

꽃송이버섯 기부 발효물 첨가 사료가 장어의 면역반응에 미치는 영향

김은주¹ · 서승호¹ · 박성은¹ · 강민수² · 손흥석¹

¹동신대학교 한의과대학
²(유)자이아쿠아팜

Effects of Fermented *Sparassis crispa* Stipe Extract Supplemented Diet on the Immune Responses of Philippines Eel, *Anguilla bicolor*

Eun-Ju Kim¹, Seung-Ho Seo¹, Seong-Eun Park¹, Min-Soo Kang², and Hong-Seok Son¹

¹School of Korean Medicine, Dongshin University

²Ziaquaafarm Co., Ltd.

ABSTRACT This study examined the immune response of Philippines eel (*Anguilla bicolor*) to the oral administration of fermented *Sparassis crispa* stipe extract for 6 weeks. The *S. crispa* extract fermented with *Lactobacillus plantarum* showed a higher total phenol content (301.68 ppm) and DPPH radical scavenging activity (63.9%) than those fermented with other strains. Therefore, *L. plantarum* was selected as a suitable starter culture for the fermentation of *S. crispa* stipe. The eels were fed a commercial diet supplemented with 1% of fermented *S. crispa* stipe extract for 6 weeks. The mortality rate of the eels fed the supplemented diet was significantly lower than those of the control after 6 weeks. The lysozyme activity of the serum was increased significantly (12.33 → 54.66 units) after 6 weeks in the eel fed supplemented diets of fermented *S. crispa* stipe. The serum of the eel fed the supplemented diet of the *S. crispa* stipe extract showed higher bactericidal activity. These results suggest that both the *S. crispa* stipe extract and fermented *S. crispa* stipe have strong potential to activate the innate immune response of the Philippines eel.

Key words: *Sparassis crispa* stipe, eel, immune response, fermentation, *Lactobacillus plantarum*

서 론

참장어과(Family Anguillidae)에 속하는 뱀장어는 담수역에서 성장하고 산란을 위해 대양의 각 산란장으로 이동하는 강하성 어류이다(1-3). 뱀장어 어종은 온대 지역과 열대 지역에 걸쳐 19종이 분포하며, 우리나라에는 극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*), 무태장어(*Anguilla marmorata*)가 주로 서식하고 있다(2). 그중 극동산 뱀장어는 다른 어종에 비해 단백질, 지방, 무기질, 비타민 등이 풍부하게 함유되어 있어 동남아시아에서는 기호식품으로 애용되어 왔으나(4), 인공부화를 통한 양식종묘의 양산체계가 확립되지 않은 상태에서 양식 규모의 확대는 자연산 장어의 남획과 함께 채포량의 급격한 감소를 초래하게 되었다(5). 이에 따라 극동산 장어의 CITES(멸종위기에 처한 야생동식물종의 국제거래에 관한 협약)에 대한 국제적 회의도 최근 진행되고 있어, 민물장어 주 소비국 및 양식국인 한국, 일본 등은 극동산 장어 대체로 온대성 장어인 *Anguilla rostrata*, 열대성 장어인

Anguilla bicolor, 동남아산 장어인 *Anguilla marmorata*의 양식을 시도하게 되었다(5). 그러나 온·열대성 장어를 국내 양식장에 입식할 경우 pH나 수질 온도 등의 양식환경 변화로 감염성 질병인 아가미흡충증, 등여웁병, 선충증, 예로모나스병, 에드워드병 등의 감염(6-9)과 비감염성 질병인 암모니아 및 아질산 중독증(6,10-12)과 같은 질병에 노출되어 대량폐사가 종종 발생하고 있다. 이를 해결하기 위해 fluoroquinolone계 항생제나 옥시테트라사이클린(OTC) 같은 항생제를 사용하고 있는데, 내성세균의 증가와 치료약제의 효력 감소 등의 부작용으로 인해 천연물을 이용한 장어의 면역증진을 시도하고 있는 추세이다(13).

꽃송이버섯은 꽃송이버섯과(Sparassidaceae), 꽃송이버섯속(*Sparassis*)에 속하며, 한국, 일본, 중국 등에 서식하고 오래전부터 식용으로 사용되어 왔다(14). 꽃송이버섯은 항암효능(15,16)과 항산화(16), 항염증(17) 등 여러 생리활성 효과가 있다고 보고되고 있으며, 특히 β -glucan 함량이 높아(건조 시료 100 g당 43%) 장내의 유해균 억제, 정상 세포의 면역기능 활성화 등 면역에 탁월한 효능을 보인다고 알려져 있다(18-20). 꽃송이버섯은 버섯의 갓 부분에 해당하는 자실체(pileus)와 자실체를 제외한 부분에 해당하는 기부(stipe)로 구성되어 있지만, 실제 식용으로 활용되는 부위는

Received 28 June 2017; Accepted 25 August 2017

Corresponding author: Hong-Seok Son, School of Korean Medicine, Dongshin University, Naju, Jeonnam 58245, Korea
E-mail: hsson@dsu.ac.kr, Phone: +82-61-330-3513

자실체에 한정되어 있으며, 꽃송이버섯 기부는 대부분 폐기되고 있다. 본 연구팀은 이전 연구에서 꽃송이버섯 자실체와 기부의 성분 분석과 면역조절능 검증을 통해 꽃송이버섯 기부의 활용 가능성을 제시하였다(19).

