

해조류 기반 엘리시터 처리에 의한 꽃송이버섯의 GABA 함량 증가 및 흥분성 신경세포의 수상돌기 발달 억제

최문희¹ · 기성환² · 이성은² · 이금화² · 신현재^{3*}

¹조선대학교 공학기술연구원

²조선대학교 약학대학

³조선대학교 생명화학고분자공학과

Enhanced GABA content from sodium alginate-induced *Sparassis latifolia* influences dendrite development in primary cortical neurons

Moon-Hee Choi¹, SungHwan Ki², Seong-Eun Lee², GumHwa Lee², and Hyun-Jae Shin^{3*}

¹The Research Institute of Advanced Engineering Technology, Chosun University, 309 Pilmun-daero, Dong-gu, Gwangju 61452, Republic of Korea.

²College of Pharmacy, Chosun University, 309 Pilmun-daero, Dong-gu, Gwangju, 61452, South Korea.

³Department of Biochemical Polymer Engineering of Chosun University, 309 Pilmun-daero, Dong-gu, Gwangju 61452, Republic of Korea.

ABSTRACT: *Sparassis latifolia* is a fungus abundant in β -glucan and amino acids and is highly valued as a medicinal mushroom. Among amino acids, γ -aminobutyric acid (GABA) is a free amino acid and has biological effects, such as increase/decrease of hypertension, improvement of cerebral blood flow, and prevention of dementia. In this study, biological elicitors were used to increase bioactive substances as a biofortification method. Sodium alginate extracted from seaweed (*Sargassum horneri*, *Sargassum fulvellum*, *Sargassum fusiforme*) were used as the elicitor. The levels of β -glucan and GABA in the mycelium and fruiting body grown by adding the elicitor to the medium were investigated. Addition of sodium alginate positively affected GABA production and negatively affected the β -glucan production in these fungi. Sodium alginates extracted from *S. fulvellum* induced the highest increase in GABA in the mycelium and fruiting bodies. Moreover, we investigated the effects of the extracts from mycelium and fruiting bodies on dendrite development in primary cortical neurons. We found that the extract from the fruiting bodies of sodium alginate treated fungi with increased levels of GABA inhibited the dendrite outgrowth of excitatory neurons, but not inhibitory neurons.

KEYWORDS: *Sparassis latifolia*, Elicitor, GABA, β -Glucan, Primary cortical neurons

J. Mushrooms 2019 December, 17(4):275-283
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2019.17.4.275>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author

E-mail : shinhj@chosun.ac.kr

Tel : +82-62-230-7518, Fax : +82-62-230-7226

Received December 17, 2019

Revised December 20, 2019

Accepted December 20, 2019

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.

서론

기억력은 급변하는 현대 생활에서 중요성이 점차적으로 증대되고 있으며, 사회적으로 학습량이 많은 청소년에서부터 노년에 이르기까지 주요 관심 대상이 되고 있다. 이러한 기억력의 저하는 사회적으로 문제가 되고 있으며, 학습과 기억력 감퇴증상이 일차적으로 나타나는 치매 질환은 65세 이상인 사람들의 약 10%, 80세 이상의 노인들에서는 약 50% 이상이 발병하는 것으로 추정되고 있다 (Naveh-Benjamin *et al.*, 2004). 이러한 현상은 노인인구가 빠르게 증가함에 따라 더 급속하게 증가할 것으로 예

상되고 있으며, 노령 인구가 급속도로 증가하면서 노화에 따른 여러 퇴행성 신경계질환이 사회적 문제로 대두되고 있다 (Anderson *et al.*, 2013). 또한 매년 허혈성 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병과 같은 퇴행성 신경계질환이 꾸준히 증가하고 있다. 퇴행성 신경계질환의 치료를 위하여 여러 다양한 치료법이 진행 혹은 제시되고 있지만 아직 획기적인 치료법은 없는 실정이며, 신경세포를 보호할 수 있는 적절한 치료법을 개발하는 것이 요구되고 있다 (Ramassamy *et al.*, 2006). 중추신경세포 손상은 그 기전이 명확하게 밝혀지지 않았지만 세포막의 파괴, 세포의 팽창, 용해를 동반하는 괴사와 glutamate에 의한 흥분독성, 이온통로를 통한 칼슘의 세포 내 유입, 산소자유기에 의한 산화적 손상, acidosis 등의 다양한 생체내의 생화학적 기전이 단독 또는 복합적으로 작용하여 나타나는 것으로 알려져있다 (Kontos, 1989). 꽃송이버섯 (*Sparassis latifolia* 혹은 *S. crispa*)은 담자균문, 주름균아문, 주름균강, 구멍장이버섯목, 꽃송이버섯과, 꽃송이버섯속으로 자실체는 백색-밤색으로 꽃양배추 형상을 지닌 버섯이다 (Sou *et al.*, 2017). 주로 여름철에 발생하며 산림에서 쉽게 발견되지 않는 버섯으로 알려져 있다. 탄수화물이 전체 영양성분의 70%를 이루고 있고, 이 중 탄수화물의 절반 이상이 베타글루칸 (β -glucan) 성분이며, 그 외에 글리코겐(glycogen), 키토산 (chitosan), 에르고스테롤 (ergosterol), 트레할로스 (trehalos) 등 다양한 성분이 포함되어 있다 (Oh *et al.*, 2017). 꽃송이버섯은 체내로 들어가 인터루킨과 인터페론 생성을 촉진시켜 면역세포의 활동을 지원하여 활동을 지원하여 생체방어효과를 증진시키는 베타글루칸 함량이 43.6%로 신령버섯의 3.7배, 일새버섯의 2.4배를 차지하고 있다 (Ohno *et al.*, 2001, Sari *et al.*, 2017, Choi *et al.*, 2014). 따라서 약·의학계 등 다양한 분야에 걸쳐 꽃송이버섯에 대한 높은 관심을 보이고 있고 국내에서도 대량재배에 성공하여 여러 산림농가에서 재배 중에 있다. 현재 꽃송이버섯의 GABA metabolism에 대한 연구는 보고되어 있지 않으며, 꽃송이버섯의 GABA 증진에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 생물체의 변화를 유도하지 않으면서 생리활성 물질을 증대시키는 자연적이고 안전하며 환경 친화적인 방법을 사용하여 해조류 기반의 엘리시터를 제조하였으며, 이를

