

표고 유산균 발효물의 성분 및 간기능 보호 효과

임승빈¹ · 김경제¹ · 진성우¹ · 고영우¹ · 하늘이¹ · 정희경¹ · 이재근¹ · 윤경원² · 서경순^{1*}¹장흥군버섯산업연구원²순천대학교 바이오한약자원학과Chemical components and hepato-protective effect of *Lentinula edodes* fermented by lactic acid bacteriaSeung-Bin Im¹, Kyung-Je Kim¹, Seong-Woo Jin¹, Young-Woo Koh¹, Neul-I Ha¹, Hee-Gyeong Jeong¹, Jae-Keun Lee¹, Kyeong-Won Yun², and Kyoung-Sun Seo^{1*}¹Jangheung Research Institute for Mushroom Industry, Jangheung 59338, Korea²Department of Oriental Medicine Resources, Suncheon Nat'l University, Suncheon 57922, Korea

ABSTRACT: This study was conducted to improve the useful components and biological activity of *Lentinula edodes* fermented by lactic acid bacteria (LAB). Three LAB strains (*Lactobacillus brevis* KCCM 11904, *L. plantarum* KCCM 354469, and *L. fermentum* KCCM 12116) were inoculated and used for *L. edodes* hot water extract (10%, 20%, 30%) fermentation. LAB fermentation of *L. edodes* hot water extracts decreased pH and thus were more acidic than non-fermented *L. edodes* hot water extract. β -glucan and ergothioneine contents were increased by *L. edodes* in a concentration-dependent manner. The ergothioneine and β -glucan contents were highest in fermented with 30% *L. edodes* hot water extract fermented by *L. plantarum* and *L. brevis* (40.48 mg/100 g and 13.94%, respectively). The hepato-protective effect of fermented *L. edodes* hot water extracts by the three LAB were tested using Sprague-Dawley rat primary hepatocytes. In primary hepatocytes obtained following liver injury induced by acetaminophen, fermented *L. edodes* hot water extracts by the three LAB showed protective effects, as evident by reduction of the aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and lactate dehydrogenase liver markers. The collective results indicate that the fermented *L. edodes* hot water extracts obtained using LAB are potentially valuable in preventing or treating liver disease.

KEYWORDS: *Lentinula edodes*, Lactic acid bacteria, Fermentation, Useful components, Hepato-protective effects

서론

버섯은 무기질과 단백질이 풍부하고 비타민 B, D가 많아 고지혈증과 같은 성인병을 예방하는 효과가 있어 우리나라에서 흔하게 소비되는 식품 중 하나이다(Kim, 2012). 또한 당 및 핵산이 풍부하며, 항암, 면역물질로 알려진 β -glucan, ergosterol 및 항산화 효과가 있는 폴리페놀 성분들이 함유된 천연 건강기능 소재로 오랫동안 연구되어 왔다(Kim *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007; Mau *et al.*, 2002). 국산 버섯을 대표하는 표고(*Lentinula edodes*)는 담자균류 느타리과에 속하는 균류로 봄에서 가을까지 참나무 등의 활엽수에 기생하거나 나무토막 또는 그루터기에서 자라는 버섯으로 예부터 느타리버섯과 더불어 식용으로 널리 이용되고 있으며, 상업적인 인공재배가 활발히 이루어지는 버섯이다(Jiang *et al.*, 2013). 표고에는 당질, 단백질, 무기질 및 비타민 등의 영양성분이 풍부하며 칼슘과 인, 철분 등 무기질 뿐 아니라 ergothioneine, eritadenine

J. Mushrooms 2021 September, 19(3):191-199
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2021.19.3.191>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

Seung-Bin Im(Research engineer), Kyung-Je Kim(Principal Research engineer), Seong-Woo Jin(Senior Research engineer), Young-Woo Koh(Research engineer), Neul-I Ha(Research engineer), Hee-Gyeong Jeong(Research engineer), Jae-Keun Lee(Research engineer), Kyeong-Won Yun(Professor), Kyoung-Sun Seo(Principal Research engineer)

*Corresponding author

E-mail : astragali@daum.net

Tel : +82-61-862-8877, Fax : +82-61-862-8847

Received August 31, 2021

Revised September 15, 2021

Accepted September 23, 2021

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.

과 β -glucan 등의 면역증진에 도움을 주는 성분을 함유하고 있다(Hong *et al.*, 1988).

간은 섭취한 음식물들을 여러 조직에서 필요한 영양소의 형태로 변화시키고, 조직에서 이용하고 남은 노폐물들을 처리하는 신체의 대사과정을 담당하는 인체의 중요한 장기 중 하나이다(Kim, 2019). 간 기능의 장애는 인체가 방어 해독 작용을 하지 못해 면역 체계에 이상을 가져와 다른 질병의 원인이 되기도 한다(Kim, 2019). 외부 또는 내부의 유해물질로부터 인체의 간 손상을 방지하고 손상된 간을 치유할 수 있는 천연물이나 천연소재 개발을 활용한 건강기능식품, 의약품 등의 개발 및 연구가 널리 수행되고 있다. 이 중 표고 추출물의 간 기능 보호 효과는 주로 표고 균사체에 함유된 polysaccharide인 β -glucan에 기인한다고 보고되었다(Mizuno, 1995; Hazama *et al.*, 2009). 표고의 polysaccharide 중 lentinan은 β -(1 \rightarrow 3)-glucose를 기본골격으로 5개의 β -(1 \rightarrow 3)-glucose마다 2개의 β -(1 \rightarrow 6)-glucose 가지를 갖는 구조를 갖고 있고(Hobbs, 2000; Zhoua *et al.*, 2009), 면역증진과 간보호 기능을 갖는 것으로 보고되었다(Ross *et al.*, 1999, Yamamoto *et al.*, 1997). 기존 연구에서는 유해 화학물질인 D-galactosamine, dimethylnitrosamine, CCL₄, ethanol을 투여하여 급성 또는 만성 간기능장애를 유발한 rat에 표고 추출물 처리 시험구가 대조구에 비해서 glutamate-oxalate transaminase (GOT)와 glutamate-pyruvate transaminase (GPT)의 유출이 적고, 간손상이 적었으며, 혈청 단백질 함량이 낮다고 보고한 바 있다(Akamatsu *et al.*, 2004; Morinaga *et al.*, 1994; Terada *et al.*, 2001).