버섯에 포함된 β -glucan과 같은 다당류는 소화효소로는 잘 분해되지 않으며 이를 보완할 수 있는 기술 중 하나로 미생물의 발효가 주목받고 있다. 여러 미생물이 발효에 활용될 수 있지만 유산균을 이용하여 발효할 경우 면역 활성을 극대화할 수 있는 것으로 많이 알려져 있다(21,22).

따라서 본 연구에서는 폐기되는 꽃송이버섯 기부를 발효하고 장어에 사료 첨가제로 급이하여 생장률, lysozyme 용균 활성, 혈청 살균능을 분석하여 면역증진 효능 및 활용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험 재료

꽃송이버섯은 2016년 백아산꽃송이버섯 영농조합법인(Hwasun, Korea)에서 재배된 것을 생물상태로 구입하여 자실체와 기부로 분리하였다. 실험에 사용된 재료는 꽃송이버섯 기부만 사용하였으며, 분리된 꽃송이버섯 기부는 열풍건조(40°C, 24 h)한 후 분쇄하여 사용하였다. 꽃송이버섯 기부 발효에 사용된 균주는 각각 *Lactobacillus plantarum* KCCM 11322(KCCM, Seoul, Korea), *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116(Lallemand Inc., Montreal, Canada), *Bacillus subtilis* KCTC 1021(KCTC, Jeongeup, Korea) 이었으며, *L. plantarum*은 37°C에서 48시간, *S. cerevisiae*는 30°C에서 48시간 전배양 하였으며, *B. subtilis*는 30°C에서 48시간 진탕 전배양 한 후 종균으로 첨가하였다.

꽃송이버섯 기부 발효물 제조

꽃송이버섯 기부의 열수 추출은 꽃송이버섯 기부 분말에 20배의 증류수를 첨가하고 고압멸균기에서 고압 추출(121°C, 30 min)하였으며, 추출 후 원심분리(2,500 rpm, 15 min) 하여 상등액을 분리하여 사용하였다. 꽃송이버섯 기부 추출물에 각각의 균주를 1% 접종하여 37°C incubator에서 72시간 발효를 진행하였다. 대조구로는 꽃송이버섯 기부 추출물을 사용하였다. 꽃송이버섯 기부 발효물의 생균수는 발효 0, 24, 48, 72시간별로 측정하였으며, 측정방법은 흡광광도계(UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 활용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거 활성 측정

꽃송이버섯 기부 발효물의 총 페놀 함량은 Folin-Denis 법(23)을 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 mL에 증류수 4.5 mL를 넣은 후 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL를 넣고 5분간 반응시켰다. 그리고 7% Na₂CO₃ 5 mL와 증류수 4 mL를 첨가하고 실온에서 90분 반응시켰다. 반응물

은 750 nm에서 흡광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였으며, 표준 곡선은 gallic acid를 이용하여 작성하였다. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거 활성 측정은 Blois(24)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 0.4 mL에 0.4 mM DPPH 용액 1.6 mL를 가하여 10분간 실온에 방치한 다음 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자소거능(%)은 $100 - [(O.D \text{ of sample} / O.D \text{ of control}) \times 100]$ 에 의하여 활성도를 산출하였다.

실험어 및 사육관리

실험어(장어)는 자이아쿠아팜(Naju, Korea)에서 공급받아 사용하였다. 장어는 *A. bicolor*를 필리핀에서 수입하여 시판 배합사료를 공급하여 약 3주간의 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 장어의 초기 평균 무게는 6.7±1.69 g이었으며 총 3개의 1,900 L 원형 폴리프로필렌 수조(순환여과 양식시스템)에 약 1,000마리씩 무작위로 배치하였다. 실험 기간 동안 사육 수조 온도는 28.4±1.1°C를 유지하였으며, 수조 내의 pH는 6.7±0.3으로 유지하였다. 실험 사료 공급은 1일 2회(05:00, 17:00)로 나누어 6주간 반복 공급을 실시하였다. 대조구로 사용된 장어는 시중에 판매되는 배합사료만 공급하였으며, 실험구는 꽃송이버섯 기부 추출물과 *L. plantarum*을 이용하여 37°C에서 72시간 발효한 꽃송이버섯 기부 발효물을 배합사료 대비 1% 첨가하여 배합사료와 혼합 후 공급하였다. 동물실험은 동신대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 수행하였다(동물실험 승인번호: 2017-06-01).

