mesembryanthemum crystallinum* (Ice plant) extract. *J. Life Sci.* **25**, 638-645.
 32. Lee, Y. S., Joo, E. Y. and Kim, N. W. 2006. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Lepista nuda*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 1309-1314.
 33. Ma, S. J. 1983. Effects of the substances extracted from dried mushroom (*Lentinus edodes*) by several organic solvents on the stability of fat. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **15**, 150-154.
 34. Makato, O. 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap. J. Nutr.* **44**, 307-315.
 35. Matsuzawa, T., Saitoh, H., Sano, M., Tomita, I., Ohkawa, M. and Ikekawa, T. 1998. Studies on antioxidants of *Hypsizygus marmoreus*. II. Effects of *Hypsizygus marmoreus* for antioxidants activities of tumor-bearing mice. *Yakugaku Zasshi* **118**, 476-481.
 36. McCord, J. M. and Fridovich, I. 1988. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic. Biol. Med.* **5**, 363-369.
 37. Ou, B., Hampsch-Woodill, M. and Prior, R. L. 2001. Development and validation of an Improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4619-4626.
 38. Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B. and Jacob, R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC)) of plasma and other biological and food samples.

- J. Agr. Food Chem.* **51**, 3273-3279.
39. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
40. Singleton, V. L. 1981. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv. Food Res.* **27**, 149-242.
41. Sung, J. M., Yoo, Y. B. and Cha, D. Y. 1998. Mushroom science. Kor-Hak Publish, Seoul, Korea. pp. 456-460.
42. Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K. and Watanabe, M. 1999. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.* **36**, 47-50.
43. Xu, X. M., Jun, J. Y. and Jeong, I. H. 2007. A study on the antioxidant activity of *Hae-Songi* mushroom (*Hypsizygus marmoreus*) hot water extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 1351-1357.
44. Yen, G. C. and Hsieh, C. L. 1998. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3952-3957.
45. Yoon, J. H., Park, S. G., Lee, M. J., Park, J. Y., Seo, K. S., Woo, K. C. and Lee, C. E. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Bletilla striata* Reichenbach fil. fractions as cosmetic. *J. Life Sci.* **23**, 1073-1078.
46. Jang, Y. A. and Lee, J. T. 2015. The evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and anti-aging of extract solvent and *Poria cocos* by parts. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **13**, 377-383.
47. Zanabaatar, B., Kang, M. G., Seo, G. S., Lee, Y. W. and Lee, J. S. 2012. Analysis of nutritional characteristics and physiological functionality of *Hypsizygus marmoreus* (Brown cultivar). *Kor. J. Mycol.* **40**, 104-108.

초록 : 부위별 흰색 느티만가닥버섯 추출물의 항산화 활성

김수철^{1,2*} · 권현숙^{3*} · 김철환¹ · 김혜수¹ · 이창윤⁴ · 조수정^{1*}

(¹경남과학기술대학교 제약공학과, ²(주)아미코젠, ³한약진흥재단, ⁴SB-Bio)

본 연구에서는 천연물 유래 항산화 소재로서 흰색 느티만가닥버섯(*Hypsizygus marmoreus*)의 부위별 이용 가능성을 알아보기 위하여 흰색 느티만가닥버섯을 갓(pileus)과 대(stipe)로 분리하여 열수와 80% 에탄올에 침지한 다음 부위별 항산화 활성을 조사하였다. 흰색 느티만가닥버섯은 에탄올 추출물(갓 부위 923.47±0.18 mg GAE/100 g, 대 부위 324.05±0.03 mg GAE/100 g)에 비해 열수 추출물(갓 부위 1137.39±0.38 mg GAE/100 g, 대 부위 700.86±0.06 mg GAE/100 g)의 총 폴리페놀 함량이 높게 나타났고 대 부위보다는 갓 부위의 총 폴리페놀 함량이 높게 나타났다. DPPH 라디칼 소거 활성은 10 mg/ml의 농도에서 에탄올 추출물 갓 부위의 활성이 47.32±0.23%로 가장 높았으며 ABTS 라디칼 소거 활성도 10 mg/ml의 농도에서 에탄올 추출물 갓 부위의 활성이 57.33±0.10%로 가장 높았다. 환원력과 ORAC 지수는 에탄올 추출물에 비해 열수 추출물이 높게 나타났고 환원력은 갓 부위와 대 부위에 큰 차이가 없었으나 ORAC 지수는 대 부위보다는 갓 부위가 높게 나타났다. 흰색 느티만가닥버섯 추출물의 세포 독성은 WST-1 assay를 이용하여 추출물이 RAW 264.7 세포에 미치는 영향으로 평가하였다. 이상의 결과를 종합해보면, 흰색 느티만가닥버섯의 총 폴리페놀 함량과 항산화 활성은 추출물의 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었으며 대 부위보다는 갓 부위의 항산화 활성이 우수하였다.