

시장성이 없는 갈변 표고버섯 (*Lentinus edodes*) 추출물의 생리활성 검정

강미영¹ · 김설이 · 윤혜정¹ · 남석현*

¹경북대학교 식품영양학과, 아주대학교 생명과학과

(2004년 9월 15일 접수; 2004년 11월 2일 수리)

갈변표고버섯을 건강기능성 식품산업의 소재로 활용할 수 있는 가능성을 탐색하기 위하여 환원력과 세포 내 활성산소종에 대한 억제효과, 페놀화합물 및 피틴산의 함량, 대식세포의 NO 라디칼과 matrix metalloproteinase 9(MMP9) 생성에 대한 제어작용 및 항변이원성을 생리활성의 지표로 갈변반응이 건강기능성에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, 에탄올추출물의 환원력이 열수추출물보다 전반적으로 우수하였으며 3.32 mg/ml의 농도에서 갈변반응은 표고버섯의 환원력이 28%까지 증가시켰다. 갈변과정에서 페놀화합물의 함량은 생표고버섯에 비하여 73%정도 증가된 반면, 피틴산의 함량에 유의한 변화는 일어나지 않았다. 표고버섯 에탄올추출물의 처리는 100 µg/ml의 시료농도에서 LPS 자극에 의한 대식세포의 NO 생성을 43% 이상 증진시킨 반면 열수추출물은 오히려 17%이상 억제시키는 것으로 나타났으나, 갈변반응이 용매별 추출분획의 NO 및 MMP9의 생성을 제어하는 경향에 변화를 일으키지 않았다. 또한 SOS chromotest를 이용한 항돌연변이 활성의 측정 결과도 mitomycin C가 유발한 돌연변이에 대한 표고버섯 추출물의 억제효과에 갈변반응이 큰 영향을 주지 않았다. 이상의 실험 결과는 상품성을 상실한 갈변표고버섯도 다양한 건강기능성 가공식품의 개발을 위한 원자재로 소비될 수 있음을 시사한다.

Key words: 표고버섯, 갈변반응, 항산화활성, 대식세포 활성화, 항변이원성

서 론

표고버섯(*Lentinus edodes*)은 필수아미노산의 함량이 여타의 육류나 채소보다 높고,¹⁾ 저열량 고단백식품으로 필수 영양소를 비롯하여 칼슘, 인, 철, 등의 무기질과 비타민 B₁, B₂, B₁₂ 및 D 등의 영양성분이 상당량 함유되어 있다.²⁾ 또한 건강기능성 측면에서도 항암, 혈압 강하작용, 감염 및 동맥경화예방, 폐질환 및 위장질환예방, 바이러스에 대한 면역증강, 항체생성 촉진, 당뇨억제 효과, 자율신경 안정, 혈중 지질 농도 조절기능뿐 아니라,^{3,4)} 비만, 고혈당, 간 경화의 예방 효과 등⁵⁾이 알려져 있다. 경제적 측면에서도 전통적으로 기호성이 높고 소비시장 규모가 큰 고소득 작목이지만, 재배과정에서의 관리 부주의나 채취 후의 저장상태 및 기상악화로 인한 갈변화가 상품가치를 폭락시킨다는 점에서 관리 및 유통상의 어려움이 있다. 본 연구자들은 갈변표고버섯 열수추출물과 70% 에탄올추출물의 superoxide anion과 hydroxyl radical에 대한 소거활성을 조사하여 갈변표고버섯이 신선표고버섯보다 활성산소종 소거능이 우수하다는 결과를 얻은 바 있다.⁶⁾ 따라서 갈변화에 의한 상품성의 상실이 전반적인 건강기능성의 상실과 직접적으로 연결되는지 여부를 보다 상세히 검정함으로써, 상품성의 상실로 폐기되어 왔던 갈변표고버섯의 가공을 통하여 건강기능 식품의 소재로 전용하는 방법을 농가 소득의 안정적 확보 차원에서 탐색할 필요가 있다. 이에 본 연구에서는 갈변표고버섯 열수추출물 및 에탄올추출물