폐사율 측정 및 혈청 수집

폐사율은 실험 기간 동안 폐사한 장어를 개수하여 전체 장어 대비 폐사한 비율을 측정하였다. 장어의 혈청은 Kim 등(25)의 방법을 변형하여 수집하였다. 사육 6주차의 장어를 수조에서 분리하고 얼음으로 마취시킨 뒤 어미에서 약 1 cm 떨어진 부위를 멸균된 가위로 절단하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 1시간 동안 실온에서 방치 후 원심분리(6,000 rpm, 10 min) 하여 혈청을 분리하였으며, 분리된 혈청은 -20°C에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

비특이적 면역분석

장어의 비특이적 면역분석은 혈청 내 lysozyme activity와 *Escherichia coli* 살균능을 측정하였다. 혈청 내 lysozyme activity는 *Micrococcus lysodeikticus*(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 0.005 M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)에 현탁시켜 흡광도 530 nm에서 0.7이 되도록 준비한 후, 현탁액 450 μ L에 혈청 100 μ L를 혼합하고 20°C에서 30초 및 4분 30초 동안 반응시킨 다음 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. Lysozyme activity는 30초 반응 후 흡광도 0.001 감소시키는 값을 1 unit으로 환산하여 나타내었다(24). 혈청 살균능은 Yoo 등(26)의

방법을 변형하여 측정하였다. *E. coli*를 tryptic soy agar (TSA) 배지에 배양(37°C, 24 h)한 후 백금을 이용하여 멸균생리식염수와 1 µg/mL로 희석하였다. 그 후 0.005 M PBS에 1:4로 희석된 혈청 희석액과 1:1로 혼합한 후 0, 1, 3, 6, 24시간 간격으로 TSA 배지에 계대배양 하여 생균수를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3반복하였으며, SPSS Statistics 22.0 Version(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 일원배치 분산분석(ANOVA)을 실시하였고, Duncan’s multiple range test를 통해 95%의 신뢰 수준($P < 0.05$)에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

생균수

꽃송이버섯 기부 발효에 적합한 균주를 선발하기 위해 발효 기간별 생균수를 600 nm의 흡광도에서 측정하였다(Fig. 1). 발효 초기(0시간)의 흡광도는 0.308이었으며, 24시간 경과 후 1.112~1.388로 급격한 증가를 했고 발효 종료 후(72시간)에는 1.310~1.420의 흡광도를 보여 모든 균주가 꽃송이버섯 기부 추출물의 환경에서 영양물질의 공급 없이도 안정적으로 발효를 진행하는 것으로 나타났다. 균주에 따른 생균수는 *L. plantarum*이 발효 24시간에 1.388로 발효 초기보다 1.080 증가한 흡광도를 보였으며, 48시간 경과 후에는 1.486으로 가장 높은 생균수를 보였다가 이후 감소하여 72시간에는 1.310의 흡광도를 보였다. 이러한 결과는 *L. plantarum*으로 발효시킨 실험구가 발효 시작 후 24시간 동안 대수기(exponential phase)에 이르러 가장 활발한 발효를 보이며 48시간까지 성장하였다가, 이후 정체기(stationary phase) 및 사멸기(death phase)에 이른 결과로 판단된다. 꽃송이버섯 기부 추출물을 *S. cerevisiae*와 *B. subtilis*로 발효한 실험구의 경우 발효 시작 후 24시간 동안 급

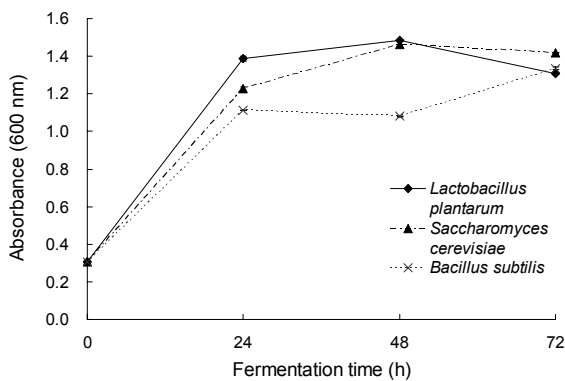


Fig. 1. Changes in cell counts of *S. crista* stipe extract during fermentation. Mean±SD (n=3). The growth curves were obtained by optical density measurements at 600 nm.

격히 증가하여 *L. plantarum*과 유사한 패턴을 보였고, *B. subtilis*의 경우 발효 72시간까지도 생균수가 증가하는 결과를 보였다. 꽃송이버섯 기부 발효물을 장어에 급이할 경우 생균제의 기능을 갖기 위해서는 최소 24시간 이상 발효가 필요할 것으로 생각되며, 이때 꽃송이버섯 기부 발효물의 생균수는 log 8 CFU/mL 이상이었다(data not shown).