최근 유산균, 효모, 버섯 균 등의 미생물을 활용한 발효 기술의 연구를 통해 다당체, 올리고당, 아미노산 등의 발효 산물을 얻고, 상호 간의 시너지 작용으로 생리활성 효능이 상승된다는 연구가 많이 진행되고 있다(Ahn *et al.*, 2013). 이러한 유산균은 소화에 도움이 되며 장질환 발생을 억제하여 면역력 증가에 효과적이다(Jun *et al.*, 1999; Shiada *et al.*, 1998). 유산균은 발효를 통하여 젖산 및 여러 가지 대사산물을 생산하는 미생물로 각종 발효식품, 건강기능식품, 의약품 등으로 널리 이용되고 있고, 근래 건강 증진 및 질병 예방의 특징을 가지는 probiotics 균주에 대한 연구와 응용이 증가되고 있으며(Kim and Lim, 2018), 천연물의 유효 활성성분 및 생리활성의 증가를 목적으로 유산균 발효를 활용한 다양한 연구들이 진행되고 있다(Chang and Park 2003; Jeon *et al.*, 2011; Kim and Gilliland, 1983). 대표적인 유산균인 *Lactobacilli*와 *Bifidobacteria*는 β -glucosidase 활성을 가지고 있어 다양한 식물 배당체의 장내 가수분해에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Choi *et al.*, 1999; Jeon *et al.*, 2002).

본 연구에서는 기존 발표된 문헌에 간 보호 기능이 있다고 알려진 표고추출농축액을 *Lactobacillus brevis*,

Lactobacillus plantarum 및 *Lactobacillus fermentum* 세 종류의 유산균으로 발효시켜, 표고의 대표적인 면역, 항산화물질인 β -glucan과 ergothioneine의 증감 및 간 보호 효과를 검정하였다. 또한 본 연구결과는 표고 유산균 발효물을 건강기능식품, 의약품 등 다양한 용도로 쓰일 수 있는 소재개발을 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용한 원목표고는 (재)장흥군버섯산업연구원에서 직접 재배하여 수확한 버섯을 사용하였고, 버섯 추출물의 발효를 위해 사용된 유산균은 한국미생물보전센터(KCCM)로부터 3종(*Lactobacillus brevis* KCCM 11904, *Lactobacillus plantarum* KCCM 354469, *Lactobacillus fermentum* KCCM 12116) 분양 받았다.

시약

본 실험에서 사용된 분석 및 추출, chromatography용 용매와 시약은 일급 또는 특급시약을 구입하여 사용하였다.

표고 유산균 발효물의 제조

표고 유산균 발효물 제조를 위하여 원목표고 3 kg을 분쇄하여 50 mesh를 통과한 분말을 시료로 하였으며, 80°C 열수 10 L로 추출하였다. 추출액은 10 brix 농축액으로 원유에 10%, 20%, 30%의 버섯 추출물을 각각 첨가한 뒤, glucose 1%씩 첨가하여 15분간 멸균하였다. 멸균된 추출물은 무균상 내에서 방랭 한 후 액체배양 된 3종의 유산균을 10 mL씩 접종하여 저온배양기를 이용하여 37°C의 온도조건에서 96시간 배양하였다.

pH 및 적정산도 측정

발효물의 pH는 pH meter (Orion 940, USA)를 이용하여 측정하였고, 산도는 식품공전에 준하여 측정하였다. 즉, 발효물 10 mL에 동량의 증류수를 가하여 1% phenolphthalein을 가한 후 0.1 N NaOH용액으로 적정하여 홍색이 유지되는 시점에 소비량을 측정하고, 다음 식으로 환산하였다.

각각의 발효물은 여과한 뒤 동결건조 하여 냉동보관 하면서 실험에 사용하였다.

Ergothioneine 함량 분석

에르고티오네인은 Dubost (2007)의 방법으로 분석하였다. 동결건조물 0.2 g에 20 mL cold ethanol extraction 용액(10 mM DTT, 100 μ M betaie, 100 μ M MMI in 70% ethanol)을 첨가 및 교반하였다. 각 용액은 3분간 sonication하여 1% SDS 함유 에탄올 용액 4 mL를 첨가하여 혼합 후, 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다.

Table 1. HPLC operating parameter for the analysis of ergothioneine

	Condition
Instrument	Agilent Technologies 1200 Series
Column	Agilent Econosphere C ₁₈ (4.6 × 150 mm, 3.5-micron)
Solvent	50 mM Sodiumphosphate / 3% ACN
Column temp.	28.8°C
Wavelength	UV 254 nm
Flow rate	0.7 mL/min
Injection volume	10 uL

상등액 10 mL를 취해 건조하고, 증류수 10 mL를 첨가하여 녹인 후 0.45 μm membrane filter로 여과한 다음 HPLC용 분석 시료로 사용하였다. HPLC 분석 조건은 Table 1과 같다. 표준용액인 L-(+)-Ergothioneine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 검량선 ($R^2=0.9994$)을 작성하였으며 시료의 에르고티오네인 함량은 외부표준법으로 계산하였다.