Table 1. Abbreviation for *Sparassis latifolia* mycelium and fruiting body treated with elicitor

Elicitor (sodium alginate)	Concentration (%)	Abbreviation	
		Mycelium	Fruiting body
Control	-	M CON	F CON
Sigma Aldrich	0.1	AM1	AF1
	0.5	AM2	AF2
굉생이 모자반 (<i>Sargassum horneri</i>)	0.1	BM1	BF1
	0.5	BM2	BF2
모자반 (<i>Sargassum fulvellum</i>)	0.1	CM1	CF1
	0.5	CM2	CF2
툃 (<i>Sargassum fusiforme</i>)	0.1	DM1	DF1
	0.5	DM2	DF2

적용하여 꽃송이버섯의 생장 및 GABA 함량 증진에 대해 탐색하였다. 또한 해조류 기반 엘리시터 처리 꽃송이버섯을 흥분성 신경세포에 적용하여 신경세포 보호효과에 대해서 조사하였다.

재료 및 방법

꽃송이버섯 공시균주 및 생장

본 연구에서 사용한 꽃송이버섯 균주는 전남산림자원연구소가 채집 및 선발한 JF02-06 균주로, PDA 배지에 계대하여 분양받아 사용하였으며, 국내·외의 꽃송이버섯 균사 생장의 최적 조건에 대한 연구 결과를 토대로 배양하였다. $25\pm 1^\circ\text{C}$ incubator (JSSI-300CL, JSR, Korea)에서 암배양하였으며, 균사의 면적이 petri-dish 전체 면적의 90-95% 정도가 되었을 때 실험 배지에 계대하여 사용하였고, 분리된 원균은 4°C 에 보관하며 3-4개월마다 새로운 PDA에 계대하였다. 균사 생장은 petri-dish 중앙에 균사체를 접종하고 수직으로 교차하는 지름의 길이를 측정하여 평균값을 생장 길이로 하였고 배양일 수에 따라 신장한 양을 기록하였다. 자실체의 생장은 배지에 일정한 비율로 엘리시터를 혼합하여 8주간 생장 및 변화를 관찰하였으며, 엘리시터 종류 및 첨가 비율은 Table 1에 나타내었으며, 각 엘리시터 처리 후의 생장사진은 Fig. 1에 나타내었다.



Fig. 1. Growth of *Sparassis latifolia* fruiting body by elicitor treatment A (control), B (sigma sodium alginate), C (*Sargassum horneri* sodium alginate), D (*Sargassum fulvellum* sodium alginate), and E (*Sargassum fusiforme* sodium alginate).

Table 2. HPLC analysis condition of GABA

HPLC equipment		Shimadzu LC-20 series						
Mobile phase		(Sol A) 5 mM CH ₃ COONa (pH 5.7):THF=95:5 (v/v) (Sol B) 0.05% TFA in 80% MeOH						
Column		Shim-pack GIS, ODS (250×4.6 mm, 5.0 μm particle size)						
Gradient program	Time [min]	0.01	15.00	65.00	105.00	115.00	117.00	125.00
	Sol A	80	70	35	0	0	80	80
	Sol B	20	30	65	100	100	20	20
Oven temperature		35°C						
UV wavelength		360 nm						
Injection volume		20 μL						
Flow rate		1.0 mL/min						

해조류 기반 엘리시터 제조

팽생이모자반, 모자반, 툫에서 추출한 sodium alginate 를 엘리시터로 사용하였다. 대조군으로 Sigma사의 sodium alginate를 사용하였다. 25 g의 해조류를 2% formaldehyde 800 mL에 24시간동안 상온에서 전처리 후 증류수로 세척 하고, 0.2 M HCl 800 mL에 24시간동안 전처리를 하였다. 전처리가 완료된 해조류를 증류수로 세척하여 2% Na₂CO₃ 1 L에 3시간동안 100°C에서 알긴산나트륨을 추출함. 추출 물을 필터로 여과 후 10,000 rpm에서 30분동안 원심분리 하여 상등액을 수거하고, 3배 부피의 EtOH을 첨가하면 sodium alginate를 침전시켰다. 이를 아세톤으로 세척하고, 48시간동안 60°C에서 건조하였다.

β-Glucan 측정

β-Glucan 정량은 yeast and mushroom β-glucan assay kit (Megazyme)를 사용하여 측정하였다. Kit는 total glucan과 a-glucan, D-glucose, sucrose, free D-glucose를 측정하여 Megazyme사에서 제공하는 β-glucan 함량 계산 프로그램 (K-YBGL_0501_CALC1.xls)에 대입하여 각각 함량 (mg/100 mg) 값으로 계산하였다. Total glucan assay는 100 mg의 샘플을 glass tube에 넣고 37% HCl 1.5 mL를 첨가 후 vortexing 하였다. 다시 30°C 항온조에서 45분간 반응하며 반응 중간 15분마다 vortexing 하였다. 10 mL의 3차 증류수를 가하고 tube 뚜껑을 느슨하게 하여 100°C 항온조에서 5분간 방치하였다. 뚜껑을 닫고 2 시간 동안 반응하고 tube를 꺼내어 상온까지 식힌 후 10 mL의 2 N KOH를 넣고 vortexing 하였다. 여기에 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0)를 더하여 100 mL 부피플 라스크로 부피를 맞춘 후 12,000 rpm에서 10분동안 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 상등액 0.1 mL에 exo-1,3-β-glucanase (20 U/mL) + β-glucosidase (4 U/mL) 0.1 mL 를 넣고 40°C 항온조에서 60분간 반응 후 glucose oxidase /peroxidase mixture (GOPOD) 3.0 mL를 넣고 40°C 항온

