

Evaluation of the Useful Bioactivities of Spent Mushroom Substrate of Shiitake

Hwa-Jung Sung¹, Su-Jin Pyo¹, Jong-Yi-Park² and Ho-Yong Sohn^{1*}

¹Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 36729, Korea

²Gyeongbuk Institute For Bio-Industry, Andong 36728, Korea

Received July 26, 2018 / Revised September 20, 2018 / Accepted September 21, 2018

In Korea, shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, is cultivated on artificial medium containing oak sawdust and wheat bran. The annual production of spent mushroom substrate (SMS) of shiitake, a by-product of the mushroom industry, is estimated to reach over 50,000 tons per year. This study aimed to improve the use of SMS as a novel bioresource. Hot water extracts of SMS after the first and third harvest were prepared and their bioactivities evaluated. Hot water extracts of uninoculated medium and shiitake were used as controls. Extracts of SMS showed higher radical scavenging of DPPH anions, ABTS cations, nitrites, and a higher reducing power than those of shiitake or medium extracts. After the first and third harvests at 0.5 mg/disc, SMS extracts showed no antibacterial or antifungal activities against the pathogenic and food-spoilage bacteria and fungi. However, they showed good inhibitory activities against α -glucosidase at 0.5 mg/ml. In addition, SMS extracts had strong anti-coagulation activities via their inhibition of thrombin, prothrombin, and blood coagulation factors without platelet aggregation activity. Our results suggested SMS should no longer be perceived as a useless byproduct but should be understood as a novel bioresource, the extracts of which could be developed as antioxidant, antidiabetic, and antithrombosis agents.

Key words : Anti-oxidation, anti-thrombosis, α -glucosidase, *Lentinula edodes*, spent mushroom substrate (SMS)

서 론

국내 식용 버섯 생산량은 연간 16만톤을 상회하며, 대부분 상업화된 인공배지를 이용하여 밀식재배하여 생산되고 있으며[21], 국내 버섯 재배 후 발생하는 [수확 후 배지](Spent Mushroom Substrate: SMS)는 연간 200만톤 이상이 배출되는 것으로 추정된다[31]. 현재 SMS는 사료 및 퇴비용으로 일부 사용되거나 대부분은 폐기되고 있는 실정이다[8, 31].

한편 표고버섯(*Lentinula edodes*)은 버섯 향은 약하지만, 씹는 맛이 좋아 국내에서 가장 애용되는 버섯중의 하나이며[12], 2016년 25,000톤이 생산되었으며, 약 50,000톤의 SMS가 발생한 것으로 추정되고 있다[21]. 표고버섯 인공배지는 대부분이 참나무 톱밥으로 제조되므로, 그 SMS 역시 상당량의 영양성분이 잔존한다[2, 31]. 또한, SMS는 수개월에 걸쳐 표고버섯 균사체가 대량 증식한 상태이므로 버섯 자실체 및 균사체로부터 유래하는 β -glucosidase, cellulase 등의 다양한 효소와 식물 생육 촉진 유효성분, 항균물질, 병 저항성 유도체 등의 다양한

생리활성을 가진 이차대사산물이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다[1, 2, 7, 27]. 특히 SMS에는 고분자 분해능이 우수한 다양한 미생물 균집을 다량 포함하고 있어 축산 및 생활 폐기물 처리에 적합하다고 보고된 바 있다[18-20]. 최근 저자들은 표고버섯 SMS가 표고버섯 및 버섯 재배용 배지보다 조단백, 조지질 및 유용 미네랄 함량이 월등히 높으며, 또한 고분자 및 다당류 분해와 관련된 다양한 효소들을 다량 함유하고 있음을 보고한 바 있으며[28], 1회 수확 SMS 보다 3회 수확 SMS가 보다 강력한 효소활성 및 수용성 영양성분, 유기산을 포함하고 있어 표고버섯을 3회 수확한 후 폐기하게 되는 SMS를 축산, 수산 사료 개발, 환경정화, 고분자 분해 산업 및 생물 전환 산업에 효율적으로 이용 가능함을 제시한 바 있다[28].

한편 표고버섯은 높은 관능성, 우수한 영양적 특성[31] 이외에도 간 보호 및 면역증강[22], 항당뇨[9, 23], 항염증 효과[14], 항균 및 항바이러스 효과[5, 13], 항종양 효과[14], 혈전 용해 활성[4] 및 내인성 혈액응고인자 저해에 의한 항혈전 활성[6], 항산화 효과[5, 10] 등의 다양한 유용 생리활성이 보고되어 있으며, 표고버섯 균사체에서도 항산화[12], 항균[12], 항당뇨[9] 및 암세포 성장 억제활성[24]이 확인되어 있다. 따라서, 균사체가 대량 배양된 상태인 표고버섯 SMS에서도 표고버섯 및 표고버섯 균사체와 유사한 다양한 생리활성이 나타날 것으로 예상된다. 실제 표고버섯 SMS의 실온 물 추출물의 고추 생육 촉진 및 역병 억제효과[7, 15], 항산화 활성의 고분자 다당류[36], 암세포 생육억제 활성의 산성다당류[34] 및 항균 활성의

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5491, Fax : +82-54-820-7804

E-mail : hysohn@anu.ac.kr

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

다당류[35]가 보고되어 있다. 따라서, 본 연구에서는 표고버섯 재배용 배지, 1회 SMS, 3회 SMS 및 수확된 표고버섯의 열수 추출물 4종을 각각 제조하여 이들의 항산화, 항균, 항당뇨, 항응고 및 혈소판 응집저해 활성을 평가하여, 별도의 용도 없이 폐기되고 있는 표고버섯 SMS가 새로운 생물자원으로 이용가능함을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 SMS와 표고버섯은 경북 문경의 표고버섯 농장에서 직접 제공받아 사용하였으며, 재배용 배지는 2017년 중국 금전시에 제조된 표고버섯 재배용 배지(참나무 80%, 밀기울 19%, 식용석고 1%)를 농장에서 압착 밀봉하고 이를 100℃에서 8시간 살균하여 조제하였다[28]. 이후 살균배지에 표고버섯 종균 808을 접종하여 약 120일간 배양실에서 배양하고, 다시 재배사에서 40일간 23℃, 습도 70% 조건에서 배양한 후 버섯 발생작업을 하여 표고버섯을 수확하였다. 1차 수확한 이후 1회 SMS를 회수하였으며, 이후 7일 간격으로 표고버섯을 2차 및 3차 재발생 시켜 수확 한 후, 3회 SMS를 회수하였다[28]. 각각의 살균배지, SMS 및 표고버섯은 Fig. 1에 나타내었다.