β -Glucan 함량 분석

발효물의 β -glucan 함량은 mushroom and yeast beta-glucan assay procedure kit (Megazyme, Ireland)를 이용하여 측정하였다. 먼저 total glucan은 100 mesh 체로 거른 분쇄 시료 100 mg 을 tube에 넣어 37% HCl 1.5 mL 을 넣고 45분간 30°C water bath에 넣어 분해하였다. 그 후 증류수 10 mL을 넣어 vortex하고, 100°C에서 2시간 incubation 시켰다. 그 후 실온에서 식히면서 2 N KOH를 10 mL씩 넣고 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)로 100 mL 정용 후 충분히 mixing 하였다. 200 mM sodium acetate buffer에 녹인 exo-1,3- β -glucanase (20 U/mL)와 β -glucosidase (4 U/mL) 0.1 mL를 상등액 0.1 mL에 넣고, reagent blank는 acetate buffer 0.2 mL을 넣고, D-glucose standard 0.1 mL과 acetate buffer 0.1 mL을 넣고 혼합 후 40°C에서 60분 동안 incubation 하였다. GOPOD (Glucose oxidase/peroxidase mixture, Megazyme) 3 mL을 넣고 40°C에서 20분 동안 incubation 한 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. α -Glucan은 100 mesh 체로 거른 분쇄 시료 100 mg을 tube에 넣고 2 M KOH 2 mL씩 넣고 20분간 mixing 하였다. 1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8) 8 mL를 넣고 섞은 후 amyloglucosidase (1630 U/mL) plus invertase (500 U/mL) 0.2 mL을 넣고, 잘 섞어서 40°C water bath에서 30분간 incubation 하였다. 상등액 0.1 mL 에 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 0.1 mL, GOPOD 3 mL을 넣고 40°C에서 20분간 incubation 한 후, 510 nm 흡광도에서 측정하여 α -glucan 함량의 계산에 사용하였다. 측정된 total glucan과 α -glucan의 흡광도는 표

준물질인 glucose 용액(1 mg/mL)을 GOPOD 시약과 반응시킨 반응액의 흡광도를 이용하여 각각 함량(g/100g) 값으로 계산하였다. β -Glucan 함량은 total glucan 함량에서 α -glucan 함량을 빼준 값으로 계산하였다.

실험동물

수컷 Sprague-Dawley (SD) (Samtako, Osan, Republic of Korea, 4주령, 290-300 g) rat을 멸균된 cage에서 1주일간 적응시켰다. 동물은 습도 60±5%, 온도 20±5°C, 12 시간 낮밤 주기를 유지하였으며 사료는 고휘사료를 공급하였고 음용수는 제한 없이 공급하였다.

일차 간세포 배양(Primary hepatocyte culture)

일차 간세포 배양은 Chang 등(2014)의 방법을 참고하여 수행하였다. 적응 기간 이후, 수컷 SD rat을 안락사 후에 간 조직을 즉시 적출하여 다음과 같은 방법으로 균질화 시켰다. SD rat의 간 조직은 8°C에서 10분 동안 hepatocyte buffer (136.9 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.81 mM MgSO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.33 mM Na₂HPO₄, 5.0 mM NaHCO₃, pH 7.6)에서 처리하여 혈액 등의 불순물을 제거하였다. 그 후에 collagenase가 담긴 Ca²⁺-free Ringer hepatocyte buffer (0.3 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO)를 사용해 균질화 하였으며, 부드러운 조직들은 나일론 필터(70 μm)를 사용해서 간세포만을 분리했다. 분리한 간세포는 1.5 mM CaCl₂를 포함한 버퍼를 사용해서 호소활성을 억제했다. 세포 현탁액은 1000 g에서 두 번 원심분리 후 각 60 mm Dish 당 1×10^7 cell/mL 농도로 Leibovitz-15 배지에서(L-15, Sigma, St. Louis, MO) 24시간 동안 25°C의 온도에서 48시간 배양하였다. 48시간 배양 후 세포 상태 측정을 위해 trypsin-EDTA (Life technologies, Inc.)를 이용하여 세포를 떼어낸 다음 세포 부유액을 trypan blue 염색액과 동량 첨가하여 희석해 hemocytometer를 이용하여 세포 수를 측정하였다. 모든 배양은 세 번 이상 반복하여 평균값과 표준편차를 나타내었다.

일차 간세포에서 시료의 세포독성 확인

일차 간세포 96 well plate에 1×10^5 cell/mL의 농도로 배양하여 실험에 사용하였다. 즉, 대조구를 제외하고 10 mM 아세트아미노펜과 시료를 각각 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 24시간 처리한 후, 배지를 제거하고 새로운 배지에 10 uL MTS를 첨가하여 4시간동안 반응시킨 후 540 nm로 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 세포 생존율은 시료 무처리군을 100%로 하여 상대적으로 계산하였다.

생화학적 분석

일차 간세포를 24 well plate에 2×10^5 cell/well 농도로 분주하고 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후, 대조구를 제외하고 10 mM 아세트아미노펜과 각 시료를