조에서 20분간 반응시켰다. 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 total glucan 함량의 계산에 사용하였다. a-Glucan, D-glucose, sucrose, free D-glucose assay는 100 mg의 샘플을 glass tube에 넣고 2 N KOH 2 mL를 첨가 후 ice bucket에 tube를 꽂아 교반기 (Select BioProducts, SBS300-D-2)에 넣고 20분간 교반하였다. 이 후 8 mL의 1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8)를 첨가 후 곧바로 0.2 mL 의 amylo- glucosidase (1630 U/mL) + invertase (500 U/ mL)를 넣고 vortexing 하여 40°C 항온조에서 30분간 반응을 진행하였다. 곧바로 1500×g, 10분 원심분리하여 상 등액을 얻었다. 상등액 0.1 mL 에 0.1 mL 의 sodium acetate buffer (200 mM, pH 5.0)와 3.0 mL 의 GOPOD를 넣고 40°C 항온조에서 20분간 반응시킨 후 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 α-glucan 함량의 계산에 사용하였다.

GABA 측정

꽃송이버섯 건조 시료를 막자사발로 분쇄 후 powder화 하여 수용액을 5% (w/v) 농도로 제조하여 60°C에서 2시 간동안 추출하였다. 추출물을 12,000 rpm에서 10분동안 원심분리 후 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene (DNFB)로 유도 체화하여 HPLC로 GABA 함량을 분석하였다 (Li *et al.*, 2016). 180 μL의 꽃송이버섯 버섯 추출물, 180 μL의 10 mg/mL DNFB 용액, 100 μL의 0.5 M NaHCO₃ (pH 9.0), 20 μL의 H₂O을 혼합하여 vortexing 후 60°C에서 1시간동 안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 실온으로 냉각하여 400 μL의 0.01 M KH₂PO₄ (pH 7.0)를 첨가하여 15분동안 암 실에서 반응하였다. HPLC는 Shimadzu LC-20 series (Pump: LC-20AD, Degassor: DGU-20A, Column oven: CTO-20A, UV-VIS detector: SPD-20A, Japan)로 구성되 었으며 분석조건은 Table 2와 같다.

초대 신경세포 배양

ICR 생쥐의 배아기 15.5일의 뇌로부터 대뇌피질 부분을

분리하여 DNase I (Sigma)이 함유된 0.25% 트립신 용액 (Gibco)으로 37°C에서 20분간 작용시킨 후 fetal bovine serum (Gibco)을 이용하여 트립신을 불활성화하였다. Poly-L-lysine (Sigma)으로 코팅된 배양용기에 분리된 세포를 2% B27, Glutamax, penicillin/streptomycin (Invitrogen)이 포함된 Neurobasal medium을 이용하여 배양시켰다. 신경세포는 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 발달시키며 3-4 일에 한 번씩 반절의 배양액을 새로 교체하였다.

면역형광법

Poly-L-lysine이 코팅된 유리커버글라스 위에서 배양된 신경세포를 각각의 시료를 48 시간 동안 처리하여 4% paraformaldehyde가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)으로 15 분간 고정시킨 후 0.1% Triton X-100/PBS에서 투과성을 증가시켰다. 10% normal goat serum을 이용하여 blocking buffer에 상온에서 1시간 동안 배양한 후 Map2 (Abcam), GAD67 (Millipore) 항체를 이용하여 4°C에서 24시간동안 반응시켰다. AlexaFluor 488, 647 (Invitrogen)이 탑재된 2차 항체를 이용하여 상온에서 1 시간동안 반응시킨 후 유리슬라이드 위에 mountin media를 이용하여 신경세포 샘플을 안착시켰다. 신경세포는 Nikon A1 공초점현미경을 이용하여 이미지를 획득하였다.

MTT assay

초대 신경세포는 poly-L-lysine이 코팅된 배양용기에서 4-5일간 배양 후 각각의 시료를 가하여 24시간 동안 배양기에서 배양하였다. 살아남은 세포는 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium), 2 mg/mL으로 1시간 동안 반응시킨 후 dimethyl sulfoxide로 formazan 결정체를 녹여 immunosorbent assay microplate reader (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blotting

신경세포는 각각의 시료를 20분간 처리한 후 radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) 용액을 처

리하여 단백질을 추출하고 8% SDS-PAGE 젤에 걸어 0.22 μm 니트로셀룰로즈막에 2시간동안 transfer하였다. 5% 무지방우유가 함유된 Tris 완충액 (TBS)에서 blocking을 시킨 후 phospho-Akt Serine473 (Cell signaling), phospho-Erk 1/2 (Cell signaling), horseradish peroxidase-conjugated actin (Sigma) 항체를 이용하여 4°C에서 24시간동안 반응시켰다. 그 후 0.1% Tween이 함유된 TBS 용액으로 헹군 후 2차 항체를 이용하여 chemiluminescence imager (ImageQuant LAS 4000 mini)를 이용하여 신호강도를 측정하였다.

Dendrite outgrowth 측정

기존의 연구방법을 이용하여 dendrite outgrowth를 측정하였으며, 공초점현미경으로 얻어진 이미지를 ImageJ 프로그램과 NeuronJ 플러그인을 이용하여 세포체로부터 발달되는 수상돌기의 길이를 측정하였다 (Kaplan and Miller, 2000, Niu *et al.*, 2004).

통계

실험 결과는 3회 반복 측정하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 통계처리는 SPSS (version 23.0)를 사용하였다. β-Glucan과 GABA 함량에 대한 ANOVA 분석 후 p value가 0.05 이하인 범위에서 유의적 차이를 확인하였고, Duncan's multiple range test로 사후검정하여 a, b, c 문자로 표시하였다. MTT assay와 dendrite outgrowth 결과에 대한 ANOVA 분석 후 p value가 0.001 이하인 범위에서 유의적 차이를 확인하였고, Bonferroni's comparison test로 사후검정하였다.

