

## 버섯균사체 발효 뽕잎 추출물의 항산화 활성

강정훈<sup>†</sup>

청주대학교 바이오메디컬학과  
(2017년 11월 18일 접수: 2017년 12월 6일 수정: 2017년 12월 12일 채택)

### Antioxidant Activity of Mulberry Leaves Extract Fermented by *Hericium erinaceum*

Jung Hoon Kang<sup>†</sup>

Department of Biomedical Science, Cheongju University, Chungbuk 360-764, Korea  
(Received November 18, 2017; Revised December 6, 2017; Accepted December 12, 2017)

**요약** : 본 연구에서는 뽕잎(*Morus alba*)을 노루궁뎅이 버섯균사체(*Hericium erinaceum*)로 발효시킨 열수 추출물(MA-HE)의 항산화 활성을 확인하고자 하였다. MA-HE의 항산화 활성을 DPPH radical, ABTS radical 소거활성 측정을 통해 알아보았다. 그 결과 DPPH radical 소거활성은 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 61.73%, ABTS radical 소거활성은 250  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 97.39%로 나타났다. MA-HE는 DNA의 산화적 손상을 효과적으로 억제하였다. 또한 생체고분자물질인 사람의 혈청단백질의 산화적 손상을 억제하였다. 세포에  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리하였을 때 세포생존율에 비하여 발효물을 100  $\mu\text{g/mL}$  농도로 전 처리한 세포생존율은 8% 증가했으며, 발효물을 50  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리했을 경우 세포 내 활성산소의 축적이 유의적으로 감소되었다. 본 연구 결과는 MA-HE이 항산화 활성을 가지고 있으며 산화적 스트레스에 의해 야기되는 세포 독성에 대한 보호 작용도 뛰어난 것으로 사료되었다.

**주제어** : 뽕잎, 산화적 변형, 생체고분자, 항산화 활성, 활성산소종

**Abstract** : In this study, the hot water extract from Mulberry (*Morus alba*) Leaves fermented with *Hericium erinaceum* mycelium (MA-HE) was assessed for antioxidant activity. Radical scavenging activity of MA-HE evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) radical and 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) radical. MA-HE showed 63% DPPH radical scavenging activity at 500  $\mu\text{g/mL}$  and 98.27% ABTS radical scavenging activity at 250  $\mu\text{g/mL}$ . MA-HE was shown to significantly inhibited DNA strand breakage induced by free radical. MA-HE also inhibited free radical-mediated human serum albumin modification. MA-HE effectively inhibited  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced cell death and significantly increased of the 8% cell survival at 100  $\mu\text{g/mL}$ . MA-HE decreased intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: jhkang@cju.ac.kr)

cells. The results suggested that MA-HE can contribute to antioxidant and protected cells from oxidative stress-induced cell injury.

*Keywords* : Mulberry, oxidative modification, biological macromolecules, antioxidant activity

## 1. 서론

뽕잎 (*Morus alba* L.)은 피자식물의 쐩기풀목 (Urticales), 뽕나무과 (Moraceae), 뽕나무속 (*Morus*)에 속하는 교목성 낙엽수로 열대지방부터 온대지역에 걸쳐 널리 분포하는 식물이다[1]. 우리나라에서 뽕나무는 5속 13종이 분포하고 유전 자원으로 등록된 계통수는 장려품종, 육성계통 및 수집자원을 합해서 615계통이 있으며, 대부분이 수집자원으로 알려져 있다[2]. 과거 뽕잎은 주로 양잠산업용 누에의 먹이로 이용해 왔으나, 현재는 식의약품 소재로 활용하기 위한 연구들이 활발하게 진행되고 있다[3]. 최근 술독을 제거하는 alanine, aspartic acid, glutamic acid의 함량이 높다고 알려져 있으며, 특히  $\gamma$ -aminobutyric acid와 rutin의 함량이 높고, serine과 tyrosine도 상당량 함유되어 있어 노인성 치매와 동맥경화를 예방한다고 알려져 있다[4]. 또한 항암, 항염, 항산화, 항고지혈증 및 혈압조절에 효과가 있는 것으로 알려져 있고[5] 각종 미네랄 중에서도 칼슘과 철분 및 칼륨의 함유량이 높은 것으로 알려져 있다[6]. 따라서 뽕잎에 함유된 다양한 생리활성 물질을 활용하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다[7].

대표적인 약용버섯 중 하나인 노루궁뎅이 버섯 (*Hericium erinaceum*)은 우리나라를 비롯한 중국, 일본 등 북반구 온대지역에 분포되어 있다 [8]. 노루궁뎅이 버섯은 HeLa cell 증식 저해, 신경성장인자 합성 유도 촉진, 면역기능 조절, 항종양 등의 생리활성이 보고되고 있다[9-13]. 최근에는 다양한 식물체에 균사체의 고체배양을 통해 항산화활성, 항암활성 등과 같은 생리활성에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. 수삼을 이용한 여러 가지 균사체 배양물의 면역활성[14,15] 이 보고된 바 있고 인진쑈에 배양한 노루궁뎅이버섯 균사체의 추출물이 숙취와 면역 알코올성 지방간 등에 효과가 있다고 보고된 바 있다[16-18]. 그 밖에 신선초와 신선초박에 배양한 노루궁뎅이 버섯 균사체 추출물의 생리활성을 보고하였고[19],

