

Meyerozyma guilliermondii FM을 이용한 꽃송이버섯 발효물의 항산화 효과 및 면역 활성화

박성은¹ · 서승호¹ · 문양선^{2,3} · 이유미¹ · 나창수¹ · 손홍석¹

¹동신대학교 한의과대학
²동신대학교 대학원 대체요법과
³(유)나우리

Antioxidant and Immunological Activities of *Sparassis crispa* Fermented with *Meyerozyma guilliermondii* FM

Seong-Eun Park¹, Seung-Ho Seo¹, Yang-Seon Moon^{2,3}, Yu-Mi Lee¹,
Chang-Su Na¹, and Hong-Seok Son¹

¹School of Korean Medicine, Dongshin University

²Department of Alternative Therapy, Graduate School of Dongshin University

³Nawoori (Ltd.)

ABSTRACT The effects of *Sparassis crispa* extracts fermented with isolated strain from *S. crispa* on antioxidant and immunological activities were determined. *S. crispa* extracts fermented with *Meyerozyma guilliermondii* FM showed significantly higher total phenol contents and DPPH radical scavenging activities compared to those fermented with lactic acid bacteria. In methotrexate-induced immunosuppressed rats, reduced levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-2, and immunoglobulin E (IgE) and increased levels of IL-10 were detected in *S. crispa* extract injected groups regardless of fermentation. We confirmed that rats treated with *S. crispa* fermented with *M. guilliermondii* FM showed higher blood leukocyte contents compared to other treatments. These results suggest that *M. guilliermondii* FM has high potential as a starter culture for fermentation of *S. crispa* extracts with increased antioxidant and immunological activities.

Key words: *Sparassis crispa*, *Meyerozyma guilliermondii*, β -glucan, immunological activity, antioxidant activity

서론

최근 암과 같은 질병에 대해 효과를 보이는 합성의약품의 개발이 여러 가지 부작용을 나타내면서 독성이 낮고 비교적 안전성이 확보된 약용 식물과 같은 천연물에 대한 성분분석 및 생리활성 연구가 활발히 진행되고 있다(1). 다양한 천연물 중 버섯은 예로부터 맛과 향은 물론 영양성분까지 우수하여 건강 및 기호식품으로 널리 이용되어 왔으며(2), 현재까지 다양한 종류의 버섯에 함유된 다당체들의 항암, 면역증진 등의 생리활성에 대한 연구들이 보고되고 있다(3-5). 이 중 β -glucan은 비특이적 면역반응으로 정상세포의 면역체계를 활성화시켜 항암, 항바이러스, 항응고제, 항비만 등의 다양한 효능에 관여하며(6,7), phenolic acid 계열의 성분들은 항산화, 항균, 항염증에 효과를 보이는 것으로 보고되고 있다(8,9).

꽃송이버섯은 건조 중량 기준 100 g당 43.6 g의 β -glucan이 함유되고 있는 것으로 알려져 면역반응 및 항암 활성화에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있다(10). 또한, β -glucan과 더불어 veratric acid와 같은 phenolic compounds가 다른 버섯보다 풍부한 것으로 보고되어(11) 항암(12) 및 항염(13) 등의 다양한 생리활성에 관한 연구들이 보고되고 있다.

버섯에 포함된 β -glucan과 같은 다당류는 인체 내의 소화 효소로는 분해되지 않으며 열수 추출할 경우 수율이 떨어지는데(14) 이를 보완할 수 있는 기술 중 하나로 미생물의 발효가 주목받고 있다. 발효는 미생물이 자신의 효소로 유기물을 분해 또는 변화시켜 특유한 최종산물을 만들어내는 과정으로 면역증강(15), 항균(16), 항암(17) 등 유익한 효과를 보이는 대사산물을 생산할 수 있다(18). 따라서 생물자원으로 활용가치가 높은 미생물의 발효에 관련된 연구가 다양하게 진행되어 왔으며, 특히 안전성이 확보된 GRAS(generally recognized as safety) 미생물이 주로 이용되고 있다(19). 꽃송이버섯의 발효에 관련된 기존 연구들은 *Lacto-*

*bacillus plantarum*과 같은 유산균들이 주를 이루고 있으며 새로운 균주 개발에 관한 연구들이 부족한 실정이다(14,18).

본 연구에서는 꽃송이버섯으로부터 분리, 선발한 균주를 이용하여 꽃송이버섯 발효물을 제조하고, 발효 후 항산화 및 면역 활성 분석을 통해 발효효능과 꽃송이버섯으로부터 분리한 균주의 이용 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

발효 균주 및 배양

꽃송이버섯 발효에 이용할 미생물 분리를 위하여 꽃송이버섯에 멸균증류수를 첨가한 후 회석 및 현탁하여 plate count agar(Difco, Sparks, MD, USA)에 도말하고 모양이 다른 single colony를 streaking 하여 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 관찰된 colony를 계대 배양하고 분리하여 4°C에서 보관하며 실험에 사용하였다. 꽃송이버섯 발효에 적합한 균주 선발을 위하여 꽃송이버섯 배지에서 배양하며 생균수 및 이화학적 변화 측정을 통한 발효 속도를 관찰하여 1차 선발하였으며, 이후 항산화능, 관능특성 등을 확인하여 2차 선발하였다(data not shown). 꽃송이버섯 발효에 우수한 생육능력 및 발효특성을 보인 FM 균주를 최종 선발하여 본 연구에 사용하였으며 선발된 FM 균주를 18S rRNA sequencing에 의해 분석한 결과 효모의 일종인 *Meyerozyma guilliermondii*와 가장 유사성이 높은 것으로 확인되었고 *Meyerozyma guilliermondii* FM으로 명명하였다(Fig. 1). 본 연구에서는 여러 실험의 상대적 비교를 위해 유산균(*Lactobacillus plantarum* KCCM 11322, *Leuconostoc mesenteroies* KCTC 3718, *Bifidobacterium longum* KCCM 11953)을 사용하였다.