총 페놀 함량

버섯 내 총 페놀 함량의 경우 품종, 생육 배지, 기질 조성, 수확 시기, 재배법 등의 생육인자에 따라 달라지는 것으로 알려져 있으며, 버섯의 부위에 따라서도 총 페놀 함량이 달라지는 것으로 알려져 있다(27-29). 꽃송이버섯의 부위별 총 페놀 함량은 자실체보다 기부의 함량이 더 높은 것으로 알려져 있다(22). 이러한 꽃송이버섯 기부를 균주별로 발효했을 때 총 페놀 함량 결과를 Fig. 2에 나타내었다. *L. plantarum*과 *S. cerevisiae*로 발효한 실험구의 총 페놀 함량이 각각 301.68 ppm, 299.35 ppm으로 대조구에 비해 약 25.44 ppm(*L. plantarum*), 23.11 ppm(*S. cerevisiae*) 증가한 결과를 보였다. 그중 가장 높은 총 페놀 함량을 보인 *L. plantarum*은 식품 기질에 존재하는 일부 페놀 화합물(hydroxycinnamic 및 benzoic acids)을 분해하는 균주로 보고되고 있는데(30), 대표적으로 가수 분해성 탄닌을 항산화 효과가 우수한 gallic acid로 분해하는 균주로 알려져 있다(31). 꽃송이버섯을 유산균으로 발효하여 총 페놀 함량을 실험한 Lee 등(32)은 발효된 꽃송이버섯의 총 페놀 함량이 124.72 mg/g으로 발효하지 않은 대조구(133.64 mg/g)에 비해 감소한다고 보고하고 있으며 이는 유산균이 페놀 화합물을 분해한다는 Rodriguez 등(30)과 Osawa 등(31)의 결과와 유사하다. 이와 대조적으로 Hernández 등(33)과 Escudero-López 등(34)은 베타카로틴, 폴리페놀, 플라보노이드 등의 화합물이 유산균 발효를 통해 증가한다고 보고하였으며, Park 등(35)의 연구에서도 꽃송이버섯을 유산균으로 발효하였을 때 총 페놀 함량이 증가하는 결과를 보여 본 연구

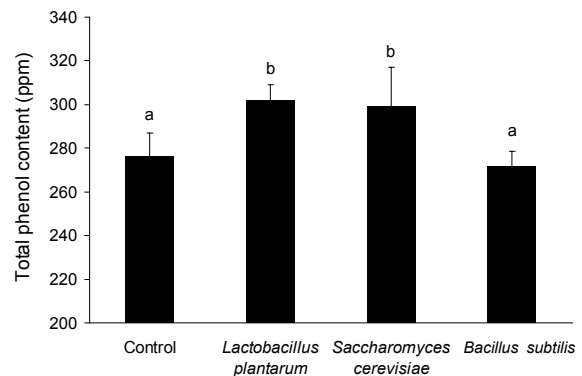


Fig. 2. Total phenol contents of *S. crista* stipe extract fermented with three different microbial strains. Mean±SD (n=3). The small letters above the bars represent statistically significant values ($P < 0.05$).

결과와 유사한 결과를 보였다. 식품 내 페놀 화합물과 *L. plantarum* 발효의 관계에 대해 연구한 Rodriguez 등(36)은 *L. plantarum*은 tannase, p-coumaric acid decarboxylase (PAD), benzyl alcohol dehydrogenase의 일부 페놀 화합물 분해 효소에만 유전적으로 특성화된 반면, 대부분의 페놀 화합물에 대한 효소 활성은 생화학적으로 밝혀지지 않았다고 보고하고 있다. *L. plantarum*이 일부 페놀성 화합물을 분해하는 대사 능력은 갖추고 있지만, 발효 결과 총 페놀 함량과 항산화 효과가 증가하는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

DPPH 라디칼 소거 활성

꽃송이버섯 기부 추출물을 균주를 달리하여 발효했을 때 DPPH 라디칼 소거 활성 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 발효 전의 항산화 활성은 52.6%였으며, 발효 72시간 이후 58.5~63.9%의 활성을 보여 모든 균주에서 발효를 통해 꽃송이버섯 기부의 항산화 활성이 증가한 값을 나타내었다. 균주별로 살펴보면 *L. plantarum*으로 발효한 실험구가 63.9%로 가장 높은 활성을 나타내어 대조군과 유의적 차이를 보였고, *S. cerevisiae*(60.2%), *B. subtilis*(58.5%)로 발효한 실험구는 발효 전의 대조군과 유의적 차이는 없었다. 유산균 발효에 의한 버섯 추출물의 항산화 활성을 연구한 Yang 등(37)은 상항버섯, 영지버섯, 표고버섯이 유산균 발효 때문에 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가하는 것을 확인하였으며, Park 등(35)의 연구 결과에서도 꽃송이버섯을 유산균 발효하였을 때 항산화 활성이 증가하는 결과를 보여 본 연구의 *L. plantarum*의 결과와 유사하였다. 일반적으로 식품 내의 hydroxyl 라디칼은 생체 분자의 산화 손상을 일으키는 가장 유해한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 보고되고 있으며, 이러한 hydroxyl 라디칼은 주로 Fe^{2+} , Cu^{2+} 와 같은 전이 금속의 Fenton 반응에서 기인한 것으로 알려져 있다(38). 유산균은 발효과정 중 Fenton 반응에 참여하는 금속이온을 제거하여 항산화 활성을 가지는 것으로 알려져 있으며(39,40), 그중 *L. plantarum*은 발효과정 중

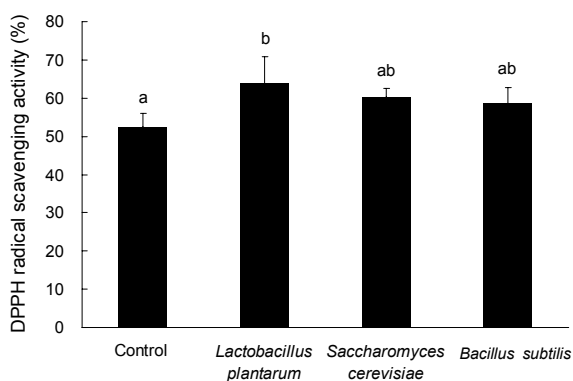


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of *S. crista* stipe extract fermented with three different microbial strains. Mean±SD (n=3). The small letters above the bars represent statistically significant values ($P<0.05$).