한편 살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물 제조를 위해서는, 각각의 시료에 대해 20배의 증류수를 가한 후 100℃에서 1시간 추출하였으며, 추출액은 filter paper (Whatman No. 2)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan)하여 분말로 조제하였다. 조제된 추출물들은 DMSO (Dimethylsulfoxide)에 적당한 농도로 녹여, 성분분석 및 활성평가에 사용하였다. 실험에 사용한 시료는 안동대학교 식품영양학과에서 보관하고 있다(voucher specimen 2017-LEHW1~4).

항산화 활성

살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 항산화 활성은 기존의 보고[10]한 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 음이온 소거능, ABTS [2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] 양이온 소거능, nitrite 소거능 및 환원력 측정으로 평가하였으며, 최종 항산화 활성의 비교는 RC₅₀ (표준조건에서 활성 radical을 50% 제거하는 데 소요되는 시료의 양)으로

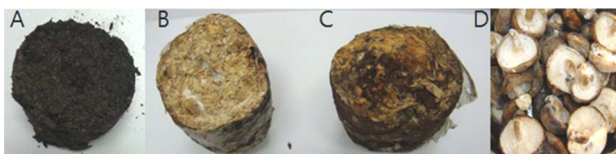


Fig. 1. Photography of (A) un-inoculated sterilized medium, (B) spent mushroom medium (SMS) after 1st harvest, (C) SMS after 3rd harvest, and (D) harvested shiitake.

나타내었다[5, 10]. 이때 활성 대조구로는 vitamin C (Sigma Co.)를, 용매 대조구로는 DMSO를 사용하였다.

항균 활성

살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 항균 활성은 기존의 보고[13, 14]된 방법과 동일하게 disc-diffusion법으로 평가하였다. 그람 양성세균으로는 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Listeria monocytogenes* KACC 10550, *Bacillus subtilis* KCTC 1924, 그람 음성세균으로 *Escherichia coli* KCTC 1682, *Pseudomonas aeruginosa* KACC 10186, *Proteus vulgaris* KCTC 2433, *Salmonella Typhimurium* KCTC 1926, 진균으로는 *Candida albicans* KCTC 1940 및 *Saccharomyces cerevisiae* IF0 0233를 사용하였으며, 항세균 활성의 경우 Nutrient agar (Difco Co., USA) 배지, 항진균 활성의 경우 Sabouraud dextrose (Difco Co. USA) 배지를 이용하였다. 각각의 조제된 배지(90×15 mm, Green Cross Co., Ltd. Korea)에 실험균주(O.D.₆₀₀ 0.1)를 100 µl 도말하고, 이후 각각의 시료 5 µl를 멸균 disc-paper (지름 6.5 mm, Whatman No.2)에 가하여 37℃ 및 30℃에서 24시간 동안 배양 후, 생육저지환의 크기를 측정하여 항균활성을 평가하였다[13]. 대조구로는 항세균제 ampicillin과 항진균제 miconazole (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 각각 1 µg/disc 농도로 사용하였으며, 생육저지환의 크기는 생육이 나타나지 않는 부분의 지름을 mm 단위로 측정하였고, 3회 이상 평가 후 대표 결과로 나타내었다.

항당뇨 활성

살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 항당뇨 활성은 기존의 보고[11]와 동일하게 α-amylase 저해 활성과 α-glucosidase 저해 활성을 평가하여 나타내었다. 먼저 α-amylase 저해활성은 추출물 2.5 µl와 50 mM phosphate buffer (pH 6.8)로 희석한 α-amylase (0.25 U/ml) 25 µl를 혼합 후 37℃에서 10분간 반응하고, 0.5% soluble starch (Samchun Chemicals Co., Korea) 25 µl를 첨가하여 37℃에서 10분간 반응하고 100℃에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰으며, 반응액에 150 µl의 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 용액을 첨가하여 100℃에서 5분간 가열, 발색한 후 상온에서 방냉하였다. 발색액은 96 well microplate reader (Tecan Co., USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각각의 실험은 3회 반복한 후 평균값을 구하여 하기 식으로 저해율을 계산하였다. 한편 α-glucosidase 저해활성은, 추출물 2.5 µl와 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.6)로 희석한 α-glucosidase (0.25 U/ml) 25 µl를 혼합하여 37℃에서 10분간 반응하고 1 mM p-nitrophenol glucoside 용액 25 µl를 가하여 60℃에서 10분간 반응하였다. 이후 1M NaOH 25 µl를 첨가하여 반응을 정지시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 계산하였다[16].

$$\text{저해율(\%)} = [1 - (\text{시료 첨가구 효소활성} / \text{대조구 첨가구 효소활성})] \times 100$$

혈액응고 저해활성

살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 혈액응고 저해 활성은 기존의 보고한 thrombin time (TT), prothrombin time (PT) 및 activated partial thromboplastin time (aPTT) 을 측정하여 평가하였다[25]. 혈장은 시판 control plasma (MD Pacific Technology Co., Ltd, Huayuan Industrial Area, China), PT reagent와 aPTT reagent는 MD Pacific Hemostasis (MD Pacific Technology Co., Ltd, Huayuan Industrial Area, China)의 분석시약을, 기타 시약은 시약급 이상으로 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. 각각의 혈액응고활성은 3회 반복 측정하였으며, thrombin, prothrombin, 혈액응고인자 저해활성은 시료 첨가시의 TT, PT 및 aPTT의 평균값을 용매 대조구인 DMSO첨가시의 TT, PT 및 aPTT 평균값의 비로 각각 나타내었다[25]. 이때 시료 대조군으로는 aspirin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였으며, 각각의 실험은 3회 반복 측정하였다.