꽃송이버섯 발효물 제조

꽃송이버섯은 백아산꽃송이버섯 영농조합법인(Hwasun, Korea)에서 생물 상태로 구입하여 dry oven을 이용하여 건조 후 분말 형태로 제조하여 사용하였다. 꽃송이버섯 발효물은 꽃송이버섯 분말에 50배 가수한 후 autoclave(121°C, 60 min)에서 추출하였으며 이 추출물에 균주를 각각 1% 접종하여 37°C incubator에서 5일간 발효하였다. 시료 채취는 0, 1, 3, 5일째 실시하였다.

생균수 측정

꽃송이버섯 발효물의 생균수는 시료 0.1 mL에 멸균증류수를 가하여 10배씩 단계별로 희석하였으며 plate count agar(Difco)에 분주하여 37°C에서 48시간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다.

pH 및 적정산도 측정

pH는 pH meter기(pH meter 250L, ISTEK, Seoul, Korea)를 이용하였으며, 적정 산도는 0.1 N NaOH로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하여 이때 소비된 NaOH 함량을 lactic acid(%)로 환산하여 계산하였다.

총페놀 함량 측정

총페놀 함량 함량은 Folin-Denis 방법(20)을 변형하여 분석하였다. 시료를 10배로 희석한 후 1 mL를 취하여 9 mL 증류수와 1 mL의 Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 넣고 5분간 반응시킨 후 7% Na₂CO₃ 10 mL와 증류수 4 mL를 첨가하고 상온에서 90분간 방치시킨 다음 UV spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였고, gallic acid를 이용한 표준곡선을 작성하고 시료의 총페놀 함량을 산출하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Blois(21)의 방법에 따라 10배로 희석한 샘플 0.4 mL에 0.4 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 용액 1.6 mL를 가하여 10분간 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정한 다음 아래와 같은 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{Electron donating ability (\%)} = \left(100 - \frac{\text{O.D of Sample}}{\text{O.D of Control}}\right) \times 100$$

실험동물 및 투여량

면역 활성 측정을 위한 실험동물은 체중이 약 170~180 g인 rat(Samtako Inc., Osan, Korea)을 항온항습 환경의 사육장(온도 24~26°C, 습도 40~60%)에서 고형사료(Samtako Inc.)와 물을 충분히 공급하여 사육하였고, 1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사용된 동물

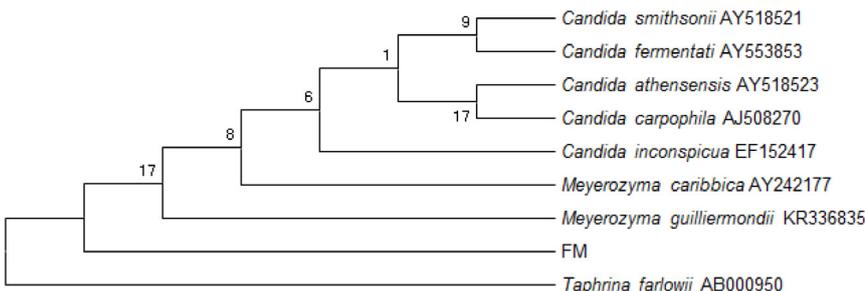


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the isolated microorganism based on 18s rRNA gene sequence of other microorganisms. The scale bar indicates the 0.002% nucleotide difference.

의 면역저하 유발은 methotrexate(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 분말을 2 mg/kg의 농도로 투여하였으며, 8일째부터 1일/1회 총 4회 구강 투여를 시행하였다. 실험군은 정상군(Normal), methotrexate(MTX) 면역저하 유발 후 시술을 하지 않은 대조군(Control), MTX 면역저하 유발 후 꽃송이버섯 열수 추출물을 투여한 군으로 구성되어 있으며, 분리 균주 *M. guilliermondii* FM으로 제조한 발효물의 검증을 위하여 *L. plantarum* 균주로 제조한 발효물을 투여한 군과 비교하였다. 각각의 구강투여는 전체 실험기간 동안 1회/1일, 총 20회 시행되었고 1회 투여량은 100 mg/kg으로 정하였다. 비장 무게는 실험 종료 후 비장을 분리해 무게를 측정하였다. 모든 실험은 동신대학교 동물실험윤리위원회의 승인 후 수행하였다(승인번호: 2016-01-01).

혈청 중 사이토카인과 IgE 함량 측정

실험에 사용된 혈청은 실험 종료 후 각각의 rat의 혈액을 채취하여 고속원심분리기(Centricon T-42K, Kontron, Milan, Italy)에서 1,000×g로 20분간 혈청을 분리하여 사용하였다. Tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-2, IL-10과 immunoglobulin E(IgE)의 함량은 ELISA kit(R&D System, McKinley Place NE, Minneapolis, MN, USA)을 구입하여 제조사의 방법에 따라 측정하였다.

혈액 내의 백혈구 함량 측정

혈액내의 백혈구 함량은 채혈한 혈액 약 100 μ L를 EDTA-bottle에 넣은 후 multi species hematology analyser(Hemavet 950, Drew Scientific, Waterbury, CT, USA)에 주입하여 백혈구 함량을 측정하였다.

통계분석

본 연구에서 *in vitro* 실험은 3반복 시행하였으며, *in vivo* 실험은 6반복 시행하였다. 결과는 평균에 대한 표준편차로 나타내었다. 유의성 검정은 SPSS 22.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA test)을 하고 Duncan의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 통해 95% 신뢰 수준에서 나타내었다.