Fe^{2+} 을 제거하여 강력한 hydroxyl 라디칼 소거 활성을 보여 항산화 효과가 증가하는 것으로 알려져 있다(38). 이상의 결과를 종합했을 때 가장 빠른 발효속도와 우수한 항산화 활성을 보인 *L. plantarum*을 장어 사육실험의 균주로 선택하였고, 이를 이용하여 꽃송이버섯 기부 추출물을 발효하여 장어에 급이하고 효능을 검토하였다.

장어 폐사율

장어의 양식 수조별 폐사 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 꽃송이버섯 기부 추출물 및 발효물을 사료 첨가제로 급이한 양식 수조에서는 6주간 폐사가 각각 24마리와 30마리로 일반 배합사료만 공급한 대조구의 60마리에 비해 낮은 폐사율을 보였다. Jeon 등(41)은 김치 유산균 배양물을 배합사료에 첨가하여 넙치에게 공급하고 생존율을 측정했을 때 유산균에 의한 효과를 보이지 않았다고 보고하고 있어 본 연구 결과와는 대조적이지만, 유산균 등의 생균제 급이는 면역증진에 효능을 보인다고 알려져 있다(21). 또한, 꽃송이버섯이 함유한 1,3- β -glucan은 비장 세포를 자극하여 TNF- α , IFN- γ 와 같은 사이토킨 생성을 자극하며, 인간과 동물의 면역체계에서 백혈구와 관련된 면역계를 활성화하는 것으로 알려져 있다(19,42,43). 본 연구 결과 대조구 수조보다 실험수조의 장어 폐사가 감소한 것은 이러한 꽃송이버섯의 효과로 보이며, 꽃송이버섯 발효물 급이를 통해 폐사율 감소에 더 영향을 주지는 않는 것으로 보인다. 꽃송이버섯을 발효시키는 것이 장어의 폐사율 감소에 영향을 주는지 명확하게 규명하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Lysozyme 용균 활성

Lysozyme은 백혈구, 혈액, 체표면 등에 있는 효소로써 용균효과를 보이며, 어류의 생체방어에 중요한 역할을 한다고 알려져 장어의 비특이적 체액성 면역 활성을 알아보기 위해 측정하였다(44). 꽃송이버섯 기부 추출물 및 발효물을 배합사료와 혼합하여 급이한 장어 혈청의 lysozyme 용균

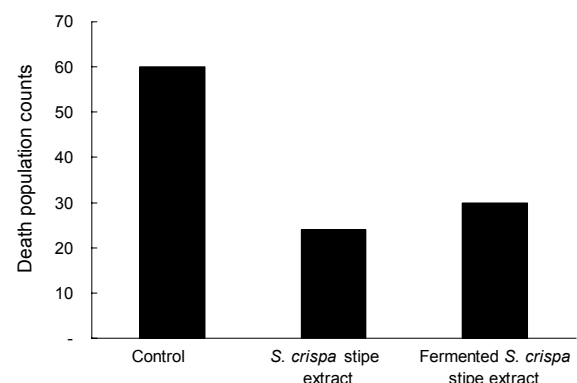


Fig. 4. Number of dead Philippine eel (*A. bicolor*) fed supplemented experimental diets. About 1,000 eels were bred with a commercial diet supplemented with 1% of *S. crista* stipe extract and fermented *S. crista* stipe extract for 6 weeks.

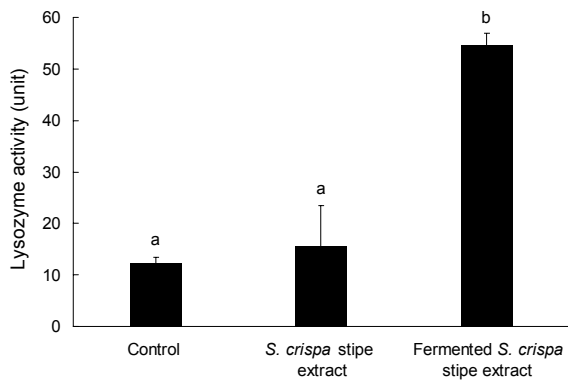


Fig. 5. Lysozyme activity in the serum of Philippines eel (*A. bicolor*) fed supplemented experimental diets. Eels were bred with a commercial diet supplemented with 1% of *S. crispa* stipe extract and fermented *S. crispa* stipe extract for 6 weeks. Mean±SD (n=3). The small letters above the bars represent statistically significant values ($P<0.05$).