비타민나무 발효물의 항산화 활성 및 산화적 스트레스에 의한 세포 보호작용도 보고된 바 있다 [20]. 그러나 아직까지 뽕잎에 노루궁뎅이 버섯 균사체로 발효시킨 추출물의 생리활성은 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 뽕잎 천연물배지에 노루궁뎅이 버섯균사체를 배양시켜 제조한 발효물이 항산화 기능이 있는 지를 확인하고자 하였다. 이와 같은 연구는 노루궁뎅이 버섯균사체 발효물을 이용한 기능성 식품 소재 개발 및 산업화에 도움을 줄 것으로 생각된다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험 재료 및 시약

본 실험에 사용한 뽕잎 (*Morus alba*; MA)은 2014년 4월에 강원도 정선군에서 채취한 것을 사용하였으며, 균주로 사용한 노루궁뎅이 버섯 (*Hericium erinaceum*)균사체는 충북농업 기술원 (Chungbuk, Korea)으로부터 분양받아 potato dextrose agar (PDA, Difco, Detroit, MI, USA) 사면배지에서 25°C에서 10일간 배양한 후 4°C에 보존한 노루궁뎅이 버섯균사체를 사용하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), phosphate buffer saline (PBS), human serum albumin (HSA), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dimethyl sulfoxide (DMSO), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate (DCF-DA), 등은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, sodium dodecyl sulfate (SDS)는 Bio-Rad (USA)로부터 구입하였다. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)는 Boehringer Mannheim (GmbH, Germany)에서 구입하여 사용하였고, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)는 Wako(Chuo-Ku, Osaka, Japan)에서 구입하여

사용하였다.

## 2.2. 뽕잎의 발효

뽕잎의 발효는 뽕잎을 수세한 후 실온에서 3-4일간 건조시켜 수분함량을 조절한 다음, 건조물 100 g에 1.5배수의 물을 첨가하여 3시간 침지 시켜준 후 121°C에서 2시간 동안 고압에서 멸균하였다. 멸균시킨 뽕잎을 냉각시킨 후 10% 노루궁뎅이 버섯균사체를 접종하여 25°C에서 60일간 배양기 (multi room incubator, Vision Scientific, Gyeonggi-do, Korea)에 배양하고 60°C에서 2일간 건조시켜 뽕잎 발효물을 제조 하였다. 이와 같은 발효물의 열수 추출물 제조를 위해 뽕잎 발효물 (MA-HE)에 20배의 증류수를 첨가하고 homogenizer (Ultraturrax T-50, Janke & Kunkel GmbH & CO., KG-IKA-Labortechnik, Staufen, Germany)로 5,000 rpm에서 10분간 분쇄한 후 열수 추출하였으며, 여과지 (No. 2, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 잔사와 추출액을 분리하고 잔사는 다시 반복 추출 하였다. 2회 반복 추출 후 열수 추출액을 4°C에서 30분 동안 8,000 Xg로 원심분리하여 불용성 침전물을 제거하고 상층액을 농축 및 동결건조 하여 실험에 사용하였다.

## 2.3. DPPH radical 소거활성

전자공여능 측정에 사용된 DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 자유라디칼로서 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 탈색되는데, 이것은 다양한 천연물로부터 항산화 활성을 검색하는데 많이 사용되고 있다. 0.1 mM DPPH 900  $\mu$ L를 DMSO 50  $\mu$ L와, MA-HE 50  $\mu$ L를 혼합하여 실온에서 20분간 반응 시킨 후 원심분리 (10,000 Xg, 5 min)를 통해 불순물을 제거하고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 다음 식(1)에 의해 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \{1 - (A_{\text{Experiment}}/A_{\text{Control}})\} \times 100 \quad (1)$$

## 2.4. ABTS radical 소거활성

ABTS radical 소거활성을 Brand-Williams 등 [21]의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.5 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 37°C 암실에서 12시간 동안 반응 시킨

후 희석하여 사용하였다. ABTS 900  $\mu$ L에 DMSO 50  $\mu$ L와, MA-HE 50  $\mu$ L를 혼합하여 실온에서 10분간 반응 시킨 후 734 nm에서 흡광도 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 다음 식(2)에 의해 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \{1 - (A_{\text{Experiment}}/A_{\text{Control}})\} \times 100 \quad (2)$$

## 2.5. 생체고분자의 산화적 손상에 대한 보호 작용

### 2.5.1. DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용을 확인하기 위해[22]의 방법을 이용하였다. DNA 손상은 peroxy radical로 유도하였고 용액상에서 peroxy radical을 생성하기 위해 AAPH를 사용하였다. DNA는 pUC19 plasmid DNA를 사용하였다. pUC19(100  $\mu$ g/mL)과 10 mM AAPH를 반응액에 첨가하고 MA-HE를 농도별로 처리하여 37°C에서 2시간 동안 반응 시킨 후 gel electrophoresis를 통해 산화적 손상에 대한 보호 작용을 확인하였다.

### 2.5.2. HSA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

HSA의 산화적 손상도 peroxy radical로 유도하였다. HSA(1 mg/mL)과 50 mM AAPH를 반응액에 넣어 주고 MA-HE를 첨가하여 37°C에서 6시간 동안 반응 시킨 후 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통해 단백질 띠의 형태를 확인하였다.