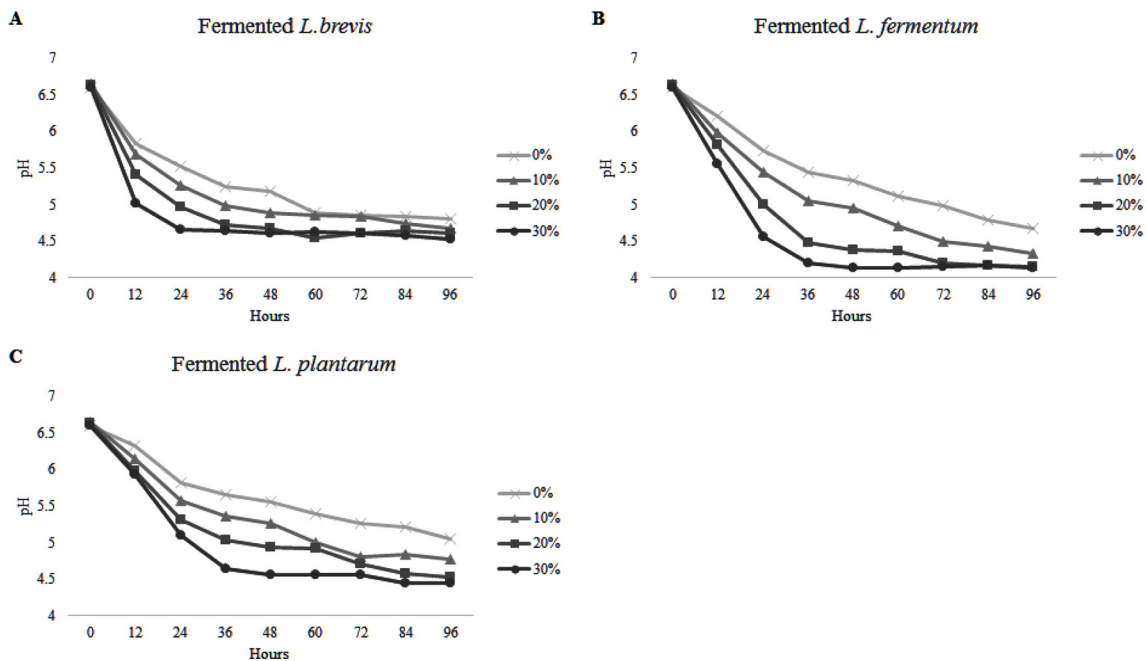


Fig. 1. Change of pH of fermented *Lentinula edodes* extract by lactic acid bacteria. (A) Fermented by *Lactobacillus brevis* with *Lentinula edodes* extract, (B) Fermented by *Lactobacillus fermentum* with *Lentinula edodes* extract, (C) Fermented by *Lactobacillus plantarum* with *Lentinula edodes*.

100 µg/mL 처리하고 48시간 동안 추가 배양하였다. 배양 후 well의 상등액을 회수하고 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) 그리고 lactate dehydrogenase (LDH) 활성도는 각 기질과 효소반응을 이용한 비색법(Kim and Han, 2005; Vinson *et al.*, 2001)에 의해 제조된 assay kit (Asan Pharmaceutical, Korea)로 측정하였다.

통계분석

모든 실험은 3회 반복하였으며, 실험결과를 SPSS 통계 프로그램(ver. 12.0, SPSS Inc., USA) 을 이용하여 평균값과 표준편차로 나타내었다. 생리활성 실험은 Duncan's multiple test를 통해 그 유의성(p<0.05)을 확인하였다.

결과 및 고찰

표고추출농축액의 유산균 발효에 의한 특성 변화

표고 유산균 발효 최적 조건 탐색을 위하여, 발효기간별 pH 및 산도를 측정하였다(Fig. 1, 2). 표고추출농축액 첨가 농도와 상관없이 사용한 3종의 유산균들 모두 12 시간 부터 대수증식기가 시작되어 60시간 후에 종료되었다. 발효시간이 경과할수록 대조구(표고추출농축액 0 %)에 비하여 표고추출농축액 첨가구에서 pH는 감소, 산도는 증가함을 확인하였고, 표고추출농축액 첨가량이 많을수록 변화 폭이 더 큰 것으로 나타났다. 세 균주에서 *L. plantarum*에서 가장 높은 산도를 나타내었으며, *L. brevis*와 *L. fermentum*간

Table 2. The content of ergothioneine from fermented *Lentinula edodes* extract by lactic acid bacteria

Samples		
Strains	Concentration of <i>L. edodes</i> extract	Contents (mg/100 g)
<i>L. brevis</i>	0%	0.27±0.02 ¹⁾²⁾
	10%	12.78±1.48 ^e
	20%	32.82±1.04 ^c
	30%	37.23±1.52 ^b
<i>L. fermentum</i>	0%	0.21±0.02 ^f
	10%	14.35±0.18 ^c
	20%	29.09±0.27 ^d
	30%	34.48±0.24 ^c
<i>L. plantarum</i>	0%	0.18±0.07 ^f
	10%	12.12±0.13 ^e
	20%	33.09±0.27 ^c
	30%	40.48±0.24 ^a

¹⁾Each value represents the mean±SD of three determinations.
²⁾Mean with different superscripts (a, b, c, d, e, f) are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

에는 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 표고추출농축액 유산균 발효물 제조시 표고추출농축액 첨가는 유산균의 성장 및 유산의 생성 등을 증진시켜 발효시간을 단축시키고, 유용한 대사산물의 생성에도 유리하게 작용할 것으로 기

Table 3. The content of β -glucan from fermented *Lentinula edodes* extract by lactic acid bacterials

Samples		
Strains	Concentration of <i>L. edodes</i> extract	Contents (%)
<i>L. brevis</i>	0%	-
	10%	5.81±0.54 ^{1(c2)}
	20%	10.54±1.19 ^b
	30%	13.94±0.15 ^a
<i>L. fermentum</i>	0%	-
	10%	4.49±0.50 ^{cd}
	20%	9.49±0.93 ^b
	30%	12.91±0.31 ^a
<i>L. plantarum</i>	0%	-
	10%	5.37±0.66 ^c
	20%	10.80±0.97 ^b
	30%	13.25±0.27 ^a

¹Each value represents the mean±SD of three determinations.
²Mean with different superscripts (a, b, c, d) are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

대된다.