결과 및 고찰

β-Glucan 측정결과

엘리시터 첨가 배지에서 배양된 꽃송이버섯의 β-glucan 함량 분석 후 one-way ANOVA를 수행하였다 (Fig. 2). 균사체는 모든 종류의 엘리시터 첨가 배지에서 β-glucan 함량의 유의적인 차이는 존재하지 않았다. 그러나 자실체에

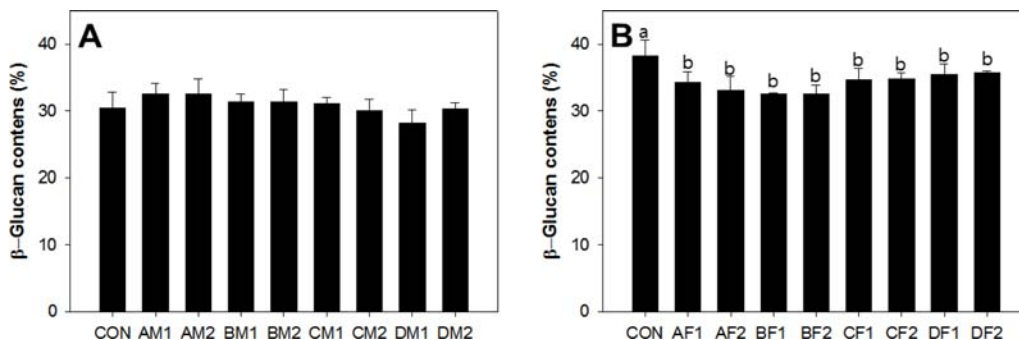


Fig. 2. β-glucan contents of *Sparassis latifolia* (A) mycelium and (B) fruiting body treated with elicitor.

서는 무처리군 (control)에 비하여 모든 처리군의 β -glucan 함량이 약 7~15% 정도 유의적으로 감소하였다. 기존의 연구에서는 아미노산으로 ornithine과 glutamic acid를 배지에 첨가하여 꽃송이버섯 균사체를 재배하여 β -glucan 함량을 측정하였다 (Jo *et al.*, 2017). 실험결과 모든 아미노산 첨가 배지에서 β -glucan 함량이 엘리시터를 첨가하지 않은 배지에서 자란 균사체보다 감소하였다. Ryoo 등 (2018) 등의 연구에서는 꽃송이버섯 KFRI 723 균주에 엘리시터로 UV를 물리적 자극을 가하여 β -glucan 함량을 측정하였다. 10분 동안 UV를 조사하였을 때 β -glucan 함량이 엘리시터 처리하지 않은 꽃송이버섯에 비하여 유의적으로 증가하였으며, 20분-60분 동안 UV를 조사한 경우 엘리시터 처리하지 않은 꽃송이버섯과 유사하거나 감소하였다.

GABA 측정결과

HPLC 분석 결과는 Fig. 3에 나타내었으며, 엘리시터 첨가 배지에서 배양된 꽃송이버섯의 GABA 함량 분석 후 one-way ANOVA를 수행하였다 (Fig. 4). 균사체는 0.1% 모자반 sodium alginate 첨가 배지 (CM1)에서 3.28 ± 0.07 mg/g으로 가장 높은 GABA 함량을 보였고, 0.5% 팽생이모자반 sodium alginatate 첨가 배지 (BM2)에서 0.69 ± 0.02 mg/g으로 가장 낮은 GABA 함량을 보였다. 0.5% 농도로 엘리시터를 첨가한 배지에서 배양된 꽃송이버섯 균사체는 무처리군에 비하여 GABA 함량이 유의적으로 감소하였다. 식물에서 GABA는 산성 조건에서 합성되고, pH 조절 mechanism에 의해 세포질 산성화를 조절한다 (Ramesh *et al.*, 2015). 엘리시터로 사용한 해조류에서 추출한 알긴산 나트륨을 1% 농도로 증류수에 용해하여 pH를 측정하면 6~8의 범위로 약염기의 성질을 가진다 (Podkorytova *et al.*, 2007). 따라서 0.5% 농도로 첨가한 엘리시터가 배지의 pH를 증가시켜 무처리군에 비하여 GABA 함량이 유의적으로 감소한 것으로 판단된다. 자실체는 0.1% 모자반 sodium alginate 첨가 배지 (CF1)에서 2.90 ± 0.09 mg/g으로 가장 높은 GABA 함량을 보였고, 0.5% 모자반 sodium alginate 첨가 배지 (CF2)에서 1.93 ± 0.10 mg/g으로 가장 낮은 GABA 함량을 보였다.

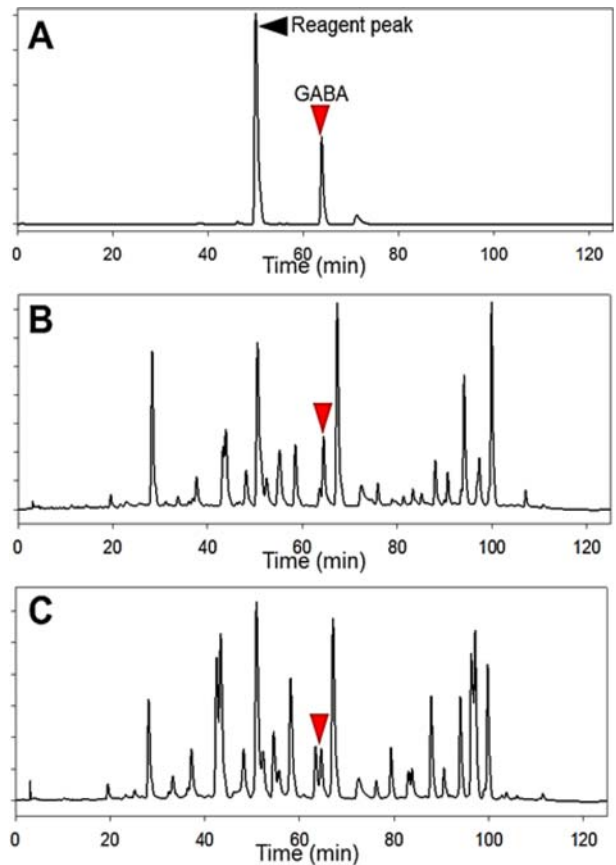


Fig. 3. HPLC analysis of (A) GABA standard, *Sparassis latifolia* (B) mycelium and (C) fruiting body treated with elicitor.