혈소판 응집 저해 활성

살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 추출물들의 혈소판 응집저해 활성은 기존에 보고한 방법과 동일하게, Whole Blood Aggregometer (Chrono-log, PA, U.S.A)를 이용한 impedance법[29]으로 평가하였다. 먼저 10 mM CaCl₂ 50 µl, suspending buffer 147.5 µl, 추출물 시료 5 µl 가 포함된 반응 cuvette에 50 µl의 혈소판(5×10⁸ cells/ml)을 넣은 후 3분 동안 37°C로 가온 후 응집유도제로 collagen (1 mg/ml)을 2.5 µl를 넣고 혈소판 응집을 측정하였다. 응집반응은 collagen 첨가 후 12분간 측정하였으며, amplitude, slope, area under curve (AUC)를 측정하여 평가하였으며, 최종 혈소판 응집 저해도(DPAI: Degree of Platelet Aggregation Inhibition)는 다음의 식에 의해 계산하였다[3].

$$\text{DPAI (\%)} = [(A-B)/A] \times 100.$$

A: 용매 대조구 DMSO처리시의 AUC, B: 시료 처리시 AUC

기타 분석

총 폴리페놀(total polyphenol) 및 총 플라보노이드(total flavonoid) 함량은 기존의 보고된 방법[26]에 따라 측정하였으며, 각각 rutin과 tannic acid를 표준시약으로 사용하였다. 총당 정량의 경우에는 phenol-sulfuric acid법을, 환원당 정량의 경우에는 DNS 변법을 이용하였다[30]. 각각의 분석결과는 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었다.

통계분석

실험 결과는 SPSS 24.0 버전을 사용하여 mean ± SD로 나타

내었으며, 각 군간의 차이는 ANOVA로 분석하였으며, Duncan 다중비교 검증법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 p<0.05로 하였다.

결과 및 고찰

표고버섯 재배용 살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 총당 및 환원당 분석

표고버섯 재배용 살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 추출효율은 1.0%(살균배지)에서 34.7%(표고버섯)로 다양하였으며, 1회 SMS (5.1%)보다 3회 SMS (9.2%)가 약 1.8배 높은 추출 수율을 보였다. 이는 표고버섯 재배기간이 길어질수록, 참나무 톱밥 배지의 분해로 인한 가용성 물질이 증가되며, 상대적인 균사체 함량이 증가하기 때문으로 판단된다[28]. 실제 살균배지에서의 진한 갈색의 참나무 조각들은 SMS에서는 모두 분해된 상태였으며, 열은 황색 및 백색 균사체로 채워져 있었다(Fig. 1). 조제된 추출물의 총 폴리페놀 함량 분석 결과, 살균 배지는 185.7 mg/g을 나타내어 표고버섯보다 22.1배 높은 함량을 보였으며, 1회 및 3회 SMS의 경우 각각 112.8, 87.6 mg/g을 나타내어, 살균배지의 폴리페놀 성분이 표고버섯 균사체 성장 및 버섯 자실체 형성에 따라 분해되고 있음을 알 수 있었다(Fig. 2A). 한편 총 플라보노이드 함량 분석결과, 살균 배지에서는 4.1 mg/g의 낮은 함량을 나타내었으나, 1회 및 3회 SMS의 경우 각각 11.7 및 10.3 mg/g을 나타내어, 표고버섯 균사체 대량증식에 따라 살균배지의 총 폴리페놀 함량은 감소하나, 총 플라보노이드 함량은 상대적으로 증가됨을 확인하였다(Fig. 2B).

총당 분석의 경우 살균배지에서 가장 높은 144.9 mg/g함량을 나타내었으며, 환원당 분석의 경우에는 1회 및 3회 SMS에서 가장 높은 53.4~54.0 mg/g함량을 보였다. 반면 표고버섯 추출물에서는 다른 시료와 달리 매우 낮은 총당(21.6 mg/g) 및 환원당(19.7 mg/g) 함량을 보였다(Fig. 2C, Fig. 2D). 따라서 상기 결과는 표고버섯 균사체 성장에 따른 살균배지의 고분자 다당류의 분해가 지속적으로 나타나고 있으며, 이에 따른 SMS의 성분 변화 및 활성변화가 나타나고 있음을 제시하고 있다.

표고버섯 재배용 살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 항산화 활성

조제된 표고버섯 재배용 살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 항산화 활성 평가 결과는 Fig. 3에 나타내었다. DPPH 음이온 소거능의 경우, 1회 및 3회 SMS추출물에서 24.8~27.7% 소거능을 보여 재배용 살균 배지 및 표고버섯 추출물의 4.9~14.0% 소거능보다 2~5배 우수하였다(Fig. 3A). ABTS 양이온 소거능은 살균배지 > 1회 SMS > 3회 SMS > 수확 표고버섯 순으로 나타났으며, 살균배지 추출물의 86.6%에 비해 1회 및 3회 SMS추출물에서도 71~77%의 소거능을 보여 SMS에서