들의 환원력을 측정하여 항산화활성을 평가하고 함유된 페놀화합물 및 피틴산의 함량을 측정하였으며, 대식세포의 NO 라디칼 및 MMP9 생성에 대한 제어효과와 더불어 화학적 돌연변이원에 대한 항변이원성을 검정하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약. 신선한 생표고버섯을 0.5 cm 두께로 잘라서 40°C에서 열풍 처리하여 건조표고버섯을 제조하였으며, 신선 생표고버섯에 적당히 물을 뿌리면서, 30°C에서 일주일간 갈변 반응을 일으켜 외견상 상품가치를 떨어뜨린 갈변표고버섯을 제조하였다. 각각의 시료에 10배량의 탈이온수를 첨가하여 4시간 autoclave로 추출한 추출액을 여과지(Whatman No. 1)로 여과 후, 감압 건조시켜 100 mg/ml의 농도로 만든 것을 열수추출물 분획으로 하였다. 동일한 시료에 5배량의 70% 에탄올로 80°C에서 3시간 reflux 처리한 다음, 같은 방법으로 건조시켜 DMSO로 100 mg/ml로 조절된 것을 에탄올 추출분획으로 하였다. 각 추출분획은 -20°C에 냉동보관하면서 사용하였다. Ascorbic acid, α-tocopherol, BHT(butylated hydroxytoluene), ONPG(o-nitrophenyl β-D-galactosidase), PNPP(p-nitrophenyl phosphate), mitomycin C, 등은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였고, ampicillin은 영진약품의 주사용 펜브라스를 멸균수로 희석하여 사용하였으며, bactotrypton, yeast extract 등과 같은 세균 배양을 위한 배지용 시약은 Difco-BRL사(Bethesda, MD, USA)의 제품을 사용하였다. SOS chromotest의 지시균주인 *Escherichia coli* PQ 37[plasmid pKM 101, *sf::Mud(AP lac)*, *lacΔU169*, *mal⁺*, *urvA*, *galE*,

*연락처

Phone: 82-31-219-2619; Fax: 82-31-219-1615

E-mail: shnam@ajou.ac.kr

galY, *Pho^c*, *rfaF*, *thr*, *leu*, *his*, *pyrD*, *thi*, *trp::Muc⁺*, *sr1300::Tn10*)은 서울대학교 천연물화학연구소에서 분양받았고 LB broth(bactotryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%, ampicillin+)에서 배양하였다. 동물세포배양에 사용된 배지, fetal bovine serum(FBS) 및 염류용액은 모두 Life Technologies (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다.

환원력 (reducing power)의 측정. Oyaizu 등의 방법¹⁰⁾에 의거하여 환원력을 측정하였다. 간단히 설명하면, 적당량의 추출물을 포함한 시료 20 μ l를 50 mM 인산 완충액(pH 6.6)과 1%의 potassium ferricyanide[K₃Fe(CN)₆]와 1.4:1로 혼합된 용액 1.2 ml에 첨가하여 50°C에서 20분간 반응시킨다. 반응 후, 0.5 ml의 10% trichloroacetic acid를 첨가한 다음, 3,000 rpm 10분간의 원심분리로 얻어진 상정액에 0.1%의 FeCl₃ 100 μ l를 넣어서 발색반응을 유도하였다. 반응 후 반응액의 발색 정도는 UV/VIS spectrophotometer(V-550, JASCO, Japan)를 사용하여 700 nm에서의 흡광도를 측정하여 평가하였다.

페놀화합물 함량의 측정. 총 폴리페놀 화합물의 함량은 Swaine과 Hills의 방법¹¹⁾을 수정하여 다음과 같이 측정하였다. 즉 0.5 ml의 시료용액(1 mg/ml)을 6.5 ml 증류수에 희석하고, 여기에 Folin-ciocalteu's phenol reagent(Sigma사)를 0.5 ml 첨가하여, 3분간 방치한 다음, 1 ml의 sodium carbonate 포화용액을 첨가하여 전체 반응용량을 10 ml로 조정하였다. 반응액을 실온에서 1시간 방치시킨 후, 반응액의 발색정도를 725 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 측정된 흡광도에 근거하여 시료 중 페놀 화합물의 양을 결정하기 위해서 gallic acid(Sigma사)를 표준물질로 표준곡선을 작성하였다.