표고 유산균 발효물의 유용성분 함량

원유에 표고추출농축액 첨가농도에 따른 유산균발효물의 유용성분의 함량은 Table 2, 3과 같다. 버섯 특유의 고

분자 다당체인 ergothioneine과 β -glucan은 아미노산 및 다당류로 면역력과 항산화에 관여하는 것으로 알려져 있으며(Lee *et al.*, 2006; An *et al.*, 2019), 인간이나 동물 및 고등식물에서는 생합성 되지 못하여 외부로부터 흡수 공급되어야 한다(Halliwell *et al.*, 2018; Cheah and Halliwell, 2012). Ergothioneine의 경우 모든 유산균 발효물에서 표고추출농축액의 함량이 증가할수록 유의적으로 증가함을 확인하였고, 원유에 표고추출농축액 30% 혼합하여 *L. plantarum*을 배양한 발효물에서 40.48 mg/100 g로 가장 높은 함량을 나타냈다. Ergothioneine은 in-vivo 실험에서 유의적으로 간의 산화적 손상을 억제한다고 보고된 바 있어, 표고 유산균 발효물의 간보호 효과에 중요한 물질로 생각된다(Deiana *et al.*, 2004). 또한 β -glucan의 함량도 마찬가지로 모든 유산균 발효물에서 표고추출농축액의 농도가 증가할수록 함량이 증가함을 확인 할 수 있었고, 원유에 표고추출농축액 30%를 혼합하여 *L. brevis*로 발효물에서 13.94%로 가장 높은 β -glucan함량을 보였다. 본 연구결과 표고추출물 첨가량이 높아짐과 비례하여 표고의 유용성분인 ergothioneine과 β -glucan 함량이 높아짐을 확인하였다. 기존 연구에서 β -glucan은 간의 산화를 억제 하며, 간보호효과가 있다고 보고된 바 있다(Erko *et al.*, 2011). 따라서 간의 산화적 손상 및 간보호 효과가 있는 ergothioneine과 β -glucan 함량이 높게 나타난, 표고추출농축액을 30% 첨가한 유산균 발효물을 이용하여 실험을 진행하였다.

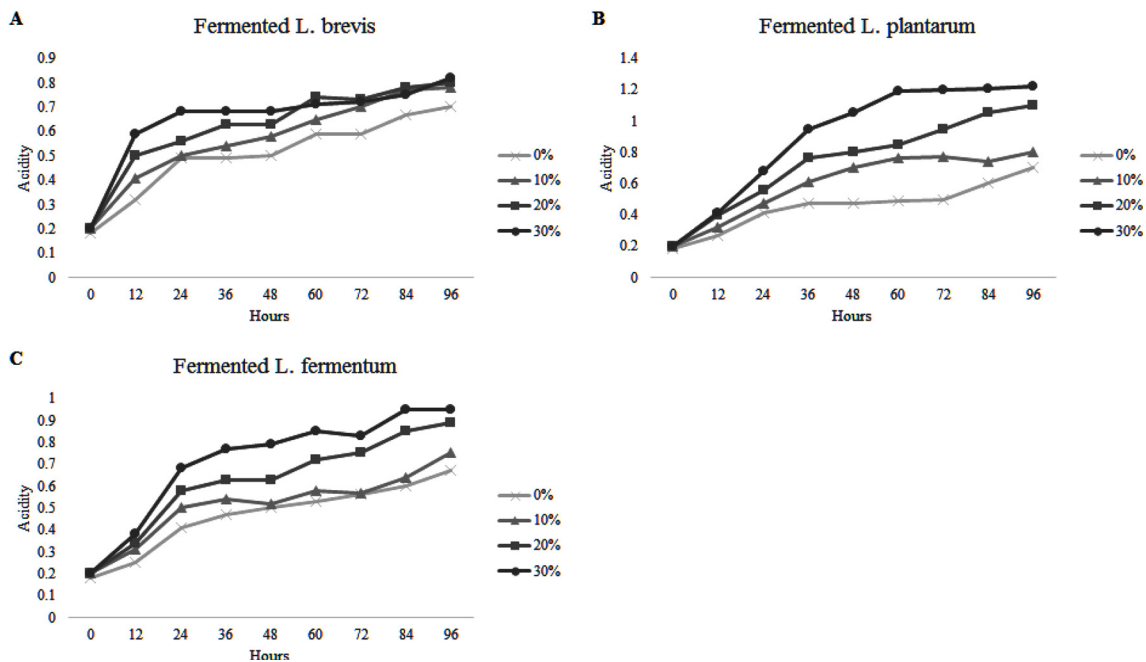


Fig. 2. Change of titratable acidity of fermented *Lentinula edodes* extract by lactic acid bacterials. (A) Fermented by *Lactobacillus brevis* with *Lentinula edodes* extract, (B) Fermented by *Lactobacillus fermentum* with *Lentinula edodes* extract, (C) Fermented by *Lactobacillus plantarum* with *Lentinula edodes*.