## 2.6. 세포사멸에 대한 보호 작용

### 2.6.1. 세포배양 및 세포생존율 측정

세포배양을 위해 NIH3T3 fibroblast 세포를 직경 100 mm culture dish에서 10% bovine calf serum (BCS), 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin을 함유한 DMEM 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기(MCO 17AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 37°C로 배양하여 사용하였다. 세포를 96 well plate에 분주하고 12시간 배양 한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(2 mM/mL)을 처리하여 산화적 스트레스에 의한 세포사멸을 유도하였다. 세포의 생존율은 MTT assay를 통해

ELISA reader(Labsystems Multiskan MCC/340)을 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.6.2. 활성산소 생성 관찰

세포내 활성산소 생성 관찰은 DCF-DA염색법을 이용하여 측정하였다[23,24]. 세포를  $3 \times 10^4$  크기로 cover glass위에 깔아준 후 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 배양기를 통해 12시간 배양한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(2 mM/mL)를 처리하여 ROS 생성을 유도하였으며, 2~3회 세척 후 20 μM DCF-DA을 1시간 동안 반응 시킨 후 형광현미경(Nikon eclipse 80i, Tokyo, Japan)을 통해 확인하였다.

### 2.7. 통계처리

실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험값은 3회 이상 반복 실시한 결과를 평균 ±표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 95%( $P < 0.05$ )의 유의수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 구간의 유의적 차이를 검증하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. DPPH radical 및 ABTS radical

#### 소거활성

빵잎 발효물의 항산화 활성 평가는 DPPH와 ABTS를 이용하여 측정하였다. DPPH radical 소거활성의 경우 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid 50 μg/mL 농도에서 79.52%의 DPPH radical 소거활성을 보였으며 빵잎 발효물 250 μg/mL 농도와 500 μg/mL 농도에서 각각 26.53%, 63% 활성을 나타냈다(Fig. 1). 빵잎 발효물의 DPPH radical 소거활성은 같은 농도에서 양성대조군 보다는 낮게 나타났지만 발효물 농도에 비례해서 활성이 증가됨을 알 수 있었다.

ABTS radical 소거활성의 경우에도 DPPH radical 소거활성과 유사한 경향을 보였다. 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid의 ABTS radical 소거활성은 10 μg/mL농도에서 87.69%로 나타났으며 빵잎 발효물의 경우 5 μg/mL의 저 농도에서 23.18%의 활성을 나타내었고, 250

μg/mL 농도에서 98.27%의 활성을 나타냈다(Fig. 2). 빵잎 발효물의 ABTS radical 소거활성도 같은 농도에서 양성대조군 보다는 낮은 것으로 나타났지만 발효물의 농도가 증가함에 따라 활성이 유의하게( $p < 0.01$ ) 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

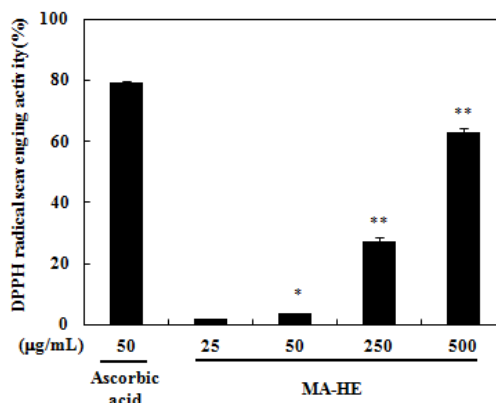


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of fermented *Morus alba* leaves with *Hericium erinaceum* mycelium (MA-HE). The reaction mixture contained 0.1 mM DPPH in the presence or absence of various concentrations of MA-HE at 37°C for 20 min. The values represent the mean ± S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the ascorbic acid treated group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

라디칼 소거활성은 생체 내의 항산화 활성의 지표로 활용되고 있으며[25,26], 다양한 구조와 분자량을 가지는 페놀 및 플라보노이드 화합물은 항산화, 항균, 항암 등의 생리활성을 나타낸다[27]. 또한 빵잎은 목단, 황금, 산수유, 작약과 같은 생약추출물 보다 높은 항산화력을 가진다고 보고된 바 있다[28]. 대표적인 항산화 물질로 알려진 카테킨을 다량 함유하고 있는 녹차의 경우 50.56%의 항산화 활성이 있는 것으로 보고[29]된 것과 비교할 때 빵잎 발효물의 항산화 효과가 낮지 않다는 것을 확인할 수 있었다.

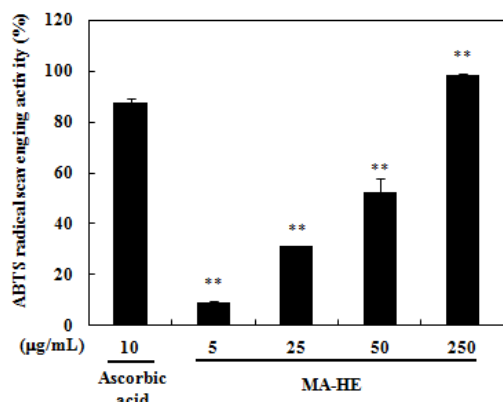


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of fermented *Morus alba* leaves with *Hericium erinaceum* mycelium (MA-HE). The reaction mixture contained 7 mM ABTS and 2.5 mM potassium persulfate in the presence or absence of various concentrations of MA-HE at 37°C for 10 min. The values represent the mean  $\pm$  S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the ascorbic acid treated group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