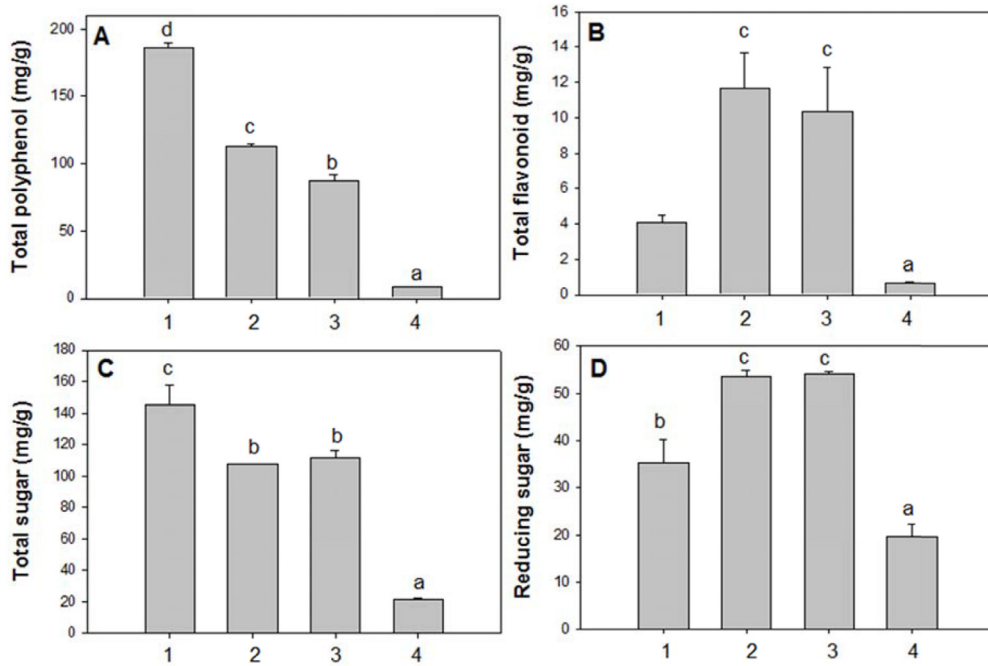


Fig. 2. Comparison of (A) total polyphenol, (B) total flavonoids, (C) total sugar and (D) reducing sugar contents of the hot-water extracts prepared from (1) un-inoculated sterilized medium, (2) SMS after 1st harvest, (3) SMS after 3rd harvest and (4) harvested shiitake. Data are presented as the mean ± SD of three determinations. Different superscript letters within a column differ significantly by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

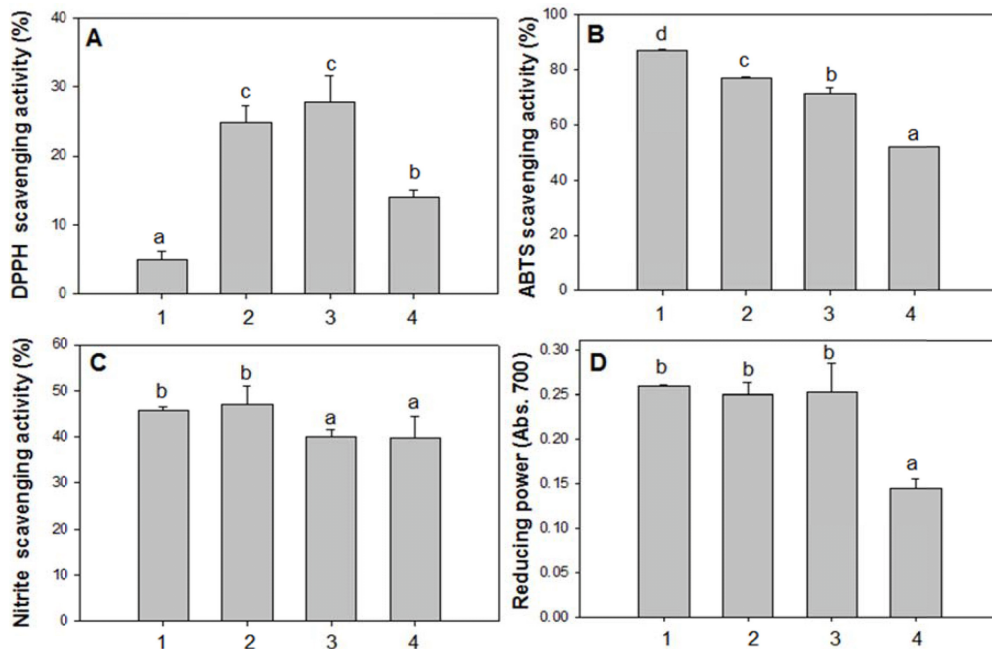


Fig. 3. Comparison of anti-oxidant activities of the hot-water extracts prepared from (1) un-inoculated sterilized medium, (2) SMS after 1st harvest, (3) SMS after 3rd harvest and (4) harvested shiitake. Data are presented as the mean ± SD of three determinations. Different superscript letters within a column differ significantly by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

도 양이온 소거능이 우수함을 확인하였다(Fig. 3B). 한편 nitrite 소거능 평가결과, 재배용 살균배지 및 1회 SMS 추출물에서 가장 우수한 45.9~47.0%의 소거능을 보였으며, 3회 SMS 및

표고버섯 추출물은 약 40% 소거능을 나타내었다(Fig. 3C). 환원력의 경우, 살균배지 및 SMS추출물이 OD 700 nm에서 0.250~0.259값을 나타내어 유사한 환원력을 보였으며, 표고버

Table 1. Calculated RC₅₀ of the hot-water extracts prepared from un-inoculated sterilized medium, spent mushroom medium (SMS) and harvested shiitake

Samples/Chemicals	Radical scavenging activity : RC ₅₀ (µg/ml) ¹⁾		
	DPPH	ABTS	Nitrite
Un-inoculated medium	2,185	183	216
SMS after 1 st harvest	1,073	200	213
SMS after 3 rd harvest	950	220	255
Harvested shiitake	1,834	484	242
Vitamin C	10.8	3.3	16.7

¹⁾RC₅₀: The concentration required to scavenge 50% of particular radical under the standard conditions.

첫 추출물보다 약 1.8배 높은 환원력을 보였다(Fig. 3D). 따라서 SMS 추출물은 다양한 라디칼에 대한 소거능 및 환원력을 보유하고 있음을 확인하였다.

한편 다양한 농도의 추출물 시료의 항산화력을 측정하여 RC₅₀을 계산하였으며, 그 결과는 Table 1에 나타내었다. DPPH 음이온, ABTS 양이온 및 nitrite 소거능에 대한 3회 수확 후 SMS의 RC₅₀는 각각 950, 220 및 255 µg/ml 로 계산되었다. 이는 vitamin C의 DPPH 음이온, ABTS 양이온 및 nitrite 소거능에 대한 RC₅₀가 각각 10.8, 3.3 및 16.7 µg/ml 임을 고려하면 상대적으로 약한 항산화 활성임을 알 수 있다. 그러나 SMS 추출물이 정제되지 않은 상태이며, SMS의 RC₅₀값이 가시오가피(630 µg/ml), 백부자(540 µg/ml), 산수유(700 µg/ml) 및 삼지구엽초(800 µg/ml) 등의 일반적인 약용식물 및 한약재들과 유사하므로[28], SMS를 이용한 항산화 활성 조성물 개발이 가능함을 제시하고 있다.