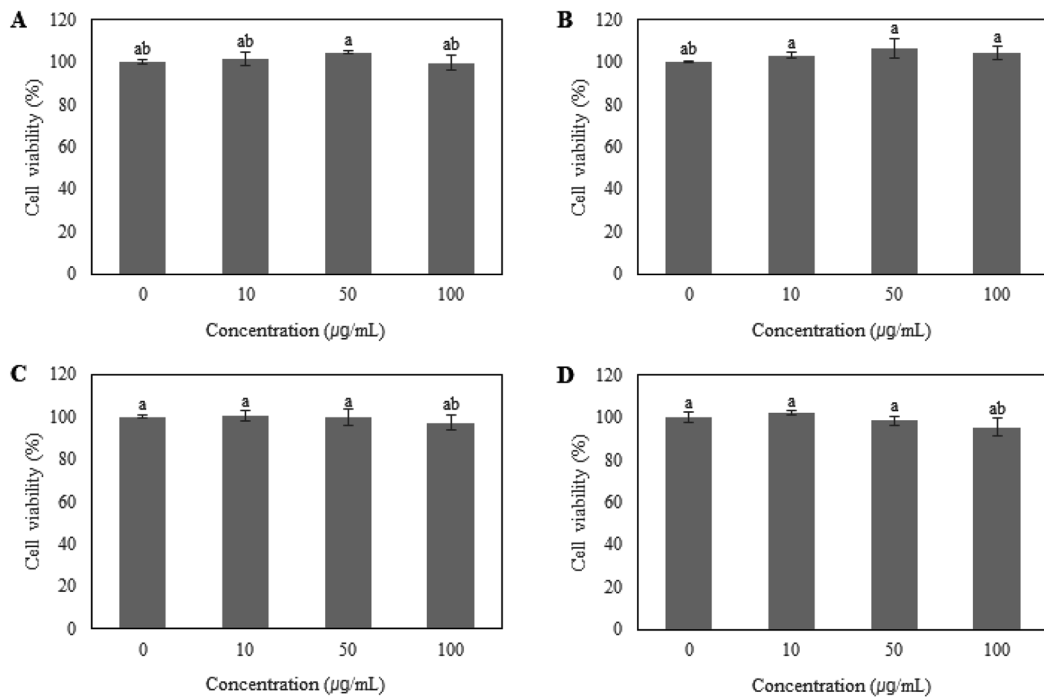


Fig. 3. Percentage of primary hepatocyte cell viability at various concentration of fermented *Lentinula edodes* extract by lactic acid bacteria. (A) *Lentinula edodes* extract, (B) Fermented *Lactobacillus brevis* with *Lentinula edodes* extract, (C) *Lactobacillus fermentum* with *Lentinula edodes* extract, (D) *Lactobacillus plantarum* with *Lentinula edodes* extract. Mean with different superscripts (a,b) are significantly different at $p < 0.05$ in same concentrations by Duncan's multiple range test.

표고 유산균 발효물의 일차 간세포에서의 독성

세포독성은 세포독성을 갖는 물질을 세포에 처리 시 세포의 사멸을 유도하기 때문에 각종 기능성 소재의 사용 가능 여부를 판단하는 기초자료로서 활용된다. 버섯에 함유된 간보호효과가 있는 것으로 알려진 ergothioneine과 β-glucan 함량이 높게 나타난 표고추출농축액을 30% 첨가한 유산균 발효물을 시료로 하여, 세포독성과 간세포 보호효과를 측정하였다. 표고추출농축액과 표고 유산균 발효물의 세포 독성을 MTT 방법을 이용하여 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 표고추출농축액과 3종의 유산균 발효물을 각각 10, 50 및 100 µg/mL 농도로 처리하였을 때, 일차 간세포에서 모든 농도는 90% 이상으로 세포생존율에 큰 영향을 주지 않았다. 상황 에탄올 추출물의 세포생존율에 대한 연구에서 80% 이상의 세포생존율은 세포독성이 없다는 보고(Seo et al., 2017)를 바탕으로 본 연구에 사용한 유산균 발효물들은 모두 세포독성이 없음을 확인하였다.

표고 유산균 발효물의 간세포 보호 효과

일차 간세포에 아세트아미노펜을 처리하여 간독성을 유발하여 표고 유산균 발효물의 간세포 보호효과를 확인하였다(Fig. 3). 일반적으로 간과 심장에 고농도로 존재하며

간염, 간 경변 등의 지표로 널리 사용되는 AST와 ALT의 활성을 측정한 결과, 아세트아미노펜 단독 처리구에 비해 표고추출농축액 및 유산균 발효물이 AST, ALT 활성을 감소시킴을 확인하였다. 이 중 표고추출농축액에 *L. brevis*를 첨가하여 배양한 발효물에서 가장 큰 효능을 보였다. 또한 심장질환, 간질환, 악성종양 및 백혈병, 용혈성 및 악성 빈혈 등에서 증가하며, 급성 간염에서 간세포로부터 유리되어 증가하고 황달을 동반한 독성간염에서 약 10배 정도 증가하는 것으로 알려진 LDH 활성을(Lee et al., 2020) 측정한 결과 아세트아미노펜을 처리하였을 때 정상군(3.8 ng/mL)과 비교하여 2.2배 증가되어, 간세포에 염증이 발생함을 확인 할 수 있었다. 세 가지 유산균으로 발효한 표고추출농축액을 처리하였을 때 LDH의 활성을 낮추어 염증반응을 감소시켜 간기능 개선효능이 탁월한 것으로 생각된다. AST와 ALT와 마찬가지로 *L. brevis*를 첨가한 발효물에서 LDH의 활성이 가장 크게 감소하였다. 본 연구 결과 기존 간보호 효과가 있다고 알려진 표고추출농축액에서 AST, ALT, LDH 효소의 활성을 저해하였으며, 표고 추출농축액에 각 3종의 유산균을 첨가하여 발효한 발효물들이 기존 표고추출농축액보다 더욱 큰 저해활성을 보였다. 이 중 *L. brevis*로 발효한 표고추출농축액 발효물에서 간보호 효과가 가장 높게 나타남을 확인하여, 표고유산균 발효