활성 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 일반 배합사료를 급여한 장어의 lysozyme 용균 활성은 12.33 unit으로 가장 낮은 활성을 보였으며, 꽃송이버섯 발효물을 급여한 실험구가 54.66 unit으로 가장 높은 활성을 보여, 유산균 발효가 장어의 lysozyme 용균 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. β -Glucan을 넉치에 투여한 Kim 등(45)의 연구에서는 β -glucan 함량에 따라 lysozyme의 활성이 높아진 결과를 보였고, Jhon 등(46)의 연구에서는 한약재를 기질로 배양한 유산균 첨가가 넉치의 lysozyme의 활성에 긍정적인 효과를 보이는 것으로 보고하고 있다. 하지만 본 연구에서는 꽃송이버섯 추출물을 급여한 실험구는 대조구와 유의적인 차이가 없었다.

혈청 살균능

장어의 세균성 감염에 대한 저항성을 측정하기 위해 *E. coli* 살균능을 측정하였다. 꽃송이버섯 기부 추출물과 발효물을 급여한 장어의 혈청 살균능 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 일반 배합사료만을 공급한 대조구의 혈청을 첨가하여 *E. coli*를 배양한 경우 24시간 경과 후 생균수는 7.20 log CFU/mL로 가장 많은 생균수를 보였고, 꽃송이버섯 기부 발효물을 급여한 실험구는 7.11 log CFU/mL였으며, 꽃송이버섯 기부 추출물을 급여한 실험구는 6.75 log CFU/mL로 가장 적은 *E. coli* 생균수를 보였다. Park 등(47)은 버섯의 추출물이 *E. coli*에 높은 항균 활성을 보인다고 보고하였으며, Kim 등(25)은 연구에서는 효모 유래 β -glucan 농도에 비례하여 *E. coli*에 대한 항균 활성이 증가하는 것으로 보고하였다. 또한, *L. plantarum*의 대사과정에서 생성되는 lactic acid는 *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* 등의 박테리아 외막의 투과성 및 pH에 관여하여 항균효과를 증진한다는 보고(48)가 있지만, 본 연구에서는 꽃송이버섯 발효물을 급여한 실험구는 대조구와 유의적인 차이가 없었다.

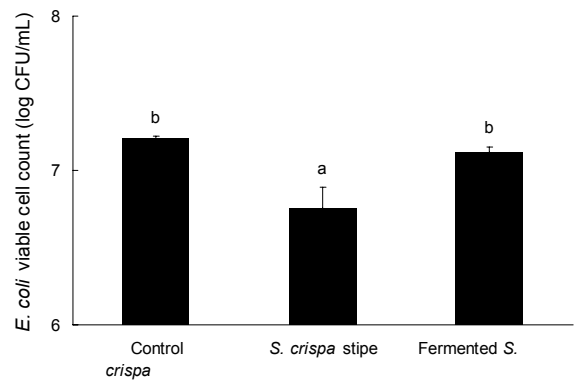


Fig. 6. Viable cell counts of *E. coli* after 24 hours culture with serum from Philippines eel (*A. bicolor*). Eels were bred with a commercial diet supplemented with 1% of *S. crispa* stipe extract and fermented *S. crispa* stipe extract for 6 weeks. Mean±SD (n=3). The small letters above the bars represent statistically significant values ($P<0.05$).

장어 혈청의 lysozyme activity는 꽃송이버섯 발효물을 급여한 실험구에서만 효능을 보였으며, *E. coli*에 대한 혈청 살균능은 꽃송이버섯 추출물을 급여한 실험구에서만 유의적인 차이를 보였지만 꽃송이버섯이 장어의 폐사율 감소에는 꽃송이버섯 추출물과 발효물을 급여한 실험구에서 모두 감소된 값을 보였다. 따라서 폐기되고 있는 꽃송이버섯 기부 추출물 및 발효물의 급여는 장어의 비특이적 면역 활성의 증진에 효과적인 것으로 판단되며, 이는 수입산 장어의 집단 폐사 방지에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 폐기되고 있는 꽃송이버섯 기부 발효에 적합한 균주 선별을 위해 *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*를 활용하여 발효를 진행하였으며, 생균수 실험 결과 *L. plantarum*이 발효 48시간에 1.486의 흡광도를 보여 빠른 발효속도와 생육능을 보였다. 총 페놀 함량은 *L. plantarum*과 *S. cerevisiae*를 활용하여 발효한 실험구에서 301.68 ppm, 299.35 ppm으로 발효 전보다 높은 함량을 보였으며, *B. subtilis* 발효 실험구는 큰 차이를 보이지 않았다. DPPH 라디칼 소거 활성은 *L. plantarum*이 63.9%로 가장 우수한 항산화 활성을 보여 *L. plantarum*을 이용하여 꽃송이버섯 기부를 발효한 후 장어에 사료 첨가제로 급여하였다. 6주간 장어의 폐사는 대조구에서 60마리로 가장 많은 폐사를 보였으며, 꽃송이버섯 기부 추출물이 24마리로 가장 적은 폐사를 보였다. 장어 혈청의 lysozyme 용균 활성 및 *E. coli* 살균능은 꽃송이버섯 기부 추출물과 발효물 모두 대조구에 비해 높은 활성을 보였다.