결과 및 고찰

생균수 측정

꽃송이버섯에서 분리한 균주와 유산균 간의 꽃송이버섯 발효 과정 중 생균수의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 48시간 동안 MRS 배지와 YM 배지에서 전 배양한 스타터를 각각 1%(v/v) 접종하였으며 꽃송이버섯 외에 다른 영양물질은 공급하지 않았다. 꽃송이버섯 발효물 제조 직후 초기 생균수가 다른 이유는 전 배양된 균주의 생균수가 다르기 때문으로 생각한다. 꽃송이버섯 발효가 진행됨에 따라 유산균을 접종한 실험구의 생균수는 점차 감소하였지만 꽃송이버섯에서

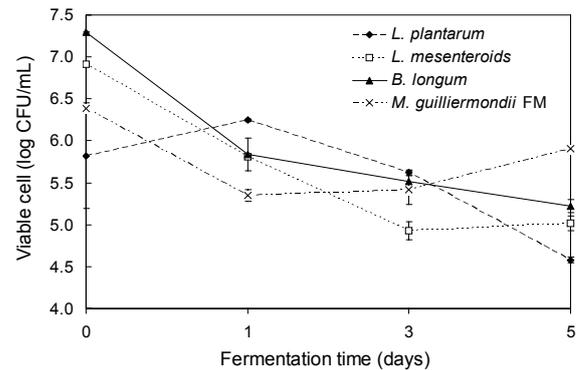


Fig. 2. Change of viable cell counts during fermentation in *S. crista* extract with different microorganisms. Mean \pm SD (n=3).

분리한 균주인 *M. guilliermondii* FM은 발효 1일째까지는 감소하였지만, 이후 발효 5일까지 생균수가 증가하였다. *M. guilliermondii* FM의 경우 발효가 진행될수록 생균수가 증가하는 것은 꽃송이버섯에서 분리하였기 때문에 꽃송이버섯 발효 시 생육이 우수한 것으로 생각한다.

pH 및 산도 측정

분리균주 및 유산균으로 각각 발효한 꽃송이버섯의 pH 및 총산도를 발효 기간 동안 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 꽃송이버섯 추출물의 초기 pH는 5.6이었고 발효 24시간 이후 모든 샘플에서 3.60~4.29로 급격하게 감소하였다. 이후

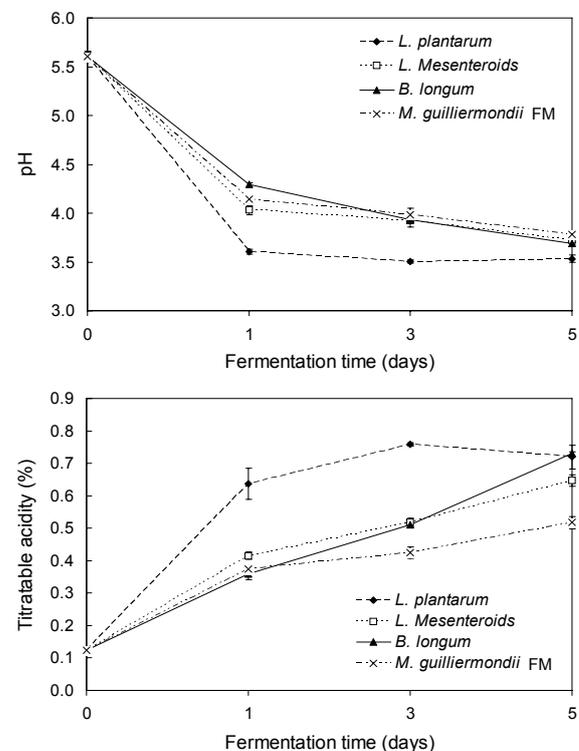


Fig. 3. Changes of pH and titratable acidity during fermentation in *S. crista* extract with different microorganisms. Mean \pm SD (n=3).

발효가 진행됨에 따라 모든 샘플의 pH는 3.53~3.78로 소폭 감소하거나 거의 일정한 값을 나타내었다. *L. plantarum*으로 발효한 실험구는 다른 균주보다 pH의 값이 가장 낮았으며, *M. guilliermondii* FM은 *L. mesenteroides*, *B. longum*을 접종한 실험구와 비슷한 경향성을 나타내었다. 일반적으로 발효기간 동안 pH는 감소하며 이에 반해 산도는 증가하는 경향성을 보이는데(18), 꽃송이버섯을 발효한 본 연구에서도 발효에 따라 pH는 감소하고 총산도는 증가하는 반비례적인 결과가 나타났다. pH의 값이 가장 낮은 *L. plantarum*을 접종한 실험구에서 가장 높은 총산도 값을 보였으며, *M. guilliermondii* FM으로 발효한 실험구의 총산도 값은 발효 1일까지 *L. mesenteroides*, *B. longum*으로 발효한 실험구와 유사한 수치를 보였으나 5일차에는 가장 낮은 값을 나타내었다. 유산균들은 lactic acid를 활발하게 생성하기 때문에 효모인 *M. guilliermondii* FM보다 총산도 값이 높은 것으로 사료된다.

총페놀 함량 및 DPPH 라디칼 소거 활성

꽃송이버섯 추출물과 발효물(5일 후)의 총페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거 활성을 Fig. 4에 나타내었다. Total phenol은 모든 균주에서 발효 전보다 발효 후 유의적으로 높은 함량을 보였으며, 이는 버섯발효에 따라 총페놀 함량이 증가한 것으로 보고한 Kim과 Lee(22)의 연구 결과와 일치한다. 균주 간의 비교에서는 유산균보다 꽃송이버섯으로부터 분리한 *M. guilliermondii* FM으로 발효한 실험구에서 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었으며 균주 간 차이를 나타내었다.