독성실험결과

꽃송이버섯 균사체와 자실체의 모자반 sodium alginate를 0.1% 농도로 처리한 시료 (CM1, CF1)을 배양된 초대 신경세포에 24시간 동안 처리하여 신경세포 생존률을 분석한 결과 균사체 CM1의 5 mg/mL의 농도를 제외하고는 각각의 시료에서 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 5). 이는 균사체 CM1의 2 mg/mL, 자실체의 5 mg/mL 농도까지 꽃송이 버섯이 신경세포에 독성

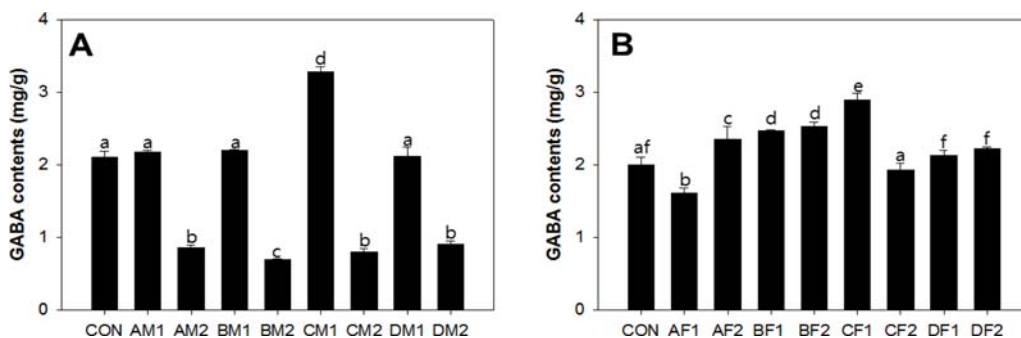


Fig. 4. GABA contents of *Sparassis latifolia* (A) mycelium and (B) fruiting body treated with elicitor.

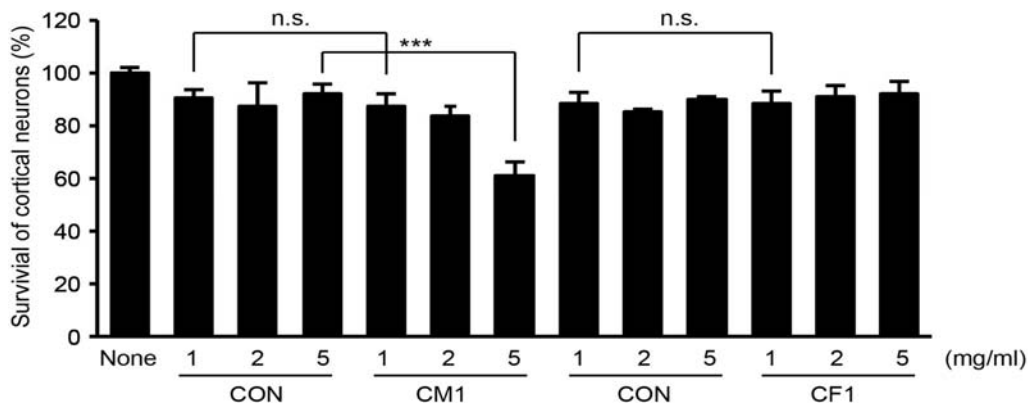


Fig. 5. MTT assay of *Sparassis latifolia* treated with elicitor. (CON; Mycelium control, CM1; Mycelium treated with 0.1% *Sargassum fulvellum* sodium alginate, CON; Fruiting body control, CF1; Fruiting body treated with 0.1% *Sargassum fulvellum* sodium alginate, The Data was analyzed using one-way ANOVA, followed by Bonferroni's comparison test. ***, $p < 0.001$)

효과를 보이지 않음을 나타낸다.

초대 신경세포 수상돌기 발달 결과

신경세포 간의 네트워크를 형성하기 위하여 수상돌기의 길이 성장은 중요한 역할을 하는데 이 실험에서는 이 수상돌기의 발달에 꽃송이버섯 추출물이 미치는 영향을 연구하고자 하였다. 면역형광법을 이용하여 초대 신경세포를 Map2양성/GAD67음성인 흥분성신경세포와 Map2양성/GAD67양성인 억제성신경세포로 분류하였고 ImageJ/NeuronJ 프로그램을 이용하여 하나의 신경세포에서 발달하는 총 수상돌기의 길이를 측정하였다. 결과적으로, 0.1 mg/mL 농도에서는 각각의 대조군에 비하여 신경세포의 수상돌기의 발달에 유의적인 차이가 없었으나 (Fig. 6), 1 mg/mL 농도의 자실체 시료인 CF1에서는 대조군에 비해 억제성신경세포가 아닌, 흥분성 신경세포의 수상돌기 길이가 유의적으로 감소하였음을 발견하였다 (Fig. 7). 이는 CF1에 함유된 GABA가 흥분성신경세포의 수상돌기 발달을 조절할 가능성을 제시한다. GABA는 중추신경계에 광범위하게 존재하는 억제성 신경전달물질로서 시냅스 전 혹은 시냅스 후 억제를 통해 신경흥분전달을 억제하며 GABA가 작용하는 감수체에는 GABA_A, GABA_B가 존재한다 (Jung *et al.*, 2012). 기존의 연구에서 흥분을 전달하는 신경전달물질로는 substance P, enkephalin, GABA, VIP 등이 관련되어 있음이 보고되었다 (Reiner, 1991). 또한 bicuculline에 의해 탈분극 시냅스 전 신경세포에 작용하여 흥분성 아미노산 신경전달물질의 유리를 억제하는 GABA성 신경의 작용이 bicuculline에 의해 차단됨으로써 흥분성 신경전달 물질의 유리가 증가하여 신경이동통성 흥분의 전달을 억제 시키는 것으로 보고 되었다 (Kim and Lee, 1993). 이와 같은 결과는 본 실험결과와 유사한 실험결과이며, 추후 흥분성 신경세포의 수상돌기 발달에

관한 양상을 분자생물학적 측면에서 확인할 필요가 있을 것으로 생각된다.