### 3.4. DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

뽕잎 발효물(MA-HE)이 DNA의 산화적 손상을 억제하는 지를 알아보았다. AAPH는 지질과산화의 initiator로 용액 상에서 산소 radical 중에 하나인 peroxy radical을 생성하는 화학물질로 잘 알려져 있다[30]. Peroxy radical은 지질이나 DNA와 반응하여 산화적 손상을 유도하여 궁극적으로 세포의 기능을 약화시킨다. pUC19 DNA 0.1  $\mu$ g/mL에 산화적 손상을 일으키기 위해 발효물을 처리하지 않은 상태와 처리한 상태에서 10 mM AAPH 처리하여 37°C에서 6시간 반응시켰다. 반응액을 전기영동한 후 agarose gel 상의 DNA 형태를 관찰한 결과 pUC19 DNA는 supercoil form (I)으로 나타났으며(Fig. 3, lane 1), DNA의 산화적 손상이 일어난 경우는 strand breakage (II)가 관찰되었다(Fig. 3, lane 2). 반면 500, 1000  $\mu$ g/mL의 농도로 뽕잎 발효물을 처리했을 때 strand breakage가 효과적으로 억제되었다.

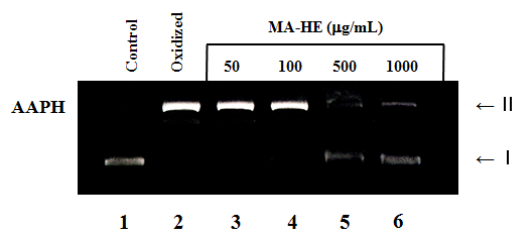


Fig. 3. Protective effects of fermented *Morus alba* leaves with *Hericium erinaceum* mycelium (MA-HE) on DNA strand breakage induced by peroxy radical. pUC 19 DNA was incubated with 10 mM AAPH in the presence of various concentrations of MA-HE at 37°C for 6 h. Lane 1, control DNA; lane 2, lane 1 + AAPH; lane 3, lane 2 + 50  $\mu$ g/mL MA-HE; lane 4, lane 2 + 100  $\mu$ g/mL MA-HE; lane 5, lane 2 + 500  $\mu$ g/mL MA-HE; lane 6, lane 2 + 1000  $\mu$ g/mL MA-HE.

활성산소종들은 생체 내에서 DNA를 변형시킨다는 다수의 보고가 있다. 일반적으로 활성산소에 의한 DNA의 손상이 일어날 경우, DNA cleavage 또는 fragmentation 현상이 일어나며 deoxyguanosine 분자가 8-hydroxy deoxyguanosine으로 변형되는 현상이 일어난다 [31-33]. 이와 같은 현상은 돌연변이나 노화, 암 등과 같은 질병의 원인이 되고 있다[34,35]. 따라서 뽕잎 발효물은 DNA의 산화적 손상을 보호함으로써 노화 및 질병 예방에 도움이 될 것으로 생각된다.

### 3.5. HSA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

HSA 단백질에 peroxy radical을 처리하여 산화적 변형을 유도하고 뽕잎 발효물이 단백질의 변형을 보호하는 지를 알아보았다. HSA 단백질과 50 mM AAPH를 처리하면 HSA 단백질의 펩티드 결합이 파괴되면서 단백질 띠가 거의 사라졌다(Fig. 4A, lane 2). 반면 발효물을 농도별로 처리했을 때는 HSA 단백질 띠의 밀도가 증가하였다. HSA 단백질 띠를 밀도 측정기로 측정한 결과 500  $\mu$ g/mL농도에서 뽕잎 발효물을 처리한 단백질 띠의 밀도가 AAPH만을 처리한 군에 비

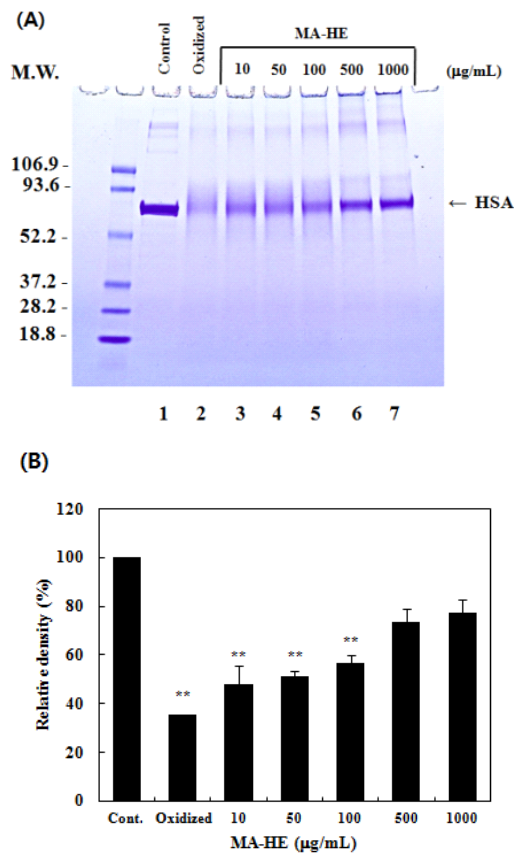


Fig. 4. Protective effects of fermented *Morus alba* leaves with *Hericium erinaceum* mycelium (MA-HE) on oxidative modification of HSA induced by peroxy radical. HSA was incubated with 50 mM AAPH in the presence of various concentrations of MA-HE at 37°C for 6 h. Lane 1, control HSA; lane 2, lane 1 + AAPH; lane 3, lane 2 + 10 µg/mL MA-HE; lane 4, lane 2 + 50 µg/mL MA-HE; lane 5, lane 2 + 100 µg/mL MA-HE; lane 6, lane 2 + 500 µg/mL MA-HE; lane 7, lane 2 + 1000 µg/mL MA-HE. The values represent the mean ± S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. \*p<0.05, \*\*p<0.01