REFERENCES

1. Kim HY, Shin JW, Sim GC, Park HO, Kim HS, Kim SM,

- Cho JS, Jang YM. 2000. Comparison of the taste compounds of wild and cultured eel, puffer and snake head. *Korean J Food Sci Technol* 32: 1058-1067.
2. Kim DJ, Lee NS, Kim SK, Lee BI, Seong KB, Kim KK. 2013. Effects of water temperature and estradiol-17 β on the sex ratio and growth of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J Life Sci* 23: 1454-1459.
 3. Miller MJ. 2003. The worldwide distribution of Anguillid leptocephali. In *Eel Biology*. Aida K, Tsukamoto K, Yamachi K, eds. Springer-Verlag, Tokyo, Japan. p 157-168.
 4. Cho HS, Choi JH, Ko HB, Seo JS, Ahn JC. 2011. Evaluation of major nutrients of domestic farmed eels *Anguilla japonica*. *Korean J Fish Aquat Sci* 44: 237-242.
 5. Ahn JC, Chong WS, Na JH, Yun HB, Shin KJ, Lee KW, Park JT. 2015. An evaluation of major nutrients of four farmed freshwater eel species (*Anguilla japonica*, *A. rostrata*, *A. bicolor pacifica* and *A. marmorata*). *Korean J Fish Aquat Sci* 48: 44-50.
 6. Kim WS, Ok HN, Kim DH, Kim HY, Oh MJ. 2011. Current status of pathogen infection in cultured eel *Anguilla japonica* between 2000 and 2010. *J Fish Pathol* 24: 237-245.
 7. Chun SK. 1988. Detection and control of bacterial diseases of cultured fishes in Korea. *J Fish Pathol* 1: 5-30.
 8. Kim YG, Kim EB, Kim JY, Chun SK. 1989. Studies on a Nematode, *Anguillicola crassa* parasitic in the air bladder of the eel. *J Fish Pathol* 2: 1-18.
 9. Han JJ, Park SW, Kim YG. 2000. Studies on monogenean trematodes classification from cultured freshwater fishes in Korea 1. Monogenean trematodes from *Anguilla japonica* and *Parasilurus asotus*. *J Fish Pathol* 13: 75-86.
 10. Joh SJ, Kwon YK, Kim MC, Kim MJ, Kwon HM, Park JW, Kwon JH, Kim JH. 2007. *Heterosporis anguillarum* infections in farm cultured eels (*Anguilla japonica*) in Korea. *J Vet Sci* 8: 147-149.
 11. Yang HC, Chun SK. 1991. On the histopathological changes and methemoglobinemia to nitrite toxicity in the culture farms of eel, *Anguilla japonica*. *J Fish Pathol* 4: 1-13.
 12. Kim MS, Yang HC. 1996. Histopathological study of acute toxicity of ammonia to the eel, *Anguilla japonica* in high temperature and pH levels. *J Fish Pathol* 9: 147-155.
 13. Jo MR, Park KBW, Lee HJ, Kim JH, Lee TS, Jung SH, Lee DS, Yoon HD, Kim PH. 2010. Distribution of fluoroquinolones in the carp (*Cyprinus carpio*) and eel (*Anguilla japonica*) following their oral administration. *Korean J Fish Aquat Sci* 43: 623-628.
 14. Lee YG, Thi NN, Kim HG, Lee DY, Lee SE, Kim GS, Baek NI. 2016. Ergosterol peroxides from the fruit body of *Sparassis crispa*. *J Appl Biol Chem* 59: 313-316.
 15. 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.
 16. Choi WS, Shin PG, Bok YY, Jun NH, Kim GD. 2013. Anti-inflammatory effects of *Sparassis crispa* extracts. *J Mushrooms* 11: 46-51.
 17. Guillamón E, García-Lafuente A, Lozano M, D'Arrigo M, Rostagno MA, Villares A, Martínez JA. 2010. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia* 81: 715-723.
 18. Kim HS, Kim JY, Ryu HS, Park HG, Kim YO, Kang JS, Kim HM, Hong JT, Kim Y, Han SB. 2010. Induction of dendritic cell maturation by β -glucan isolated from *Sparassis crispa*. *Int Immunopharmacol* 10: 1284-1294.
 19. Seo SH, Park SE, Moon YS, Lee YM, Na CS, Soon HS. 2016. Component analysis and immuno-stimulating activity of *Sparassis crispa* stipe. *Korean J Food Sci Technol* 48: 515-520.
 20. Cheong JC, Park JS, Hong IP, Seok SJ, Jhune CS, Lee CJ. 2008. Cultural characteristics of cauliflower mushroom, *Sparassis crispa*. *Korean J Mycol* 36: 16-21.
 21. Kim SY, Shin KS, Lee H. 2004. Immunopotentiating activities of cellular components of *Lactobacillus brevis* FSB-1. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1552-1559.
 22. Park SH, Kim YA, Lee DK, Lee S, Chung MJ, Kang BY, Kim K, Ha NJ. 2007. Antibacterial activity and macrophage activation of lactic acid bacteria. *J Environ Toxicol* 22: 287-297.
 23. AOAC. 1980. *Official methods of analysis*. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 31.
 24. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 25. Kim JD, Woo SH, Kim YC, Lee JH, Cho YC, Choi SM, Park SI. 2008. The effects of yeast β -glucan in the diet on immune response of Japanese eel, *Anguilla japonica*, by oral administration. *J Fish Pathol* 21: 219-228.
 26. Yoo BH, Park SI, Chun SK. 1992. Bactericidal action by complement of fish serum. *J Fish Pathol* 5: 9-18.
 27. Hong MH, Jin YJ, Pyo YH. 2012. Antioxidant properties and ubiquinone contents in different parts of several commercial mushrooms. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1235-1241.
 28. Barros L, Ferreira MJ, Queirós B, Ferreira ICFR, 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.
 29. Nowacka N, Nowak R, Drozd M, Olech M, Los R, Malm A. 2014. Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. *LWT - Food Sci Technol* 59: 689-694.
 30. Rodríguez H, Landete JM, de las Rivas B, Muñoz R. 2008. Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748^T. *Food Chem* 107: 1393-1398.
 31. Osawa R, Kuroiso K, Goto S, Shimizu A. 2000. Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods. *J Appl Environ Microbiol* 66: 3093-3097.
 32. Lee JJ, Son HY, Choi YM, Cho JH, Min JK, Oh HK. 2016. Physicochemical components and antioxidant activity of *Sparassis crispa* mixture fermented by lactic acid bacteria. *Korean J Food Preserv* 23: 361-368.
 33. Hernández T, Estrella I, Pérez-Gordo M, Alegría EG, Tenorio C, Ruiz-Larrea F, Moreno-Arribas MV. 2007. Contribution of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the changes in the nonanthocyanin polyphenolic composition of red wine. *J Agric Food Chem* 55: 5260-5266.
 34. Escudero-López B, Cerrillo I, Herrero-Martín G, Hornero-Méndez D, Gil-Izquierdo A, Medina S, Ferreres F, Berná G, Martín F, Fernández-Pachón MS. 2013. Fermented orange juice: source of higher carotenoid and flavanone contents. *J Agric Food Chem* 61: 8773-8782.
 35. Park SE, Seo SH, Moon YS, Lee YM, Na CS, Son HS. 2016. Antioxidant and immunological activities of *Sparassis crispa* fermented with *Meyerozyma guilliermondii* FM. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 1398-1405.
 36. Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, de las Rivas B, de Felipe FL, Gómez-Cordovés C, Mancheño JM, Muñoz R. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 132: 79-90.