발효 전 꽃송이버섯 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 약 24% 정도로 측정되었으나, 총페놀 함량의 결과와 유사하게 발효 후 모든 샘플에서 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였다. 특히 *M. guilliermondii* FM은 다른 균주에 비하여 발효 전보다 2배가량의 소거 활성(약 48%)을 보였으며, 이어 *L.*

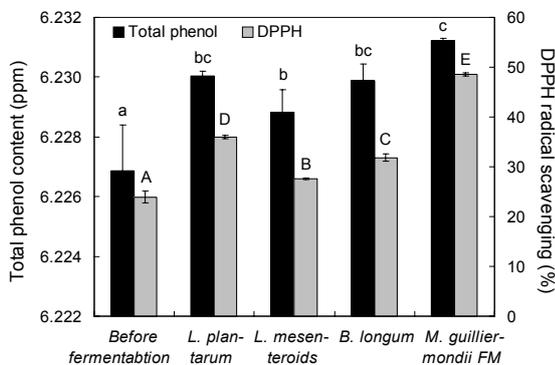


Fig. 4. The total phenol contents and DPPH radical scavenging activities of *S. crispa* extract with different microorganisms. Mean±SD (n=3). Different lower case letters (a-c) above the bars denote statistically significant difference in the total phenol contents ($P<0.05$). Different upper case letters (A-E) above the bars denote statistically significant difference in the DPPH radical scavenging activities ($P<0.05$).

plantarum, *B. longum*, *L. mesenteroides* 순으로 높은 소거능을 보였다. 꽃송이버섯은 항산화제인 비타민 C와 비타민 E의 함량이 아귀버섯이나 소나무잔나비버섯보다 1.5배 이상의 높은 함량을 나타내 항산화력이 우수한 것으로 알려져 있다(23,24). 일반적으로 발효를 통해 항산화 활성이 증가하는데, Yang 등(25)은 버섯 발효물에서의 발효생성물과 유산균 대사산물이 효소의 활성을 저해 혹은 활성화시킴에 따라 버섯발효물의 항산화 활성이 증가할 수 있다고 설명하고 있다. 본 연구의 결과도 사용된 균주의 종류에 따라 항산화력이 다른 것은 대사산물 및 발효생성물의 차이에 따른 결과로 생각하며, 특히 총페놀 함량은 항산화 활성과 높은 상관관계를 보이는 것으로 생각된다. 꽃송이버섯을 항산화력이 가장 높았던 분리균주 *M. guilliermondii* FM으로 발효 시 항산화력을 증가시킬 수 있을 것으로 생각한다.

비장 무게 변화

MTX 면역저하 유발 rat에 대한 꽃송이버섯 발효물 투여에 따른 비장 무게 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 면역저하를 유발하지 않은 정상군(Normal)의 비장 무게는 0.80 g/rat으로, MTX에 의해 면역저하된 대조군(Control)의 0.62 g/rat보다 유의적인 차이를 보였다($P<0.05$). 꽃송이버섯 추출물(발효 전) 및 발효물을 투여했을 때의 비장 무게는 꽃송이버섯 비발효 추출물이 0.74 g/rat이었으며, *L. plantarum*과 꽃송이버섯 유래균인 *M. guilliermondii* FM 발효물을 투여한 실험구가 각각 0.78 g/rat, 0.79 g/rat으로 면역을 저하시킨 대조군보다 꽃송이버섯 비발효 추출물과 발효물 모두 유의적으로 증가하였다. 하지만 꽃송이버섯 비발효 추출물과 발효물 사이의 유의적인 차이는 없었다. 일반적으로 생체 내 면역 지표로 인지되는 비장은 부분적으로 림프구의 생성 차이를 가져올 수 있으며 감염에 영향을 미치는 기관이다(26-28). 이러한 비장 무게의 감소는 특정질환 감염 시 더 많은 변화를 보이며(29), 면역조절제를 투여할 시 흉선과 비장의 무게가 증가하는 것으로 알려져 있다(30). 본 연구에서는 정상군보다 대조군에서 비장 무게가 감소한 것은 MTX

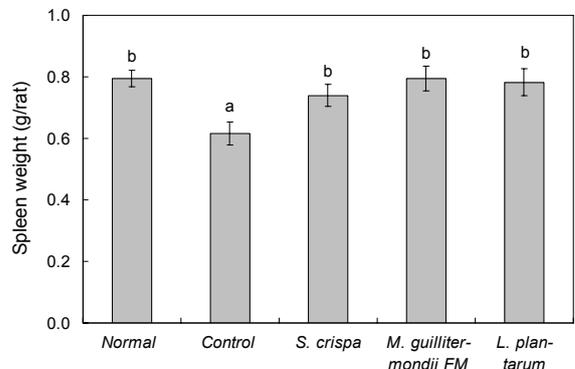


Fig. 5. Spleen weight of experimental rat fed *S. crispa* extract and fermented *S. crispa* extract. Mean±SD (n=6). Different lower case letters (a,b) above the bars denote statistically significant difference ($P<0.05$).

에 의해 면역이 저하되면서 림프구의 생성량에 변화가 생기고 그에 따라 비장세포에도 영향을 준 것으로 생각한다. 또한, 면역이 저하된 rat에 꽃송이버섯 추출물 및 발효물을 투여했을 때 비장 무게가 정상군에 근접한 것은 꽃송이버섯의 투여가 유의미한 면역조절 역할을 한 것으로 보인다.