신경세포 내 신호전달경로의 변화결과

수상돌기의 발달은 여러 세포 내 신호전달 체계의 변화로 조절된다고 알려져 있다 (McAllister *et al.*, 1995). 그 중 대표적인 전달경로가 꽃송이버섯 추출물에 의해 영향을 받는지 조사하였다. 꽃송이버섯 균사체와 자실체의 모자반 sodium alginate 엘리시터를 0.1% 농도로 처리한 시료 (CM1, CF1)을 초대 신경세포에 20분 동안 처리하여 western blotting을 이용하여 Akt와 Erk1/2의 인산화를 살펴 보았다. 결과적으로 균사체와 자실체의 무처리군과 비교하였을 때 시료에 의한 세포내 신호전달의 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 8). 이는 꽃송이버섯 추출물이 흥분성신경세포의 수상돌기 발달에 영향을 미치는 경로가 Phosphoinositide 3-kinase/Akt 혹은 mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ Erk1/2 신호전달체계가 아닌 다른 경로를 통하여 조절함을 나타낸다. GABA의 기존의 연구에서 NPY/AgRP 뉴런이 활성화되면 NPY/AgRP 뉴런에서 생산된 GABA (gamma-aminobutyric acid)가 Y1과 GABA 수용체에 작용하여 POMC 뉴런을 억제하여 식이 섭취 행동과 에너지 대사에 서로 상보적으로 작용하여 체중과 지방함량을 정상 수준으로 유지한다고 보고하였다 (Kim *et al.*, 2011). 또 다른 연구에서는 렙틴에 의한 식욕 부진(anorexia)에 PI3K 신호전달 경로가 JAK/STAT3 신호전달경로보다는 덜 영향을 주지만, 시상하부에 PI3K 억제제를 처리하면 렙틴의 식욕억제 효과가 나타난다고 보고하였다 (Ko *et al.*, 2010). 따라서 추후 단백질 발현 양상을 MAPK 경로가 아닌 PI3K 신호전달 경로 및 mTOR 경로를 통해 확인해 볼 필요가 있다.