최근 표고버섯 SMS로부터 정제된 항산화 고분자 다당류의 DPPH 음이온, ABTS 양이온 및 SOD radical 소거능에 대한 RC₅₀가 각각 51, 379 및 719 µg/ml 로 보고된 바[36], 본 연구의 열수 추출물에 비해 DPPH 음이온 소거능은 약 18배 우수하나, ABTS 양이온 소거능은 오히려 1/2의 미약한 활성을 보였다. 따라서 본 SMS 추출물은 양이온 소거 활성물질을 다량 포함하며, 고분자 다당류는 주로 음이온 소거 활성물질로 구성된 것으로 추측된다. 이러한 결과는 표고버섯 SMS가 다양한 내열성 항산화 물질을 포함하고 있음을 제시하며, 활성물질의 정제시 실제적 이용가능성이 높을 것으로 예상된다.

표고버섯 재배용 살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 항균 활성

조제된 표고버섯 재배용 살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 항세균 및 항진균 활성을 평가한 결과, 평가에 사용한 세균 및 진균 모두에 대해 항균력을 나타내지 않았다(Results not shown). 반면, 대조구로 사용된 ampicillin과 miconazole은 각각 광범위하면서도 강력한 항세균 및 항진균 활

성을 나타내었다. 기존 표고버섯 추출물의 항균활성[13] 및 표고버섯 균사체의 항균활성이 보고[12]된 바 있으나, 그 사용농도가 각각 43 mg/disc 및 30 mg/ml로 본 연구의 실험농도(0.5 mg/disc)와 많은 차이가 있으며, 또한 기존 보고된 SMS내의 항균 다당류[35]는 순수 정제된 상태로 본 실험과 비교는 어려운 상태이다. 따라서, 향후 SMS의 고농도 추출물 및 특정 성분의 추출, 정제에 따른 항균 활성을 기대할 수 있을 것으로 판단되나, 현재의 열수 추출물의 항균 활성은 인정되지 않았다.

표고버섯 재배용 살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 α-amylase and α-glucosidase 저해활성

조제된 표고버섯 재배용 살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 항당뇨 활성 평가를 위해 α-amylase and α-glucosidase 저해활성을 평가하였으며, 그 결과, 1회 및 3회 SMS 추출물 0.5 mg/ml 농도에서 16.4~17.3%의 우수한 α-glucosidase 저해활성을 확인하였다(Fig. 4). 한편 임상에서 α-glucosidase 저해제로 사용되고 있는 acarbose는 동일농도에서 75.5%의 강력한 저해를 나타내었다. 반면, 모든 시료에서 α-amylase 저해는 나타나지 않았다(Results not shown). 향후 SMS의 α-glucosidase 저해물질의 정제, 특성 확인을 통해 사료로 이용시의 소화 흡수 증대 및 산독증(acidosis) 예방을 위한 α-glucosidase 저해제 조성물로의 개발 가능성을 검토하는 것이 필요하다고 판단된다[11].

표고버섯 재배용 살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 항응고 활성

조제된 표고버섯 재배용 살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 항혈전 활성 평가를 위해 TT, PT 및 aPTT를 각각

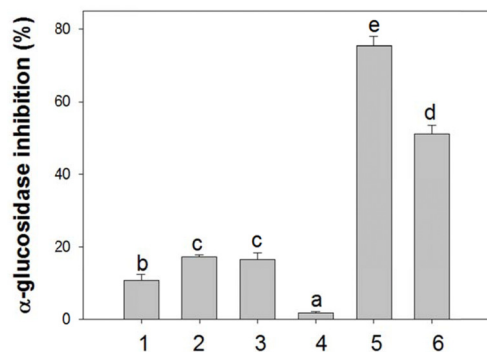


Fig. 4. Comparison of α-glucosidase inhibitory activity of the hot-water extracts prepared from (1) un-inoculated sterilized medium (0.5 mg/ml), (2) SMS after 1st harvest (0.5 mg/ml), (3) SMS after 3rd harvest (0.5 mg/ml), (4) harvested shiitake (0.5 mg/ml), (5) acarbose (0.5 mg/ml) and (6) acarbose (0.0625 mg/ml). Data are presented as the mean ± SD of three determinations. Different superscript letters within a column differ significantly by Duncan's multiple range test (p<0.05).

측정하였으며, 그 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 먼저 대조구로 사용된 aspirin의 경우 5 mg/ml 농도에서 TT, PT 및 aPTT를 모두 무첨가구에 비해 15배 이상 연장시켰으며, 1.5 mg/ml 농도에서도 TT, PT 및 aPTT를 각각 1.55배, 1.39배 및 1.46배 연장시켜 혈액응고를 효율적으로 저해함을 확인하였다. 한편 살균 배지 및 표고버섯 추출물의 경우 5 mg/ml 농도에서 TT, PT 및 aPTT를 각각 무첨가구에 비해 1.05배, 1.51배, 1.25배와 1.07배, 0.93배, 1.10배 증가시켜 약한 prothrombin 및 혈액응고인자 저해를 보였다. 그러나 1회 및 3회 SMS 추출물의 경우, 5 mg/ml 농도에서 TT, PT 및 aPTT를 각각 무첨가구에 비해 15배 이상, 1.76배, 4.97배와 15배 이상, 1.05배, 13배 증가시켜

우수한 항응고 활성을 나타내었다. 특히 SMS 추출물들은 6 mg/ml 이상의 농도에서는 강력한 thrombin 및 혈액응고인자 저해를 보여 TT 및 aPTT를 무첨가구에 비해 모두 15배 이상 연장시켰다(Fig. 5). 최근 표고버섯 물 추출물에서 38KDa의 피브리린 분해효소[4]와 표고버섯 메탄올 추출물 및 이의 에틸아세테이트 분획물(1 mg/ml)에서 내인성 혈액응고인자 저해에 의한 항혈전 활성(aPTT) [6]이 보고된 바 있으나, SMS에서의 트롬빈, 프로트롬빈 및 혈액응고인자 저해에 의한 강력한 항혈전 활성은 현재까지 알려진 바 없으며, 이러한 활성은 참나무 톱밥 살균배지에서의 표고버섯 균사체 성장에 의해 생성된 물질에 기인한 것으로 판단된다. 상기 결과는 표고버섯 SMS가 신규의 항혈전 소재로 개발 가능성을 제시하고 있다.