혈청 내 사이토카인 및 IgE 함량

면역저하가 유발된 rat에 꽃송이버섯 발효물 투여에 따른 사이토카인 함량을 Fig. 6에 나타내었다. TNF- α 의 함량은 대조군이 13.63 pg/mL로 11.18 pg/mL의 정상군보다 약 1.22배 증가하였다. 이는 MTX에 의해 면역저하를 유발시킨 rat에서 TNF- α 가 과다하게 증가한 것으로 생각한다. 면역저하가 유발된 rat에 꽃송이버섯 비발효 추출물과 발효물을 투여했을 때의 TNF- α 는 비발효 추출물이 12.22 pg/mL로 대조군보다 유의적으로 감소한 함량을 보였으며, 꽃송이버섯 발효물을 투여한 실험구는 *L. plantarum*과 *M. guilliermondii* FM 발효액을 투여한 rat에서 각각 11.31 pg/mL, 11.28 pg/mL로 정상군에 가까운 수치를 보였다. 중앙 괴사인자라고도 불리는 TNF- α 는 림프구를 활성화하고 성장을 조절하여 항암작용을 하지만 활성화된 대식세포에서 과도하게 생성될 경우 조직 손상 및 염증반응을 촉진시키는 인자로서 작용한다(31-33). 본 실험 결과 대조군에서는 염증을 일으키는 TNF- α 의 함량이 증가하였으나 꽃송이버섯 추출물과 발효물의 투여로 인해 TNF- α 의 함량이 억제된

것으로 생각한다. 프로바이오틱스와 TNF- α 와의 관계성을 연구한 Thomas 등(34)은 유산균 발효에 의해 L-histidine 이 염증성 TNF- α 의 생산을 억제하는 histamine으로 변환되는 것을 확인하였으며, 이는 *L. plantarum*을 이용한 꽃송이버섯 발효물을 투여받은 rat에서 TNF- α 의 함량이 감소한 것과 연관성을 가진다.

IL-2의 함량은 면역저하가 유발된 대조군이 37.31 pg/mL로 22.31 pg/mL의 함량을 보인 정상군보다 높았으며, 꽃송이버섯 비발효 추출물과 발효물을 투여했을 때의 결과도 정상군과 유사한 IL-2 함량을 보여 TNF- α 의 경향성과 유사하였다. TNF- α 와 IL-2와는 다르게 대식세포와 T세포에 직접 작용하여 대식세포의 항원 제시 기능을 억제하는 IL-10의 함량은 면역저하를 유발하지 않은 정상군이 48.09 pg/mL로 가장 높은 함량을 보였고 *M. guilliermondii* FM 발효물, *L. plantarum* 발효물, 비발효 추출물을 투여한 rat 순으로 높았으며 대조군은 38.75 pg/mL로 가장 낮은 함량을 보였다.

IgE 함량은 대조군에서 1.01 pg/mL로 정상군의 IgE 함량(0.51 pg/mL)보다 높은 함량을 보였으며, 꽃송이버섯 추출물 및 발효물을 투여할 시 0.52~0.59 pg/mL로 유의적으로 감소하였다. IgE는 알레르기 및 아토피 피부염을 가지는 환자의 혈청에서 특히 높은 함량을 보인다(35-37). Lee 등(38)은 프로바이오틱스(유산균 등)의 섭취에 의해 IgE가 감소한다고 보고하고 있으며, Mazzoni 등(39)은 발효에 의해