37. 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.
38. Li S, Zhao Y, Zhang L, Zhang X, Huang L, Li D, Niu C, Yang Z, Wang Q. 2012. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chem* 135: 1914-1919.
39. Lin MY, Yen CL. 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J Agric Food Chem* 47: 1460-1466.
40. Lee J, Hwang KT, Chung MY, Cho DH, Park CS. 2005. Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to reactive oxygen species (ROS): role for a metal ion chelating effect. *Food Sci* 70: m388-m391.
41. Jeon GH, Cho SH, Kim HS, Myung SH, Kim HJ, Jung WG, Park BH, Lee KJ. 2013. Effects of the inclusion of Kimchi lactic acid bacterial culture in extruded pellets on the growth, body composition and immune response of Juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 46: 552-558.
42. Shibata A, Hida TH, Ishibashi KI, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. 2012. Disruption of actin cytoskeleton enhanced cytokine synthesis of splenocytes stimulated with beta-glucan from the cauliflower medicinal mushroom, *Sparassis crispa* Wulf.:Fr. (higher basidiomycetes) *in vitro*. *Int J Med Mushrooms* 14: 257-269.
43. Harada T, Miura N, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N. 2002. Effect of SCG, 1,3- β -D-glucan from *Sparassis crispa* on the hematopoietic response in cyclophosphamide induced leukopenic mice. *Biol Pharm Bull* 25: 931-939.
44. Nam HJ, Park KI, Choi MS. 2014. Effects of propolis extracts on the immune response in cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Fish Pathol* 27: 47-56.
45. Kim MC, Kim MJ, Kim JS, Heo MS. 2007. Effect of culture broth from mushroom mycelium on growth and non-specific immune parameters in flounder (*Paralichthys olivaceus*) by oral administration. *J Life Sci* 17: 1434-1440.
46. Jhon BK, Kim MC, Kim YH, Heo MS. 2009. Effects of the culture broth of lactic acid bacteria cultured in herb extracts on growth promotion and nonspecific immune responses of aquacultured fish. *J Life Sci* 19: 87-93.
47. Park JW, Kim T, Lim DJ, Lee HB, Joo YS, Park YI. 2004. Antibacterial activities of mushroom liquid culture extracts against livestock disease-causing bacteria and antibiotic resistant bacteria. *Korean J Mycol* 32: 145-147.
48. Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *J Appl Environ Microbiol* 66: 2001-2005.