표고버섯 재배용 살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 혈소판 응집저해 활성

조제된 표고버섯 재배용 살균 배지, SMS 및 표고버섯의 열수 추출물의 항혈전 활성 평가의 일환으로 인간 혈소판 응집저해 활성을 평가하였다. 먼저 항혈전제인 aspirin은 농도의존적으로 혈소판 응집을 저해하였으며, 0.125 mg/ml 농도에서 14.07%의 응집저해, 0.25 mg/ml 농도에서 75.12%의 응집저해를 나타내었다(Table 2). 재배용 살균배지의 열수 추출물은 경우 27.36%의 양호한 응집저해를 나타낸 반면, SMS 및 표고버섯 추출물들은 -6.25~4.05%의 응집저해를 나타내어 혈소판 응집에 미미한 영향을 보였다. 따라서 SMS 추출물이 혈소판 응집을 촉진하여 과도한 혈전 생성을 유발하지는 않을 것으로 판단되었다.

이상의 결과는 별도의 용도 없이 폐기되고 있는 표고버섯 SMS를 다양한 축산 폐기물의 분해제(myco-remediator), 기능성 사료 및 첨가제 등의 신규의 기능성 생물자원으로 이용 가능성을 제시하고 있으며[19, 20], 또한 표고버섯 SMS의 항산화, 항혈전 및 항당뇨 활성을 이용한 사료 조성물 및 첨가물로 개발 가능성을 제시하고 있다. 특히 표고버섯 SMS의 열수 추출물은 축산 산업에서 옥수수수와 같은 전분 급여로 야기될 수 있는 산독증 예방 및 면역증강제로 사용 가능할 것으로 판단된다[11, 22].

한편 SMS에 대한 기존 연구는 사료, 퇴비로의 이용 및 배지 재사용에 집중되어 유용 생리활성은 거의 알려지지 않은 상태이나, 본 연구에서는 표고버섯 SMS 추출물의 강력한 항응고 활성 및 α-glucosidase 저해활성을 최초로 확인하였으며, 기존의 알려진 항산화 활성[5, 36]도 확인하였다. 그러나, 다양한 병원성 및 식중독 세균, 진균에 대한 항균 활성은 인정되지 않았다. 최근 80% 참나무 톱밥과 20% 미강을 포함하는 표고버섯 배지의 80℃ 열수 추출물[7]과 노루궁뎅이 SMS추출물에서 *Phytophthora capsici*의 균사체 생육억제 및 토마토 풋마름병 방제효과[15, 17]가 보고된 바 있으며, 주요 항균물질은 oxalic acid로 추측되었다[16]. 비록 본 표고버섯 SMS 추출물(0.5

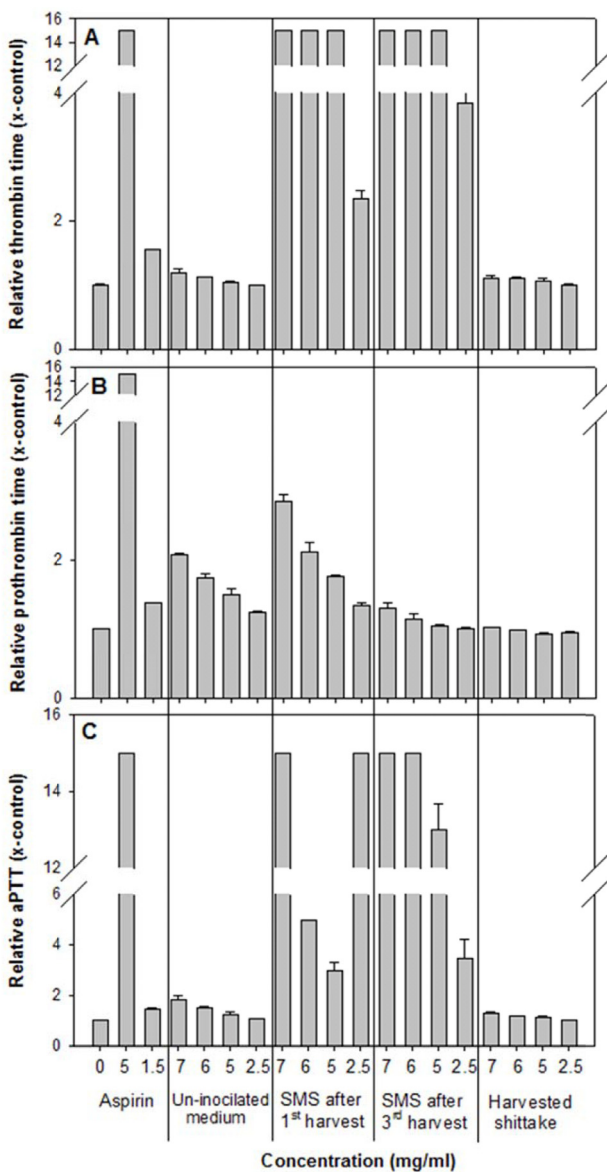


Fig. 5. Comparison of anti-coagulation activities of the hot-water extracts prepared from un-inoculated sterilized medium, spent mushroom medium (SMS) and harvested shiitake.

Table 2. Platelet aggregation inhibitory activities of the hot-water extracts prepared from un-inoculated sterilized medium, spent mushroom medium (SMS) and harvested shiitake

Chemicals/Samples	Conc. (mg/ml)	Amplitude (Ω)	Slope (Ω/min)	Lag time (sec)	Area under curve	DPAI ¹⁾ (%)
DMSO	-	20	3	40	140.7	0.0
Aspirin	0.25	6	1	30	35.0	75.12
	0.125	18	3	36	120.9	14.07
Un-inoculated medium	0.25	15	2	30	102.2	27.36
SMS after 1 st harvest	0.25	22	3	26	149.5	-6.25
SMS after 3 rd harvest	0.25	16	3	14	135.0	4.05
Harvested shiitake	0.25	17	4	9	148.6	-5.61

¹⁾DPAI: Degree of Platelet Aggregation Inhibition. Data are presented as a representative result relative of independent three determinations. Amplitude is expressed as ohms by maximum extent of platelet aggregation, and slope (rate of reaction) is determined by drawing a tangent through the steepest part of curve. Lag time is expressed as delayed time for platelet aggregation after addition of collagen. Area under curve is a calculated area in descent drawing during platelet aggregation.

mg/disc)에서는 유의적인 항균활성이 인정되지 않았으나, 이는 SMS 추출조건, 추출물 사용농도, 사용 균주 및 disc diffusion 항균 활성 평가의 차이로 이해된다. 따라서 상기의 보고[7, 15, 16]와 표고버섯 및 표고버섯 균사체의 항균력을 고려할 때[12, 13], 표고버섯 배지성분의 변화, 활성물질의 조정제 및 적합한 부형제 첨가[17]로 SMS 추출물을 식물 성장 촉진 및 천연 항균제로 개발 가능하리라 예상된다.