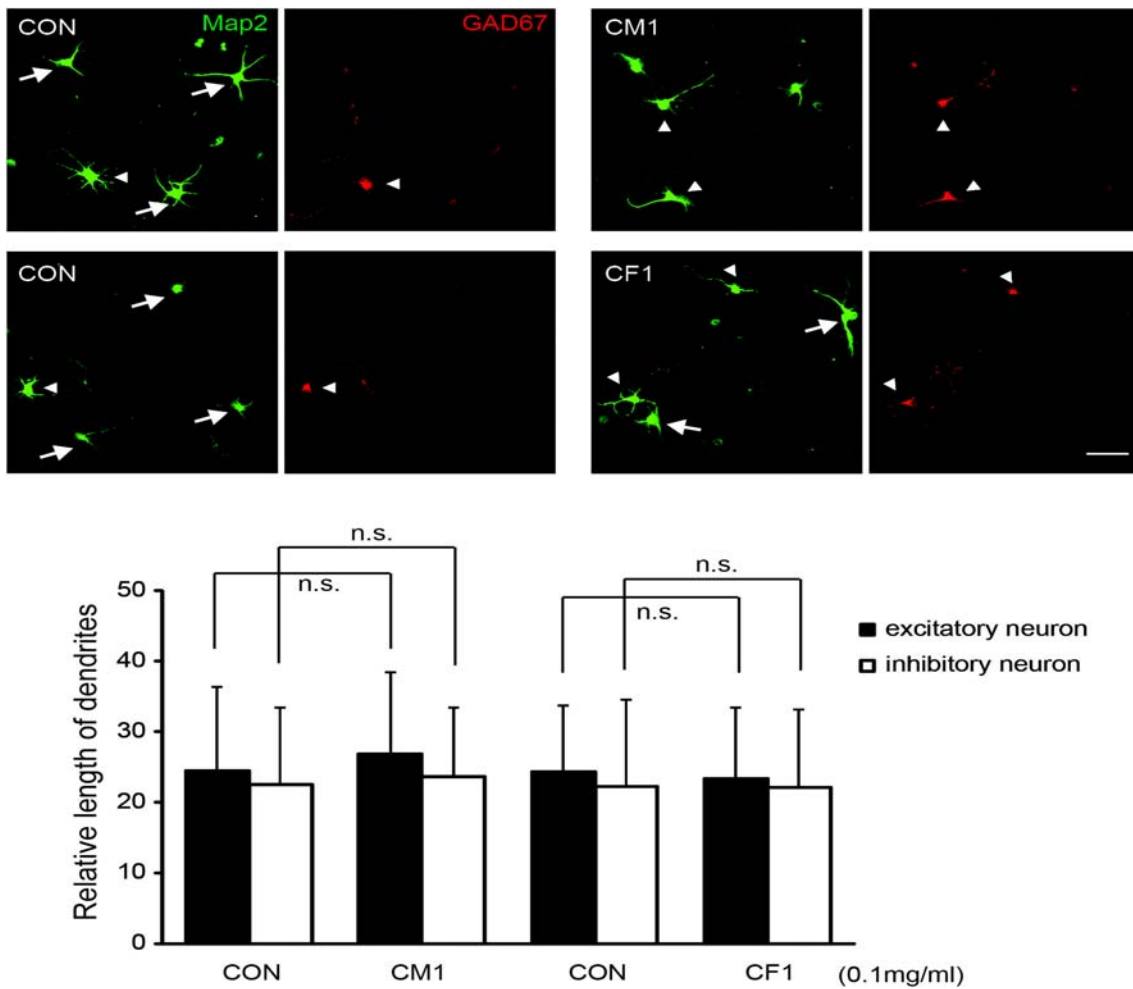


Fig. 6. Dendrite outgrowth of *Sparassis latifolia* treated with elicitor. (CON; Mycelium control, CM1; Mycelium treated with 0.1% *Sargassum fulvellum* sodium alginate, CON; Fruiting body control, CF1; Fruiting body treated with 0.1% *Sargassum fulvellum* sodium alginate, Arrow; Excitatory neuron, Arrowhead; Inhibitory neuron, scale bar; 50 μ m, The Data was analyzed using one-way ANOVA, followed by Bonferroni's comparison test. ***, $p < 0.001$)

결론

본 연구에서는 생물체의 변화를 유도하지 않으면서 생리활성 물질을 증대시키는 자연적이고 안전하며 환경 친화적인 방법을 사용하여 해조류 기반의 엘리시터를 제조하였으며, 이를 적용하여 꽃송이버섯의 성장 및 GABA 함량 증진에 대해 탐색하였다. 실험결과 팽생이모자반, 모자반, 툯에서 추출한 sodium alginate 3가지 해조류 중 모자반에서 추출한 sodium alginate가 꽃송이버섯 균사체 및 자실체에 생장에 가장 유용한 엘리시터로 작용했으며, HPLC 분석결과 GABA 함량 또한 가장 높게 측정되었다. β -Glucan 측정결과 팽생이모자반, 모자반, 툯에서 추출한 sodium alginate를 각각 0.1%, 0.5% 엘리시터로 처리하여 꽃송이버섯의 양상 및 β -Glucan 함량을 측정하였는데 실험결과 균사체 배양시 전체 엘리시터 처리군에서 유의

적인 차이는 없었으며, 자실체에서는 무처리군에 비하여 모든 처리군의 β -glucan 함량이 약 7~15% 정도 유의적으로 감소하였다. 꽃송이버섯을 흥분성 신경세포에 적용하여 수상돌기의 발달에 꽃송이버섯 추출물이 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험에서는 면역형광법을 이용하여 초대 신경세포를 Map2양성/GAD67음성인 흥분성신경세포와 Map2양성/GAD67양성인 억제성신경세포로 분류하였고 ImageJ/NeuronJ 프로그램을 이용하여 하나의 신경세포에서 발달하는 총 수상돌기의 길이를 측정하였다. 실험결과 0.1 mg/mL 농도에서는 각각의 대조군에 비하여 신경세포의 수상돌기의 발달에 유의적인 차이가 없었으며, 1 mg/mL 농도의 자실체 시료인 CF1에서는 대조군에 비해 억제성 신경세포가 아닌, 흥분성 신경세포의 수상돌기 길이가 유의적으로 감소하였음을 발견하였다. 결론적으로 꽃송이버섯

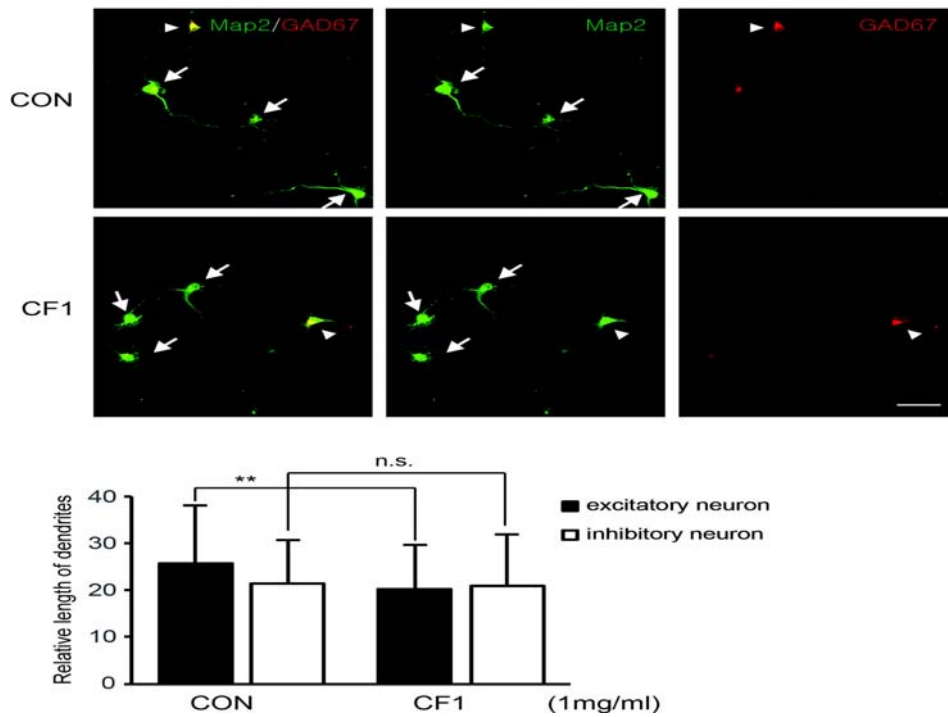


Fig. 7. Dendrite outgrowth of *Sparassis latifolia* treated with elicitor. (CON; Fruiting body control, CF1; Fruiting body treated with 0.1% *Sargassum fulvellum* sodium alginate, Arrow; Excitatory neuron, Arrowhead; Inhibitory neuron, scale bar; 50 μ m, The Data was analyzed using one-way ANOVA, followed by Bonferroni's comparison test. **, $p < 0.001$)