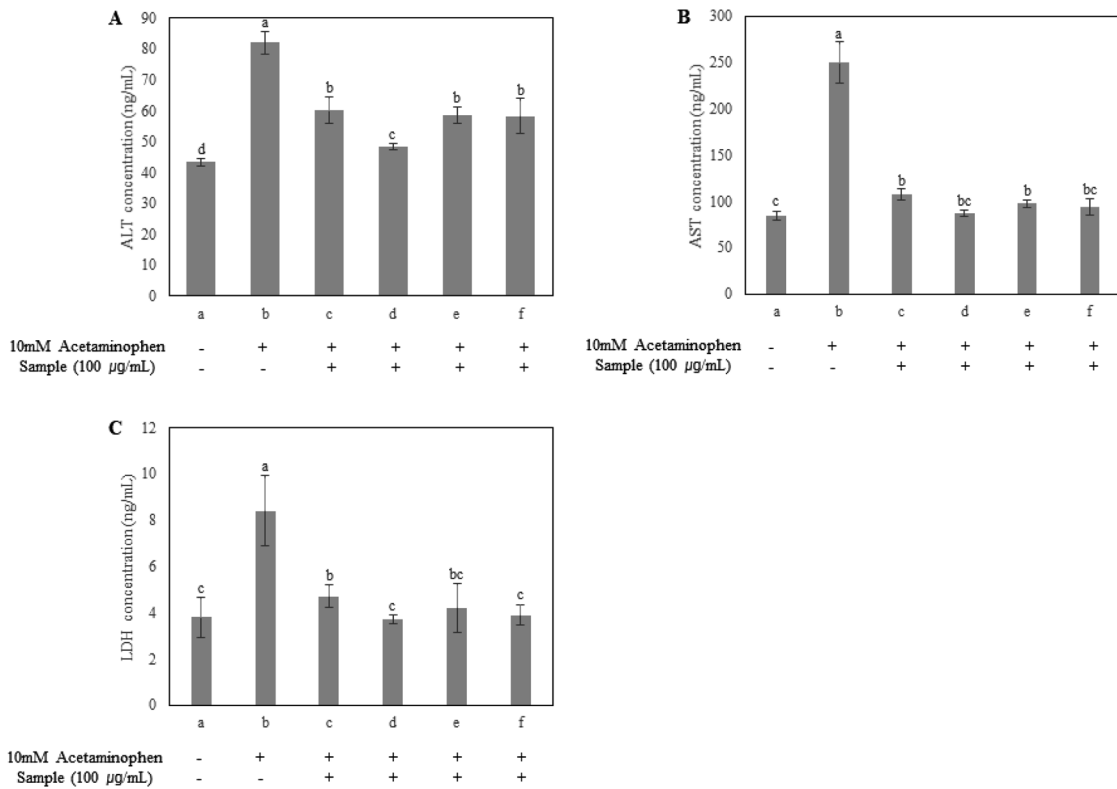


Fig. 4. Effect of fermented *Lentinula edodes* extract by lactic acid bacteria on primary hepatocyte in the acetaminophen induced liver cells. (A) Alanine aminotransferase (ALT), (B) Aspartate transaminase (AST), (C) lactate dehydrogenase (LDH) level in primary hepatocyte

- a : Control,
- b : Acetaminophen treatment,
- c : Acetaminophen + *Lentinula edodes* extract treatment,
- d : Acetaminophen + fermented *Lactobacillus brevis* with *Lentinula edodes* extract treatment,
- e : Acetaminophen + fermented *Lactobacillus fermentum* with *Lentinula edodes* extract treatment,
- f : Acetaminophen + fermented *Lactobacillus plantarum* with *Lentinula edodes* extract treatment.

Mean with different superscripts (a,b,c,d) are significantly different at $p < 0.05$ in same concentrations by Duncan's multiple range test.

물 제조 최적 유산균은 *L. brevis*로 결정하였다.

적 요

본 연구에서는 기존에 인체에 유익한 효과가 있고 부작용 없이 장기간 안전하게 사용할 수 있으며 간보호 및 간기능 개선에 탁월한 효과가 있는 표고를 추출 및 농축하여 원유에 농도별로 첨가하여, 3종의 유산균을 이용하여 발효하였다. 표고의 농도를 달리하여 유산균을 배양하였을 때 면역관련 물질인 ergothioneine 및 β -glucan의 함량을 측정된 결과 ergothioneine 함량은 30% 표고추출농축액에 *L. plantarum*이 첨가되어 배양된 발효물이 40.48 mg/100 g로 가장 높은 함량을 나타냈다. β -Glucan은 30% 표고추출농축액에 *L. brevis*가 첨가된 발효물이 13.94%로 가장 높은 함량이 나타났다. 두 면역관련 물질 모두 표고추출농축액 첨가량이 증가할수록 증가하는 경향을 나

타냈다.

SD rat을 간을 적출하여 일차 간세포로 분리해 발효물의 간보호 효과를 측정하였다. 표고추출농축액과 유산균 발효물을 10, 50, 100, 500 μ g/mL을 일차 간세포에 처리하여 MTT assay 방법으로 세포독성을 측정된 결과, 모든 농도에서 독성을 보이지 않았다. 또한 10 mM 아세트아미노펜을 처리하여 독성을 유발한 일차 간세포에 시료를 처리하여 AST, ALT, LDH를 측정된 결과, 효소의 농도가 감소하여 간보호 기능에 효과가 있음을 확인하였다. 이중 *L. brevis*를 첨가하여 배양한 발효물 처리구에서 효소의 농도가 가장 감소한 것을 보았고, 가장 간보호 효과가 뛰어난 것을 확인하였다. 이상의 결과를 토대로 표고추출농축액에 유산균을 첨가하여 발효하였을 때, 기존의 표고보다 면역관련 물질의 함량이 증가하고, 간기능 보호에 더욱 효과가 있음을 입증하였다. 따라서 본 연구결과는 표고 유산균 발효물이 건강기능 소재로서 연구를 위한 기초

연구자료로 활용될 수 있 것으로 생각된다.

감사의 글

본연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성+(R&D-지역주력산업육성, S2915903)” 사업의 지원을 받아 수행된 연구결과임.