향후 SMS열수 추출물의 실제적인 이용을 위해서는, SMS내의 유용 활성물질의 정제 및 이의 작용기전 연구는 물론, 표고버섯 재배 원재료인 참나무 톱밥 및 SMS의 중금속 및 잔류농약 평가, 표고버섯 재배중의 세균 및 곰팡이에 의한 오염도 저감, SMS의 microbiome, 배지를 성형할 때 사용되는 비닐백의 안전 대응제 개발 연구가 필요하며, 또한 낮은 수분함량(~50%)을 가진 SMS의 적합한 분쇄 및 추출법 연구도 필수적으로 진행되어야 한다고 판단된다. 현재 표고버섯SMS로부터 항응고 활성이 우수하면서도 혈소판 응집을 동시에 저해할 수 있는 활성물질, 항산화 및 항당뇨 활성물질의 확인 및 정제가 진행 되고 있다.

감사의 글

본 연구는 2017년도 산업통상자원부 바이오테라피산업기반구축사업(과제번호 N0001805)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A. and Pintado, M. A. 2012. Review on antimicrobial activity of mushroom (*Basidiomycetes*) extracts and isolated compounds. *Planta Med.* **78**, 1707-1718.
- Bae, J. S., Kim, Y. I., Jung, S. H., Oh, Y. G. and Kwak, W. S. 2006. Evaluation on feed-nutritional value of spent mushroom (*Pleurotus osteratus*, *Pleurotus eryngii*, *Flammulina velutipes*) substrates as a roughage source for ruminants. *J. Anim. Sci. Technol. Kor.* **48**, 237-246.
- Chen, H., Qi, X., He, C., Yin, Z., Fan, D. and Han, G. 2013. Coagulation imbalance may not contribute to the development of portal vein thrombosis in patients with cirrhosis. *Thrombosis Res.* **131**, 173-177.
- Choi, J. H., Kim, K. J. and Kim, S. 2018. Purification and antithrombotic potential of a fibrinolytic enzyme from shiitake culinary- medicinal mushroom, *Lentinus edodes* GNA01 (*Agaricomycetes*). *Int. J. Med. Mushrooms* **20**, 47-59.
- Han, S. R., Kim, M. J. and Oh, T. J. 2015. Antioxidant activities and antimicrobial effects of solvent extracts from *Lentinus edodes*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 1144-1149.
- Hwang, K. H., Kim, H. K. and Han, Y. N. 1997. Inhibitory activity of edible mushrooms on the tissue thromboplastin (Tissue Factor). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**, 161-166.
- Kang, D. S., Min, K. J., Kwak, A. M., Lee, S. Y. and Kang, H. W. 2017. Defense response and suppression of phytophthora blight disease of pepper by water extract from spent mushroom substrate of *Lentinula edodes*. *Plant Pathol. J.* **33**, 264-275.
- Kim, E. Y., Kook, S. W., Yuk, H. J., Yoon, M. H. and Kim, S. C. 2016. Compost production using vegetable waste and spent oak mushroom substrate (SMS). *J. Mushrooms* **14**, 237-243.
- Kim, H., You, J., Jo, Y., Lee, Y., Park, I., Park, J., Jung, M. A., Kim, Y. S. and Kim, S. 2013. Inhibitory effects of *Lentinus edodes* and rice with *Lentinus edodes mycelium* on diabetes and obesity. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 175-181.
- Kim, M. J., Chu, W. M. and Park, E. J. 2012. Antioxidant and antigenotoxic effects of shiitake mushrooms affected by different drying methods. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1041-1048.
- Kim, M. S., Ahn, S. M., Jung, I. C., Kwon, G. S. and Sohn, H. Y. 2010. Screening of α - amylase and α-glucosidase inhibitor from Nepalese plant extracts. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 183-189.
- Kim, S. M. and Kim, E. J. 2011. Development of resources