해 38.30% 이상 보호 되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4B). 활성산소 종에 의한 단백질의 손상은 아미노산의 변형[36], 단백질의 cross-linking[37], 단백질의 절단 형태로 나타난다. 특히, 단백질에 대한 산화적 손상은 단백질의 구조와 기능을 변화시키므로 노화 및 많은 질병의 원인이 되고 있다[38,39]. 혈청 단백질의 50~60%를 차지하는 HSA는 혈장삼투압을 조절하며, 비특이적 결합능력이 강해 다양한 내인성 물질들의 운반체로 작용하고, 강력한 항산화 작용 및 free radical 소거활성이 있다고 보고되었다[40]. 혈액 내 활성산소에 의해 산화된 HSA는 산화적 스트레스의 지표가 되며, HSA의 산화적 민감성은 여러 연구 결과에 의해 입증되었다[41]. 또한 산화된 HSA의 수준은 hemodialysis 환자의 신장 기능 장애와 밀접한 연관성이 있다는 사실이 보고되었다[42]. 따라서 뽕잎 발효물은 세포내의 산화적 손상으로부터 단백질을 보호함으로써 단백질 변형으로 인한 여러 비정상적인 생리현상을 억제할 것으로 생각된다.

### 3.6. 세포생존율 측정

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포사멸에 뽕잎 발효물이 어떤 영향을 미치는 지를 관찰하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하기 2시간 전에 뽕잎 발효물을 농도별로 처리하고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 2 mM/mL로 처리하여 배양한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 세포의 생존율은 54.16%로 정상 세포보다 45.25% 감소하였으나 발효물을 100 µg/mL을 처리한 농도에서는 생존율이 55.75%로 세포 보호효과가 있는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 뇌허혈이나 근위축성측삭경화증(ALS)과 같은 병적상태에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 뇌 조직에 과량 축적됨으로서 세포독성을 나타내게 된다[43]. 이러한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포독성은 세포사멸을 촉진시키며, 특히 뇌 조직에서 다량의 iron과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 상호작용을 통해 반응성이 높은 hydroxyl radical을 생성하게 되어 산화적 스트레스에 의한 세포의 사멸이 촉진된다고 보고된 바 있다[44,45].

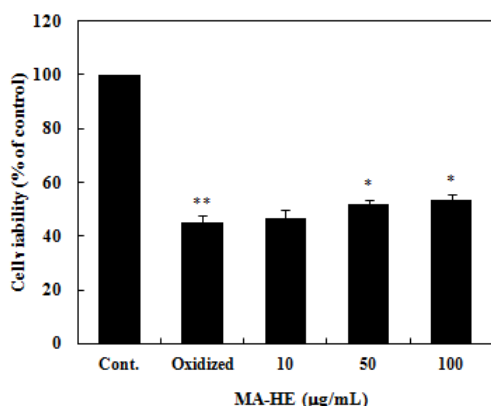


Fig. 5. Protective effects of fermented *Morus alba* leaves with *Hericium erinaceum* mycelium (MA-HE) on cell death induced by  $H_2O_2$ . NIH3T3 fibroblast cells were treated with 2 mM  $H_2O_2$  in the presence or absence of varying concentrations of MA-HE for 24 h, and cell viabilities were estimated by with a colorimetric assay using MTT. The values represent the mean  $\pm$  S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

### 3.7. 활성산소 생성에 대한 영향

세포내 활성산소 생성에 뽕잎 발효물이 미치는 영향을 관찰하였다.  $H_2O_2$ 를 처리하지 않은 세포에서는 활성산소 생성 시 발생하는 형광이 나타나지 않았으나  $H_2O_2$ 를 처리한 세포에서는 형광 정도가 선명하게 나타났다. 이는  $H_2O_2$  처리 세포에서 활성산소가 생성되었음을 나타낸 것이며 여기에 뽕잎 발효물 50  $\mu$ g/mL을 처리한 결과 형광 정도가 현저히 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 6). 이상과 같은 결과들을 통해 뽕잎 발효물은  $H_2O_2$ 에 의해 유도된 세포사멸 억제기능 및 세포 내 활성산소 소거기능이 있으며, 활성산소에 의해 야기되는 노화 및 퇴행성 질환을 예방할 수 있을 것으로 사료된다. 활성산소의 증가는 뇌 해마에서 항산화 수준을 감소시키고 지질과산화물인 malondialdehyde와 caspase-3의 과발현 촉진으로 인한 신경 손상과 사멸을 가속화 시킨다고 알려져 있다[46-48]. 따라서 본 연구 결과는 뽕잎 발효물이 활성산소에 의한 산화적 손상으로부터

세포를 보호하는 것으로 생각되며 활성산소에 의해 야기되는 노화 및 여러 질병을 예방할 수 있는 식품 소재로 이용될 수 있음을 시사한다.