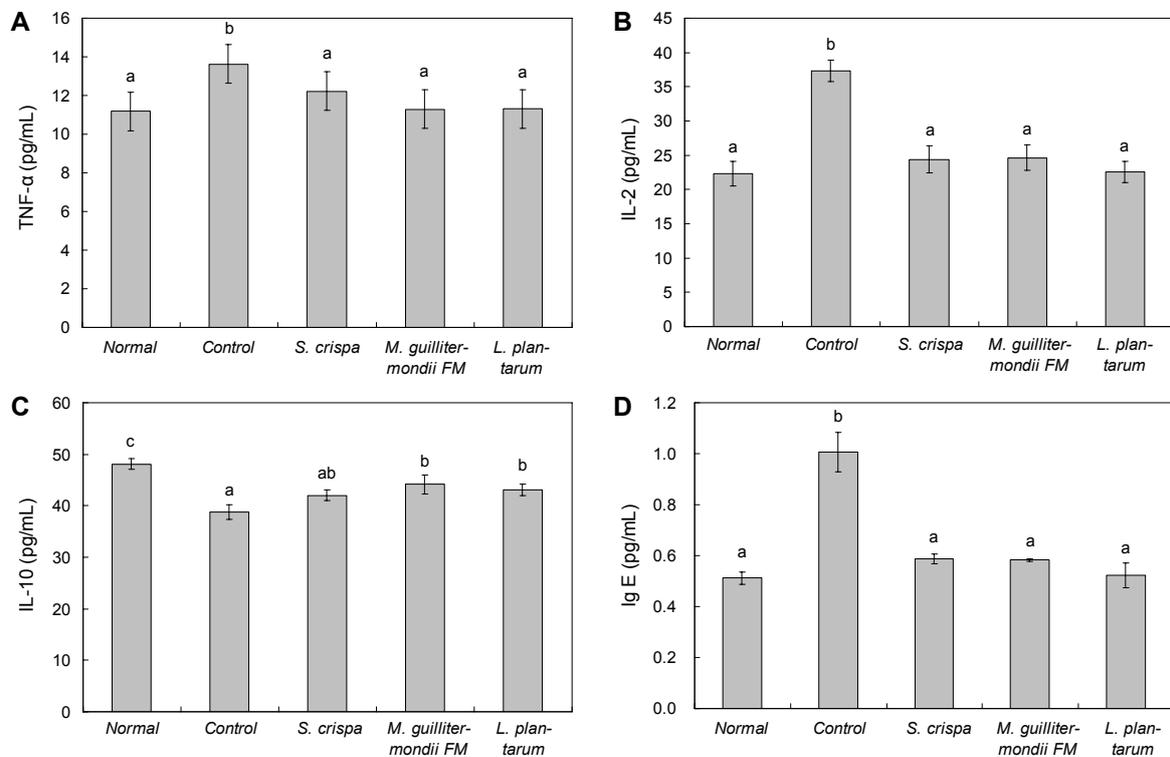


Fig. 6. Effect of *Sparassis crispa* extract and fermented *S. crispa* extract treatments on TNF- α (A), IL-2 (B), IL-10 (C), and IgE (D) in methotrexate-induced immunosuppressed rat. Mean \pm SD (n=6). Different lower case letters (a-c) above the bars denote statistically significant difference ($P < 0.05$).

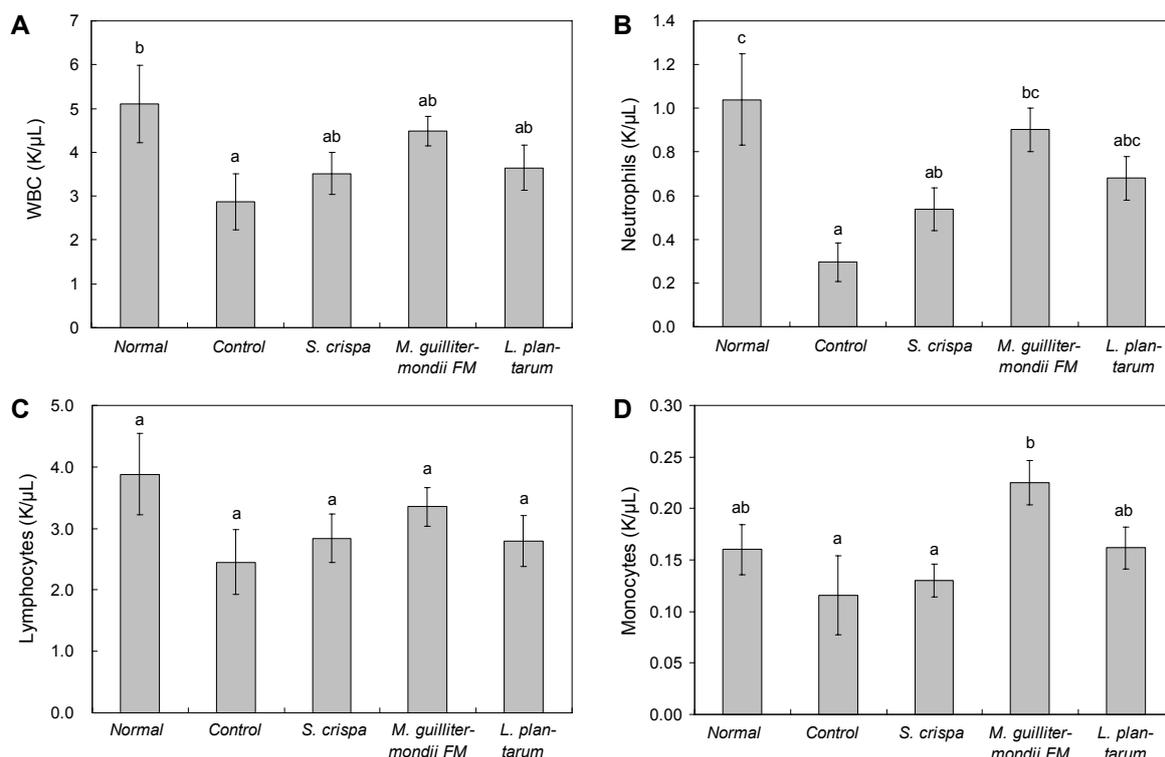


Fig. 7. Changes on the WBC (A), neutrophils (B), lymphocytes (C), and monocytes (D) contents after *S. crispa* extract and fermented *S. crispa* extract treatments in methotrexate-induced immunosuppressed rats. Mean±SD (n=6). Means with the same lower case letters in each sample are not significantly different at $P<0.05$.

생성되는 히스타민이 여러 종류의 사이토카인 생성을 조절하여 IgE 함량의 조절에 관여한다고 보고하고 있다. 꽃송이버섯을 투여할 경우 IgE 함량은 뚜렷한 감소의 경향성을 보였지만 추출물과 발효물 간의 유의적인 차이는 없었다.

혈액 내 백혈구 함량

면역저하를 유발시킨 rat의 혈액 내 백혈구 함량을 Fig. 7에 나타내었다. 혈액 내 백혈구(white blood cell, WBC) 함량은 정상군에서 5.10 K/μL의 함량을 보였으나 MTX에 의해 면역저하를 유발시켰을 경우(대조군) 2.88 K/μL로 유의적으로 감소하였다. 꽃송이버섯 추출물 및 발효물을 투여한 실험구들은 혈액 내의 백혈구 함량이 증가하였고 *M. guilliermondii* FM 발효물을 투여한 군이 가장 높은 값을 보였지만 유의적인 차이는 없었다. 이러한 함량 변화는 호중구(neutrophils), 림프구(lymphocyte), 그리고 단핵구(monocyte)에서도 유사한 변화 패턴을 보였으며, 호중구와 단핵구의 실험 결과에서는 꽃송이버섯 비발효 추출물보다 *M. guilliermondii* FM을 이용한 발효물이 유의적으로 높은 함량을 보였다. 특히 *M. guilliermondii* FM을 이용한 발효물은 *L. plantarum*을 이용한 발효물보다 호중구 함량에서 약 1.32배 높은 값을 보였으며, 단핵구 함량은 정상군보다 높은 함량을 보였다. 주로 과일 표면 등에서 많이 발견되는 자연 균주인 *M. guilliermondii*는 riboflavin(vitamin B₂)을 생산하는 균주로 알려져 있다(40-44). 수용성 비타민 중 하나인