- for functional food and biological activity of *Lentinus edoes* mycelium. *Kor. J. Herbolgy* **26**, 25-30.
13. Kim, Y. D., Kim K. J. and Cho, D. B. 2003. Antimicrobial activity of *Lentinus edodes* extract. *Kor. J. Food Preserv.* **10**, 89-93.
 14. Kupcova, K., Stefanova, I., Plavcova, Z., Hosek, J., Hrouzek, P. and Kubec, R. 2018. Antimicrobial, cytotoxic, anti-inflammatory, and antioxidant activity of culinary processed shiitake medicinal mushroom (*Lentinus edodes*, Agaricomycetes) and its major sulfur sensory-active compound-lenthionine. *Int. J. Med. Mushrooms* **20**, 165-175.
 15. Kwak, A. M., Kang, D. S., Lee, S. Y. and Kang, H. W. 2015. Effect of spent mushroom substrates on phytophthora blight disease and growth promotion of pepper. *J. Mushrooms* **13**, 16-20.
 16. Kwak, A. M., Lee, I. K., Lee, S. Y., Yun, B. S. and Kang, H. W. 2016. Oxalic acid from *Lentinus edodes* culture filtrate: Antimicrobial activity on phytopathogenic bacteria and qualitative and quantitative analyses. *Mycobiology* **44**, 338-342.
 17. Lee, S. Y., Kwak, H. S., Kang, H. W., Kang, D. S., Kim, J. J. and Han, J. H. 2016. Control of tomato bacterial wilt by the prototypes extracted from spent media substrate of *Hericium erinaceus*. *Kor. J. Mycol.* **44**, 318-322.
 18. Luo, X., Yuan, X., Wang, S., Sun, F., Hou, Z., Hu, Q., Zhai, L., Cui, Z. and Zou, Y. 2018. Methane production and characteristics of the microbial community in the co-digestion of spent mushroom substrate with dairy manure. *Bioresour. Technol.* **250**, 611-620.
 19. Meng, L., Zhang, S., Gong, H., Zhang, X., Wu, C. and Li, W. 2018. Improving sewage sludge composting by addition of spent mushroom substrate and sucrose. *Bioresour. Technol.* **253**, 197-203.
 20. Meng, X., Liu, B., Xi, C., Luo, X., Yuan, X., Wang, X., Zhu, W., Wang, H. and Cui, Z. 2018. Effect of pig manure on the chemical composition and microbial diversity during co-composting with spent mushroom substrate and rice husks. *Bioresour. Technol.* **251**, 22-30.
 21. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA). 2016. *Production records of a crop for a special purpose*. pp20.
 22. Nisar, J., Mustafa, I., Anwar, H., Sohail, M. U., Hussain, G., Ullah, M. I., Faisal, M. N., Bukhari, S. A. and Basit, A. 2017. Shiitake culinary-medicinal mushroom, *Lentinus edodes* (Agaricomycetes): A species with antioxidant, immunomodulatory, and hepatoprotective activities in hypercholesterolemic rats. *Int. J. Med. Mushrooms* **19**, 981-990.
 23. Park, H. J., Kim, D. I., Lee, S. H., Lee, Y. M., Jeong, H. J., Cho, S. M., Chun, H. K. and Lillhoj, H. S. 2005. Supplementary effect of *Lentinus edodes* with different harvest period and part on neurotransmitters and lipid peroxide levels in the brain of diabetic mice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 1182-1187.
 24. Park, K. M. and Lee, B. W. 1998. Extraction and purification of antitumor protein-bound polysaccharides from mycelia of *Lentinus edodes*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**, 1236-1242.
 25. Ryu, H. Y., Ahn, S. M., Kim, J. S. and Sohn, H. Y. 2010. Evaluation of in-vitro anticoagulation activity of 33 different medicinal herbs. *J. Life Sci.* **20**, 922-928.
 26. Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalcau reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152-178.
 27. Suess, A. and Curtis, J. 2006. Value-added strategies for spent mushroom substrate in BC. Victoria: British Columbia Ministry of Agriculture. Report.
 28. Sung H. J., Pyo. S. J., Kim, J. S., Park, J. Y. and Sohn, H. Y. 2018. Physico-chemical, nutritional, and enzymatic characteristics of spent mushroom substrate (SMS) of shiitake. *J. Life Sci.* In press.
 29. Sweeney, J. D., Hoerning, L. A. and Fitzpatrick, J. E. 1989. Whole blood aggregation in Von willebrand disease. *Amer. J. Hematol.* **32**, 190-193.
 30. Valentina, U., Fabcic, J. and Stampar, F. 2007. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* **107**, 185-192.
 31. Yoo, Y. B., Oh, M. J., Oh, Y. L., Shin, P. G., Jang, K. Y. and Kong, W. S. 2016. Development trend of the mushroom industry. *J. Mushrooms* **14**, 142-154.
 32. Williams, B. C., McMullan, J. T. and McCahey, S. 2001. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock. *Biores. Technol.* **79**, 227-230.
 33. Zhang, G. Q., Wu, Y. Y., Ng, T. B., Chen, Q. J. and Wang, H. X. 2013. A phytase characterized by relatively high pH tolerance and thermostability from the shiitake mushroom *Lentinus edodes*. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 540239.
 34. Zhang, Y., Liu, W., Xu, C., Huang, W. and He, P. 2017. Characterization and antiproliferative effect of novel acid polysaccharides from the spent substrate of shiitake culinary-medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Agaricomycetes) Cultivation. *Int. J. Med. Mushrooms* **19**, 395-403.
 35. Zhu, H., Sheng, K., Yan, E., Qiao, J. and Lv, F. 2012. Extraction, purification and antibacterial activities of a polysaccharide from spent mushroom substrate. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 840-843.
 36. Zhu, H., Tian, L., Zhang, L., Bi, J., Song, Q., Yang, H. and Qiao, J. 2018. Preparation, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from spent *Lentinus edodes* substrate. *Int. J. Biol. Macromol.* **112**, 976-978.

초록 : 표고버섯 수확 후 배지의 유용 생리활성 평가

성화정¹ · 표수진¹ · 박종이² · 손호용^{1*}

(¹안동대학교 식품영양학과, ²경북바이오산업연구원)

국내 표고버섯은 참나무 톱밥을 주 원료로 한 인공배지를 이용하여 재배하고 있으며, 표고버섯 재배 후 부산물로 발생하는 [수확 후 배지](Spent Mushroom Substrate: SMS)는 약 50,000톤으로 추정된다. 본 연구에서는 별도의 용도 없이 폐기되고 있는 표고버섯 SMS를 유용 생물자원으로 이용하기 위해, 1회 수확 후 SMS 및 3회 수확 후 SMS의 열수 추출물을 조제하여 이들의 항산화, 항균, 항당뇨, 항응고 및 혈소판 응집저해활성을 평가하였다. 대조구로는 재배용 살균배지 및 표고버섯의 열수 추출물을 이용하였다. 그 결과, 표고버섯 SMS 추출물은 표고버섯 및 살균배지 추출물보다 우수한 DPPH 음이온, ABTS 양이온 nitrite 소거능 및 환원력을 나타내었다. 1회 및 3회 SMS 추출물들은 0.5 mg/disc 농도에서는 사용된 세균 및 진균에 대한 항균력이 나타나지 않았으나, 0.5 mg/ml 농도에서 우수한 α -glucosidase 저해활성을 나타내었다. 또한 thrombin time, prothrombin time, activated partial thromboplastin time 및 혈소판 응집저해 활성 측정 결과, SMS 추출물들은 혈소판 응집에는 미미한 영향을 나타내었으나, 강력한 혈액응고저해 활성을 나타내어 항혈전 조성물로 개발 가능성을 확인하였다. 본 연구결과는 SMS를 폐기 대상이 아닌, 표고버섯 균사체가 대량 배양된 생물자원으로 고려하는 것이 필요함을 제시하며, SMS를 이용한 항산화, 항당뇨, 항혈전 조성물 개발이 가능함을 제시하고 있다.