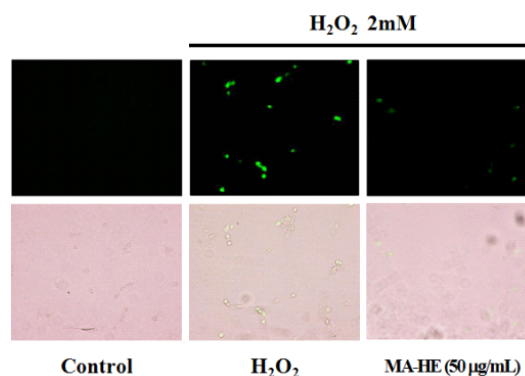


Fig. 6. Protective effects of fermented *Morus alba* leaves with *Hericium erinaceum* mycelium (MA-HE) on the generation of ROS induced by  $H_2O_2$ . NIH3T3 fibroblast cells were treated with 2 mM  $H_2O_2$  in the presence or absence of MA-HE (50  $\mu$ g/mL) for 40 min. Cells were washed then subsequently loaded with 20  $\mu$ M DCF-DA for 30 min and washed again. Intracellular fluorescence images were analyzed by fluorescence microscope.

## 4. 결론

본 연구에서는 뽕잎을 천연물배지로 하여 노루궁뎅이 버섯균사체를 배양 발효시켜 제조한 발효물의 항산화 활성을 확인한 결과, 항산화 활성 및 생체고분자의 산화적 손상에 대한 보호 작용, 세포사멸에 대한 보호 작용을 가지고 있음을 확인하였다.

1. 뽕잎 발효물은 DPPH radical과 ABTS radical 소거활성을 나타냈으며, 발효물의 농도가 증가함에 따라 활성이 유의하게( $p < 0.01$ ) 증가하였다.
2. 뽕잎 발효물은 peroxy radical에 의한 DNA의 산화적 손상과 HSA의 산화적 변형을 억제

하였다.

3. 팥잎 발효물은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포사멸을 억제하여 세포생존율의 유의한 증가를 보였으며, 세포내의 ROS 생성 억제도 현저히 감소시켰다.

이상과 같은 결과를 통해, 노루궁뎅이버섯 균사체-팥잎 발효물은 항산화 활성을 가지며 세포의 산화적 손상을 효과적으로 억제하는 것으로 판단되어 이를 이용한 기능성 식품 개발 및 상업화에 기초적 자료를 제공할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 2016학년도에 청주대학교 산업과학 연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구과제)에 의해 연구되었습니다.

### References

1. C. H. Jeong, O. S. Joo, K. H. Shim, "Chemical components and physiological activities of young mulberry stem", *J. Korean Food Preserv.*, Vol.9, No.2 pp. 228-233, (2002).
2. H. B. Kim, C. K. Kang, G. B. Sung, S. W. Kang, J. R. Lee, "Antioxidative capacity of mulberry leaf and its tea", *J. Seri. Ento. Sci.*, Vol.49, No.1 pp. 18-22, (2007).
3. D. C. Kim, M. J. In, H. J. Chae, "Preparation of mulberry leaves tea and its quality characteristics", *J. Appl. Biol. Chem.*, Vol.53, No.1 pp. 56-59, (2010).
4. J. Y. Chae, J. Y., Lee, I. S. Hoang, D. Whangbo, P. W. Choi, W. C. Lee, J. W. Kim, S. Y. Kim, S. W. Choi, S. J. Rhee, "Analysis of functional components of leaves of different mulberry cultivars", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.32, No.1 pp. 15-21, (2003).
5. M. Y. Park, K. S. Lee, M. K. Sung, "Effects of dietary mulberry, Korean red ginseng, and banana on glucose homeostasis in relation to PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ , and LPL mRNA expressions", *Life Sci.*, Vol.77, No.26 pp. 3344-3354, (2005).
6. J. R. Lee, Y. J. Hah, J. W. Lee, Y. M. Song, S. K. Jin, I. S. Kim, K. H. Hah, S. J. Kwak, "Physico-chemical and sensory properties of emulsified sausages containing mulberry and persimmon leaf powder", *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, Vol.22, No.4 pp. 330-336, (2002).
7. C. Hansawasdi, J. Kawabata, " $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect of mulberry (*Morus alba*) leaves on Caco-2", *Fitoterapia*, Vol.77, No.7-8 pp. 568-573, (2006).
8. M. G. Kang, W. S. Jo, W. H. Kim, S. Y. Choi, S. D. Park, "The difference of occurring pattern of *Hericium erinaceus* by pinheading induction methods", *J. Mushrooms*, Vol.13, No.1 pp. 11-15, (2015).
9. T. Mizuno, T. Wasa, H. Ito, C. Suzuki, N. Ukai, "Antitumor-active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, an edible and medicinal mushrooms called yamabushiotake or houtou", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol.56, No.2 pp. 347-348, (1992).
10. T. Mizuno, "Yamabushitake, *Hericium rinaceum*: Bioactive substances and medicinal utilization", *Food Reviews International*, Vol.11 pp. 173-178, (1995).
11. K. Mori, Y. Obara, M. Hirota, Y. Azumi, S. Kinugasa, S. Inatomi, N. Nakahata, "Nerve growth factor-inducing activity of *Hericium erinaceus* in 1321N1 human astrocytoma cells", *Biol. Pharm. Bull.*, Vol.31, No.9 pp. 1727-1732, (2008).
12. K. Mori, S. Inatomi, K. Ouchi, Y. Azumi, T. Tuchida, "Improving effects of the mushroom Yamabushiotake (*Hericium erinaceus*) on mild cognitive impairment: a double-blind placebo-controlled clinical