REFERENCES

- Akamatsu S, Watanabe A, Tamesada M, Nakamura R, Hayashi S, Kodama D, Kawase M, Yagi K. 2004. Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 27: 1957-1960.
- An GH, Han JG, Lee KH, Cho JH. 2019. Comparison of the physiological activities of Korean and Chinese *Auricularia auricula* and *Tremella fuciformis* extracts prepared with various solvents. *J Mushrooms* 17: 78-84.
- Chang HG, Park YS. 2003. Lactic acid fermentation and biological activities of *Rubus coreanus*. *J Appl Biol Chem* 46: 367-375.
- Chang Z, Lu M, Kim SS, Park JS. 2014. Potential role of HSP90 in mediating the interactions between estrogen receptor (ER) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Toxicol Lett* 226: 6-13.
- Cheah IK, Halliwell B. 2012. Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1822: 784-793.
- Choi YB, Woo JG, Noh WS. 1999. Hydrolysis of β -glucosidase bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soymilk. *Korean J Food Sci Technol* 31: 189-195.
- Deiana M, Rosa A, Casu V, Piga R, Assunta Dessì MA, Aruoma OI. 2004. L-ergothioneine modulates oxidative damage in the kidney and liver of rats in vivo: studies upon the profile of polyunsaturated fatty acids. *Clin Nutr* 23: 183-193.
- Erkol H, Kahramansoy N, Kordon O, Büyükaşık O, Serin E, Ulaş N. 2011. Effects of beta-glucan on hepatic damage caused by obstructive jaundice. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 17: 303-307.
- Halliwell B, Cheah IK, Tang RMY. 2018. Ergothioneine – a diet-derived antioxidant with therapeutic potential. *FEBS Lett* 592: 3357-3366.
- Hazama S, Watanabe S, Ohashi M, Yagi M, Suzuki M, Matsuda K, Yamamoto T, Suga Y, Suga T, Nakazawa S, Oka M. 2009. Efficacy of orally administered superfine dispersed lentinan (β -1,3-glucan) for the treatment of advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 29: 2611-2617.
- Hobbs C. 2000. Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk) sing (Agaricomycetidae). A literature review. *Int J Med Mushrooms* 2: 287-302.
- Hong JS, Lee KR, Kim YH, Kim DH, Kim MK, Kim YS, Yeo KY. 1988. Volatile flavor compounds of Korean shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Korean J Food Sci Technol* 20: 606-615.
- Jeon JM, Choi SK, Kim YJ, Jang SJ, Cheon JW, Lee HS. 2011. Antioxidant and antiaging effect of ginseng berry extract fermented by lactic acid bacteria. *J Soc Cosmet Sci Kor* 37: 75-81.
- Jeon KS, Ji GE, Hwang IK. 2002. Assay of β -glucosidase activity of bifidobacteria and hydrolysis of isoflavone glycosides by *Bifidobacterium* sp. Int-57 in soymilk fermentation. *J Microbiol Biotechnol* 12: 8-13.
- Jiang T, Feng L, Zheng X, Li J. 2013. Physicochemical responses and microbial characteristics of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) to gum arabic coating enriched with natamycin during storage. *Food Chem* 138: 1992-1997.
- Seo KS, Jin SW, Koh YW, Yun KW, Kim KJ, Je HS, Im SB, Kim KS, Kim MS, Yu BJ. 2017. Hair growth effect of ethanol extract from *Calendula officinalis* L. flower, *Phellinus linteus* fruit body and *Houttuynia cordata* Thunb. whole plant. *Korean J Crop Sci* 25: 1-7.
- Jun HS, Choi YK, Won YS, Hun BH, Kim JW. 1999. Effects of lactic acid bacteria on infection of *Salmonella typhimurium* of mouse. *Kor J Dairy Sci* 21: 171-182.
- Kim HK. 2019. The effects of protecting the liver and improving liver function on cabbage extract. *J convergence cult technol* 5: 389-395.
- Kim HS, Gilliland SE. 1983. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. *J Dairy Sci* 66: 959-966.
- Kim JH. 2012. Biological activities of water extract and solvent fractions of an edible mushroom, *Hericium erinaceus*. *Kor J Mycol* 40: 159-163.
- Kim MY, Chung IM, Lee SJ, Ahn JK, Kim EH, Kim MJ, Kim SL, Moon HI, Ro HM, Kang EY, Seo SH, Song HK. 2002. Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. *Food Chem* 113: 386-393.
- Kim SJ, Han DS. 2005. Effect of plants extract on lipid peroxidation of rat brain tissue induced by reactive oxygen species. *Kor J Food Sci Technol* 17: 393-401.
- Korea Food and Drug Administration. official Book of Food. 1999. pp. 169. Munyoungsa, Seoul.
- Lee SY, Han JH, Choi DH, Hong M, Kwon TH, Lee YJ, Yu KH. 2020. Hepatoprotective effect of *Ainsliaea acerifolia* water extract on LPS/D-GalN-induced acute liver injury in human HepG2 cells. *Korean J Food Sci Technol* 52: 476-481.
- Lee YS, Joo EY, Kim NW. 2006. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Lepista nuda*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1309-1314.
- Mau JL, Lin HC, Song SF. 2002. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res* 35: 519-526.
- Mizuno, T. 1995. Mushrooms: the versatile fungus-food and medicinal properties. *Food Rev Int* 11: 1-23.
- Morinaga H, Tazawa K, Tagoh H, Muraguchi A, Fujimaki M. 1994. An in vivo study of hepatic and splenic interleukin-1 beta mRNA expression following oral PSK or LEM administration. *Jpn J Cancer Res* 85: 1298-1303.
- Ross GD, Vetvicka V, Yan J, Xia Y, Vetvicková J. 1999. Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacology* 42: 61-74.
- Shida K, Makino K, Morishita A, Takamizawa K, Hachimura S, Ametani A, Sato T, Kumagai Y, Habu S, Kaminogawa S. 1998. *Lactobacillus casei* inhibits antigen induced IgE secretion through the regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch Allergy Immunol* 115: 278-287.
- Terada H, Ohara T, Yamaguchi Y, Ueda T, Asano K. 2001. Protective effects of the *Lentinus edodes* mycelia on carbon

- tetrachloride induced liver injury. *J New Rem Clin* 50: 655-664.
- Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem* 49: 5315-5321.
- Yamamoto Y, Shirono H, Kono K, Ohashi Y. 1997. Immunopotentiating activity of the water-soluble lignin rich fraction prepared from LEM: the extract of the solid culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Biosci Bio Tech Biochem* 61: 1909-1912.
- Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, Wang Q. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics, and antitumor activity. *Trends Food Sci Technol* 18: 4-19.
- Zhou LD, Zhang QH, Zhang Y, Liu J, Cao YM. 2009. The shiitake mushroom-derived immunostimulant lentinan protects against murine malaria blood- stage infection by evoking adaptive immune-responses. *Int Immunopharmacol* 9: 455-462.