riboflavin은 인체의 면역체계에서 염증을 유발하는 매개체 생산을 억제하는 역할을 하는데(45,46), 특히 식세포의 포식작용을 향상시키고 호중구를 자극하여 면역력을 향상시키는 역할을 한다(47,48). 혈액 중 백혈구 함량 측정 결과 *M. guilliermondii* FM을 이용한 꽃송이버섯 발효물을 투여 받은 rat에서 백혈구 함량이 높게 나온 것은 *M. guilliermondii* FM의 발효과정 중 생합성된 riboflavin이 작용한 결과로 판단되며 이에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 생각한다.

이상의 결과를 종합하면 꽃송이버섯으로부터 분리한 균주인 *M. guilliermondii* FM은 항산화 및 면역 활성 증가를 위한 꽃송이버섯 발효물 제조 시 스타터로 활용 가능할 것으로 생각한다.

요 약

꽃송이버섯에서 분리 선발한 *Meyerozyma guilliermondii* FM을 이용하여 꽃송이버섯 발효물을 제조하고 항산화 활성 및 면역조절 효과를 조사하였다. 꽃송이버섯 발효물 제조 시 *M. guilliermondii* FM은 유산균과 비슷한 생육능력을 보였으며, 5일째에는 오히려 높은 값을 나타내었다. 발효 후 총페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능은 유산균보다 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 면역저하가 유발된 rat에서 비장 무게는 면역을 저하시킨 대조군보다 꽃송이버섯 비발

효 추출물과 발효물 투여군에서 모두 유의적으로 증가하였다. 또한, 꽃송이버섯 발효물 투여에 따라 TNF- α , IL-2, IgE의 수치는 대조군보다 감소하였으며, IL-10은 증가하였으나 꽃송이버섯 비발효 추출물과 발효물 투여 사이의 유의적인 차이는 없었다. *M. guilliermondii* FM을 이용한 꽃송이버섯 발효물을 투여한 실험구는 혈액 내 백혈구 함량이 대조구 및 다른 처리구에 비하여 가장 높은 수치를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청의 산학연협력 첫걸음기술개발사업 [과제번호: C0273637]의 일환으로 수행하였습니다.

REFERENCES

- Han DS, Jeon SW, Kim HJ. 2009. Study on the antioxidant and anticancer effects of extract of stamens of *Nelumbo nucifera* and kaempferol. *Kor J Herbology* 24: 23-33.
- Lee SY, Lee YG, Byeon SE, Han S, Choi SS, Kim AR, Lee J, Lee SJ, Hong S, Cho JY. 2010. Mitogen activated protein kinases are prime signalling enzymes in nitric oxide production induced by soluble β -glucan from *Sparassis crispa*. *Arch Pharm Res* 33: 1753-1760.
- Hong JS, Kim YH, Kim MK, Kim YS, Sohn HS. 1989. Contents of free amino acids and total amino acids in *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Korean J Food Sci Technol* 21: 58-62.
- Lee SK, Yoo YJ, Kim CS. 1989. Studies on the chemical components in *Ganoderma lucidum*. *Korean J Food Sci Technol* 21: 890-894.
- Lee YS, Kim JB, Shin SR, Kim NW. 2006. Analysis of nutritional components of *Lepista nuda*. *Korean J Food Preserv* 13: 375-381.
- Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T. 2001. Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biol Pharm Bull* 24: 820-828.
- Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E. 2006. Effects of β -glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 43: 597-606.
- Xu XM, Jun JY, Jeong IH. 2007. A study on the antioxidant activity of *Hae-Songi* mushroom (*Hypsizigus marmoreus*) hot water extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1351-1357.
- Kim DH, Park SR, Debnath T, Hasnat MA, Pervin M, Lim BO. 2013. Evaluation of the antioxidant activity and anti-inflammatory effect of *Hericium erinaceus* water extracts. *Korean J Med Crop Sci* 21: 112-117.
- Ohno N, Miura NN, Nakajima M, Yadomae T. 2000. Antitumor 1,3- β -glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. *Biol Pharm Bull* 23: 866-872.
- Kim MY, Seguin P, Ahn JK, Kim JJ, Chun SC, Kim EH, Seo SH, Kang EY, Kim SL, Park YJ, Ro HM, Chung IM. 2008. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *J Agric Food Chem* 56: 7265-7270.
- Kim IK, Yun YC, Shin YC, Yoo J. 2013. Effect of *Sparassis crispa* extracts on immune cell activation and tumor growth inhibition. *J Life Sci* 23: 984-988.
- Choi WS, Shin PG, Bok YY, Jun NH, Kim GD. 2013. Anti-inflammatory effects of *Sparassis crispa* extracts. *J Mushroom* 11: 46-51.
- Lim CW, Kang KK, Yoo YB, Kim BH, Bae SH. 2012. Dietary fiber and β -glucan contents of *Sparassis crispa* fruit fermented with *Lactobacillus brevis* and *Monascus pilosus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1740-1746.
- Yoon TJ, Yang WS, Park SM, Jung HY, Lee AN, Jung JH, Kang TB, Yoo YC, Kim JB. 2009. *In vivo* toxicity and immunoadjuvant activity of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract fermented with *Lactobacillus*. *Korean J Food Sci Technol* 41: 560-565.
- Kim KH, Yun YS, Chun SY, Yook HS. 2012. Antioxidant and antibacterial activities of grape pomace fermented by various microorganisms. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1049-1056.
- Chung BH, Seo HS, Kim HS, Woo SH, Cho YG. 2010. Antioxidant and anticancer effects of fermentation vinegars with *Phellinus linteus*, *Inonotus obliquus*, and *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Med Crop Sci* 18: 113-117.
- Jo HG, Choi MH, Shin HJ. 2015. Preparation of fermentation broth of *Sparassis latifolia* containing soluble β -glucan using four *Lactobacillus* species. *J Mushroom* 13: 50-55.
- Jeong DW, Lee JH. 2014. Safety assessment of starters for traditional Korean fermented foods. *Korean J Microbiol Biotechnol* 42: 1-10.
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-243.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Kim NM, Lee JS. 2003. Effect of fermentation periods on the qualities and physiological functionalities of the mushroom fermentation broth. *Korean J Mycol* 31: 28-33.
- Kim EJ, Yoo KH, Kim YS, Seok SJ, Kim JH. 2015. Biological activities of wild *Sparassis crispa* extracts. *Kor J Mycol* 43: 40-46.
- Shin HJ, Oh DS, Lee HD, Kang HB, Lee CW, Cha WS. 2007. Analysis of mineral, amino acid and vitamin contents of fruiting body of *Sparassis crispa*. *J Life Sci* 17: 1290-1293.
- Yang HS, Choi YJ, Oh HH, Moon JS, Jung HK, Kim KJ, Choi BS, Lee JW, Huh CK. 2014. Antioxidative activity of mushroom water extracts fermented by lactic acid bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 80-85.
- Mertin J, Meade CJ, Hunt R, Sheena J. 1977. Importance of the spleen for the immuno-inhibitory action of linoleic acid in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 53: 469-473.
- Bin-Hafeez B, Ahmad I, Haque R, Raisuddin S. 2001. Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. *J Ethnopharmacol* 75: 13-18.
- Ryu HS, Kim KO, Kim HS. 2009. Effects of plant water extract *Codonopsis lanceolata* on mouse immune cell activation *ex vivo*. *Korean J Nutr* 42: 207-212.
- Cho CW, Rhee YK, Kim YC, Han CJ, Shin KS, Hong HD. 2013. Immunomodulatory effects of polysaccharides derived from persimmon leaves on cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Korean J Food Sci Technol* 45: 636-641.
- Chen Y, Tang J, Wang X, Sun F, Liang S. 2012. An immunostimulatory polysaccharide (SCP-IIa) from the fruit of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Int J Biol Macromol* 50: 844-848.
- Balkwill FR, Naylor MS, Malik S. 1990. Tumor necrosis factor as an anticancer agent. *Eur J Cancer Clin Oncol* 26:

- 641-644.
32. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. 1998. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 150: 2659-2667.
33. Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, Gordon S, Guan Y, Peiris JS. 2002. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease?. *Lancet* 360: 1831-1837.
34. Thomas CM, Hong T, van Pijkeren JP, Hemarajata P, Trinh DV, Hu W, Britton RA, Kalkum M, Versalovic J. 2012. Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling. *PLoS One* 7: e31951.
35. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schöpf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, Krutmann J. 1998. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 19: 359-361.
36. Uehara M, Kimura C. 1993. Descendant family history of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 73: 62-63.
37. Horan RF, Schneider LC, Sheffer AL. 1992. Allergic skin disorders and mastocytosis. *J Am Med Assoc* 268: 2858-2868.
38. Lee IH, Lee SH, Lee IS, Park YK, Chung DK, Choue R. 2008. Effects of probiotic extracts of kimchi on immune function in NC/Nga mice. *Korean J Food Sci Technol* 40: 82-87.
39. Mazzoni A, Young HA, Spitzer JH, Visintin A, Segal DM. 2001. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest* 108: 1865-1873.
40. Pelliccia C, Antonielli L, Corte L, Bagnetti A, Fatichenti F, Cardinali G. 2011. Preliminary prospection of the yeast biodiversity on apple and pear surfaces from Northern Italy orchards. *Ann Microbiol* 61: 965-972.
41. Chanprasartsuk OO, Prakitchaiwattana C, Sanguandeekul R, Fleet GH. 2010. Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. *Bioresour Technol* 101: 7500-7509.
42. Burkholder PR. 1943. Synthesis of riboflavin by a yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 29: 166-172.
43. Protchenko OV, Boretsky YuR, Romanyuk TM, Fedorovich DV. 2000. Oversynthesis of riboflavin by yeast *Pichia guilliermondii* in response to oxidative stress. *Ukr Biokhim Zh* 72: 19-23.
44. Tanner FW Jr, Vojnovich C, VAN Lanen JM. 1945. Riboflavin production by *Candida* species. *Science* 101: 180-181.
45. Kodama K, Suzuki M, Toyosawa T, Araki S. 2005. Inhibitory mechanisms of highly purified vitamin B₂ on the productions of proinflammatory cytokine and NO in endotoxin-induced shock in mice. *Life Sci* 78: 134-139.
46. Bertollo CM, Oliveira AC, Rocha LT, Costa KA, Nascimento EB Jr, Coelho MM. 2006. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of riboflavin in different experimental models. *Eur J Pharmacol* 547: 184-191.
47. Osame S, Araki S, Kimura M. 1995. Effects of vitamin B₂ on neutrophil functions in cattle. *J Vet Med Sci* 57: 493-495.
48. Kimura M, Suzuki M, Araki S. 1996. *In vitro* and *in vivo* effects of riboflavin sodium phosphate on the phagocytic activity of peritoneal macrophages in mice. *Anim Sci Technol* 67: 368-373.