- trial”, *Phytoher. Res.*, Vol.23, No.3 pp. 367-372, (2009).
13. H. Kawagishi, A. Shimada, S. Hosokawa, H. Mori, H. Sakamoto, Y. Ishiguro, S. Sakemi, J. Bordner, N. Kojima, S. Furukawa, Erinacines E, F and G, “Stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*”, *Tetrahedron Letters*, Vol.37, No.41 pp. 7399-7402, (1996).
  14. J. H. Ha, H. S. Jeog, S. H. Oh, S. S. Jeong, M. H. Jeong, H. S. Jeong, J. H. Jeong, K. W. Yu, H. Y. Lee, “Comparision of Immuno activities of fresh Ginseng cultured *Phelinus linteus* and *Hericium erinaceum* mycelium associated whit ultrasonification extraction”, *Korean J. Medicinal Crop. Sci.*, Vol.17, No.5 pp. 311-320, (2009).
  15. C. K. Park, H. Kim, Qi. Tu, K. W. Yu, H. S. Jeong, H. Y. Lee, J. H. Jeong, “Chemical composition and immunostimulating activity of the fermented Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) with mushroom mycelium by solid culture”, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.38, No.9 pp. 1145-1152, (2009).
  16. Y. Jang, S. H. Shin, B. I. Choi, D. S. Park, J. H. Jeon, Y. M. Cho, J. H. Cho, D. H. Jung, S. Y. Hwang, B. W. Ahn, M. S. Jeong, J. H. Jeong, Y. B. Kim, “Effects of Erinacol®, Extract of *Hericium erinaceum* Cultivated with *Artemisia iwayomogi*, on Alcoholic Hangover and Immune Function”, *Lab. Anim. Res.*, Vol.22, No.2 pp. 157-163, (2006).
  17. S. H. Shin, J. Y. Jang, B. I. Choi, JH. H. Jeon, H. J. Ji, S. H. Moon, D. H. Jung, Y. G. Yeo, S. J. Baek, S. J. Hwang, J. H. Chung, Y. B. Kim, “Effects of Erinacol®, Extract of *Hericium erinaceum* Cultivated with *Artemisia iwayomogi*, on Alcoholic Fatty Liver”, *Lab. Anim. Res.*, Vol.22, No.2 pp. 165-170, (2006).
  18. B. I. Choi, S. H. Shin, J. Y. Jang, D. S. Park, D. H. Kang, S. S. Nahm, Y. G. Yeo, J. H. Cho, S. Y. Hwang, M. S. Jeong, M. S. Jeong, J. H. Jeong, Y. B. Kim, “Single-and repeated-dose toxicities of Erinacol®, extract of *Hericium erinaceum* cultivated with *Artemisia iwayomogi*, in rats”, *Lab. Anim. Res.*, Vol.22, No.2 pp. 171-179, (2006).
  19. S. C. Kwon, “Biological activities of ethanol extract from *Hericium erinaceum* mycelium on *Angelica keiskei* and *Angelica keiskei* pomace”, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.40, No.12 pp. 1648-1653, (2011).
  20. S. S. Kim, I. G. Kyeong, M. L. Lee, D. G. Kim, J. Y. Shin, J. Y. Yang, G. H. Lee, W. S. Eum, J. H. Kang, “Protective effects of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves fermented with *Hericium erinaceum* mycelium against oxidative modification of biological macromolecules and cell death”, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.44, No.1 pp. 35-43, (2015).
  21. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *Food Sci. Technol.*, Vol.28, No.1 pp. 25-30, (1995).
  22. K. Hiramoto, H. Johkoh, K. Sako, K. Kikugawa, “DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH)”, *Free Radic. Res. Commun.*, Vol.19, No.5 pp. 323-332, (1993).
  23. E. H. Ahn, D. W. Kim, M. J. Shin, Y. N. Kim, H. R. Kim, S. J. Woo, S. M. Kim, J. Kim, J. Park, W. S. Eum, S. Y. Choi, “PEP-1-ribosomal protein S3 protects dopaminergic neurons in an MPTP-induced Parkinson's disease mouse model”, *Free Radic. Biol. Med.*, Vol.55 pp. 36-45, (2013).
  24. M. J. Kim, D. W. Kim, J. H. Park, S. J. Kim, C. H. Lee, J.I. Yong, E. J. Ryu, S. B. Cho, H. J. Yeo, J. Hyeon, S. W. Cho, D. S. Kim, O. Son, J. Park, K. H. Han,