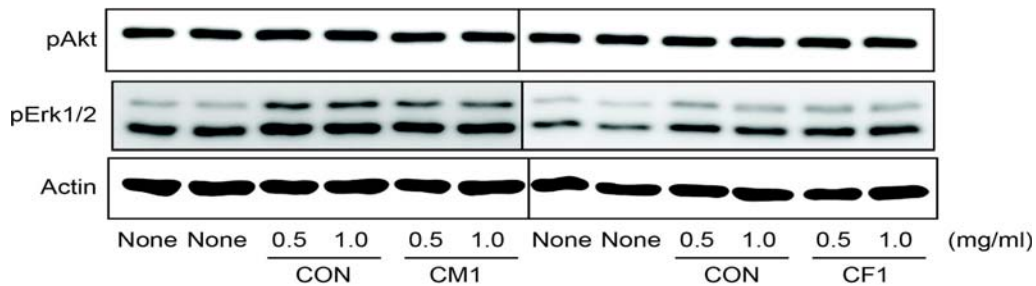


Fig. 8. Intracellular signaling activation of *Sparassis latifolia* treated with elicitor. (CON; Mycelium control, CM1; Mycelium treated with 0.1% *Sargassum fulvellum* sodium alginate, CON; Fruiting body control, CF1; Fruiting body treated with 0.1% *Sargassum fulvellum* sodium alginate)

버섯 재배시 해조류 기반 엘리시터 처리를 진행하면 GABA 함량이 증대되고, 해조류 기반 엘리시터 처리 꽃송이 버섯 추출물은 흥분성 신경세포의 수상돌기 발달 억제에 효과가 있는 것으로 생각되며, 추후 다양한 신경세포에 적용하여 신호전달경로 및 매카니즘을 확인해 볼 필요가 있다.

감사의 글

이 논문은 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2017R1A2B4006204).

REFERENCES

Anderson RJ, Simpson AC, Channon S, Samuel M, Brown RG. 2013. Social problem solving, social cognition, and mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *Behav Neurosci* 127: 184-192.

Choi MH, Han HK, Lee YJ, Jo HG, Shin HJ. 2014. *In vitro* anti-cancer activity of hydrophobic fractions of *Sparassis latifolia* extract using AGS, A529, and HepG2 cell lines. *J Mushrooms* 12: 304-310.

Jo HG, Shin HJ. 2017. Effect of addition amino acids on the mycelial growth and the contents of β -glucan and γ -

- aminobutyric acid (GABA) in *Sparassis latifolia*. *J Mushrooms* 15: 38-44.
- Jung YS, Park SJ, Kim JE, Yang SA, Park JH, Kim JH, Jhee KH, Lee SP, Lee IS. 2012. A comparative study of GABA, glutamate contents, acetylcholinesterase inhibition and antiradical activity of the methanolic extracts from 10 edible plants. *Korean J Food Sci Technol* 44: 447-451.
- Kaplan DR, Miller FD. 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10: 381-391.
- Kim HJ, Choi SH, Chun BG, Kim DH. 2011. The role of adipose tissue vasculature in energy balance. *J Korean Soc Pediatr Endocrinol*. 16: 139-156.
- Kim JY, Lee SH. 1993. Effects of amino acids and some drugs related to GABA receptors on the neuronal activity in isolated medullary dorsal horn of rat. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 19: 401-411.
- Ko SJ, Shin YJ, Jang WS, Ha YJ, Lee SA, Ahn MS, Kwon OS, Shin SH. 2010. Protective effects of *Chungsimyeonjaeum* on glutamate-induced apoptosis in C6 glial cells. *Korean J Intern Med* 31: 54-65.
- Kontos HA. 1989. Oxygen radicals in CNS damage. *Chem-Biol Interact* 72: 229-255.
- Li N, Liu Y, Zhao Y, Zheng X, Lu J, Liang Y. 2016. Simultaneous HPLC determination of amino acids in tea infusion coupled to pre-column derivatization with 2, 4-dinitrofluorobenzene. *Food Anal Methods* 9: 1307-1314.
- McAllister AK, Lo DC, Katz LC. 1995. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15: 791-803.
- Naveh-Benjamin M, Guez J, Kilb A, Reedy S. 2004. The associative memory deficit of older adults: further support using face-name associations. *Psychol Aging* 19: 541-546.
- Niu S, Renfro A, Quattrocchi CC, Sheldon M, D'Arcangelo G. 2004. Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron* 41: 71-84.
- Oh DS, Kim HS, Shim BS, Wui AJ, Yoon BS, Kim KW, Wang SJ. 2013. Effect of mycelial culture of cauliflower mushroom (*Sparassis crispa*) using LED lighting operation. *J Mushrooms* 11: 24-31.
- 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.
- Podkorytova AV, Vafina LH, Kovaleva EA, Mikhailov VI. 2007. Production of algal gels from the brown alga, *Laminaria japonica* Aresch., and their biotechnological applications. *J Appl Phycol* 19: 827-830.
- Ramassamy C. 2006. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol* 545: 51-64.
- Ramesh SA, Tyerman SD, Xu B, Bose J, Kaur S, Conn V, Domingos P, Ullah S, Wege S, Shabala S, Feijó JA, Ryan PR, Gilliam M. 2015. GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nat Commun* 6: 7879.
- Reiner A. 1991. A comparison of neurotransmitter-specific and neuropeptide-specific neuronal cell types present in the dorsal cortex in Turtles with those present in the isocortex in mammals: Implications for the evolution of isocortex. *Brain Behav Evol* 38: 73-82.
- Ryoo R, Sou HD, Ka KH, Park H. 2018. Elicitor-induced β -glucan contents in fruit body of cauliflower mushroom (*Sparassis latifolia*). *Forest Sci Technol* 14: 119-125.
- Sari M, Prange A, Lelley JI, Hambitzer R. 2017. Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chem* 216: 45-51.
- Sou HD, Ryoo R, Ka KH, Park H. 2017. The mycelial growth and ligninolytic enzyme activity of cauliflower mushroom (*Sparassis latifolia*). *Forest Sci Technol* 13: 158-163.