- Y. S. Cho, W. S. Eum, S. Y. Choi, "PEP-1-SIRT2 inhibits inflammatory response and oxidative stress-induced cell death via expression of antioxidant enzymes in murine macrophages", *Free Radic. Biol. Med.*, Vol.63 pp. 432-445, (2013).
25. H. Aoshima, H. Tsunoue, H. HKoda, Y. Kiso, "Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity", *J. Agric. Food Chem.*, Vol.52, No.16 pp. 5240-5244, (2004).
26. H. K. Kim, Y. E. Kim, J. R. Do, Y. C. Lee, B. Y. Lee, "Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants", *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol.27, No.1 pp. 80-85, (1995).
27. Y. J. Oh, H. R. Seo, Y. M. Choi, D. S. Jung, "Evaluation of antioxidant activity of the extracts from the aerial parts of *Cnidium officinale* Makino", *Korean J. of Medicinal Crop. Science*, Vol.18, No.6 pp. 373-378, (2010).
28. B. J. An, J. T. Lee, S. A. Lee, J. H. Kwak, J. M. Park, J. Y. Lee, J. H. Son, "Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korean *Sanguisorba officinalis* L.", *J. Kor. Soc. Apple. Biol. Chem.*, Vol.47, No.2 pp. 244-250, (2004).
29. O. Hassan, L. S. Fan, "The anti-oxidation potential of polyphenol extract from cocoa leaves on mechanically deboned chicken meat (MDCM)", *LWT-Food Sci. Technol.*, Vol.38, No.4 pp. 315-321, (2005).
30. T. A. Dix, J. Aikens, "Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation", *Chem. Res. Toxicol.*, Vol.6, No.1 pp. 2-18, (1993).
31. B. N. Ames, "Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases", *Science*, Vol.221, No.4617 pp. 1256-1264, (1983).
32. P. A. Cerutti, "Prooxidant states and tumor promotion", *Science*, Vol.227, No.4685 pp. 375-381, (1985).
33. J. L. Sagripanti, K. H. Kraemer, "Site-specific oxidative DNA damage at polyguanosines produced by copper plus hydrogen peroxide", *J. Biol. Chem.*, Vol.264, No.3 pp. 1729-1734, (1989).
34. T. Finkel, N. J. Holbrook, "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing", *Nature*, Vol.408, No.6809 pp. 239-247, (2000).
35. S. Kawanishi, Y. Hiraku, S. Oikawa, "Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging", *Mutat. Res.*, Vol.488, No.1 pp. 65-76, (2001).
36. E. R. Stadtman, B. S. Berlett, "Fenton chemistry. Amino acid oxidation", *J. Biol. Chem.*, Vol.266, No.26 pp. 17201-17211, (1991).
37. K. J. Davies, M. E. Delsignore, "Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure", *J. Biol. Chem.*, Vol.262, No.20 pp. 9908-9913, (1987).
38. R. L. Levine, C. N. Oliver, R. M. Fulks, E. R. Stadtman, "Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, Vol.78, No.4 pp. 2120-2124, (1981).
39. A. J. Rivett, R. L. Levine, "Metal-catalyzed oxidation of *Escherichia coli* glutamine synthetase: correlation of structural and functional changes", *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol.278, No.1 pp. 26-34, (1990).
40. M. E. Sitar, S. Aydin, U. Cakatay, "Human serum albumin and its relation with oxidative stress", *Clin. Lab.*, Vol.59, No.9-10 pp. 945-952, (2013)
41. R. E. Racifici, K. J. Davies, "Protein degradation as an index of oxidative stress", *Methods Enzymol.*, Vol.186 pp. 485-502, (1990)
42. H. Terawaki, K. Yoshimura, T. Hasegawa, Y. Matsuyama, T. Neqawa, K. Yamada, M. Matsushima, M. Nakayam, T. Hosoya, S. Era, "Oxidative stress is enhanced in

- correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin”, *Kidney Int.*, Vol.66, No.5 pp. 1988-1993, (2004).
43. D. R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, D. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J. P. O’Regan, H. X. Deng, Z. Rahmani, A. Krizus, D. McKJenna-Yasek, A. Cayabyab, S. M. Gaston, R. Berger, R. E. Tnzi, J. J. Halperin, B. Herzfeldt, R. Van den Bergh, W. Y. Hung, T. Bird, G. Deng, D. W. Mulder, C. Smyth, N. G. Laing, E. Soriano, M. A. Pericak-Vance, J. Hains, G. A. Rouleau, J. S. Gusella, H. R. Horvitz, and R. H. Jr. Brown, “Mutation in Cu,Zn-superoxide dismutase gene are associated wigh familial amyotrophic lateral sclerosis”, *Nature*, Vol.362, No. pp. 59-62, (1993).
  44. B. Halliwell, J. M. Gutteridge, “The importance of free radicals and catalytic metal irons in human disease”, *Mol. Aspects Med.*, Vol.8, No.2 pp. 89-193, (1985).
  45. Z. Radak, S. Kumagai, A. W. Taylor, H. Naito, S. Goto, “Effects of exercise on brain function: role of free radical”, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, Vol.32, No.5 pp. 942-946, (2007).
  46. C. F. Chen, S. Y. Lang, P. P. Zuo, N. Yang, X. Q. Wang, C. Xia, “Effects of D-galactose on the expression of hippocampal peripheral-type benzodiazepine receptor and spatial memory performances in rats”, *Psychoneuroendocrinology*, Vol.31, No.7 pp. 805-811, (2006).
  47. X. Cui, P. Zuo, Q. Zhang, X. Li, Y. Hu, J. Long, L. Packer, J. Liu, “Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid”, *J. Neurosci. Res.*, Vol.83, No.8 pp. 1584-1590, (2006).
  48. W. S. Sun, H. Q. Yu, H. Zhang, Y. L. Zheng, J. J. Wang, L. Luo, “Quercetin attenuates spontaneous behavior and spatial memory impairment in D-galactose-treated mice by increasing brain antioxidant capacity”, *Nutrition Research*, Vol.27, No.3 pp. 169-175, (2007).