피틴산 (phytic acid) 함량의 측정. 추출물에 함유된 phytic acid의 양은 Haug¹²⁾의 방법을 약간 수정하여 다음과 같이 측정하였다. 시료에 50 ml의 용액(1.2% HCl, 10% Na₂SO₄) 용액을 첨가하여 2시간 동안 교반하였다. 여과처리로 고형물질을 제거한 용액 중 10 ml를 취하고 여기에 12 ml의 FeCl₃ 용액을 첨가하여 75분간 증탕 가열하였다. 가열 후 실온에서 1시간 동안 식힌 후 3,500 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻어진 상정액에 탈이온수를 사용하여 용량을 50 ml로 조절하였다. 여기에서 4 ml를 취한 다음, wade reagent 1 ml 첨가하여 10분간 반응시킨 뒤 UV/VIS spectrophotometer(V-550, JASCO, Japan)를 사용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. Phytic acid를 정량하기 위한 표준곡선은 Na-phytic acid를 표준물질로 사용하여 작성하였다.

Nitric oxide (NO) 소거활성 측정. NO 소거활성은 *in vitro*와 배양세포계를 이용한 실험계에서 모두 측정하였다. 우선 *in vitro*의 실험계에서 NO의 소거활성은 Kato¹³⁾ 등의 방법에 기초하여 다음과 같이 측정하였다. 1 mM NaNO₂ 용액 1 ml에 적당량의 시료를 첨가하고, 0.1 N HCl(pH 1.2)과 0.1 M 구연산 완충용액을 사용하여 반응용액의 pH를 1.2로 조정하였다. 반응액의 용량을 10 ml로 조정한 다음, 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 반응액 중 1 ml씩 취하여 여기에 초산용액 5 ml를 첨가하였고 다시 여기에 0.5 ml의 Griess solution을 넣고 혼합시켜 실온에서 15분간 방치하였다. 실온에서 반응이 끝나면 UV/VIS spectrophotometer(V-550, JASCO, Japan)를 사용하여 520 nm에

서 흡광도를 측정하여 잔존 아질산염을 백분율(%)로 나타내었다. 동물 배양세포계에서의 소거활성은 Murakami 등의 방법¹⁴⁾에 의하여 측정하였다. 지시세포로서는 생쥐의 대식세포 세포주인 RAW 264.7세포를 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 구입하여, 공급자의 지시대로 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640 media에서 계대 배양하였다. NO 소거활성을 측정하기 위하여 지시세포를 96-well에 1×10⁵ cells/ml로 분주하고 100 ng/ml의 LPS(lipopolysaccharide)로 세포를 자극하면서 동시에 적당량의 시료를 반응계에 첨가하여 37°C, 48시간 동안 5% CO₂의 공기조건에서 배양하였다. 배양 후, 상정액 100 μ l를 회수하고 여기에 동량의 Griess solution을 첨가하여 15분간 방치한 다음 상정액의 발색도를 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, USA)를 사용하여 570 nm 및 650 nm의 흡광도로 측정하였다.

MITT assay에 의한 세포독성 측정. Mitochondrial dehydrogenase activity의 index를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 측정하였다.¹⁵⁾ RAW264.7세포를 microplate에 NO 측정과 같은 조건으로 분주하여 24시간 배양한 후, 추출물 시료를 농도별로 처리하였다. 배양이 끝나면 배양액에 2 mg/ml의 MTT용액(Sigma Chemicals)을 50 μ l 첨가하고, 37°C에서 3시간 처리였다. 배지를 제거하고 150 μ l의 DMSO로 10분간 진탕시켜 세포 내에 들어간 색소를 충분히 용출시킨 다음, microplate reader(Model 550, Bio-Rad, USA)를 사용하여 570 nm와 690 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

Zymography. zymogram을 이용한 시료의 MMP활성은 Birkedal-Hansen과 Tylor의 방법¹⁶⁾에 따라 시행하였다. 96-well plate에 1×10⁵ cell씩 분주한 RAW264.7 세포를 적당량의 시료를 처리한 후, 48시간 동안 37°C의 5% CO₂를 포함한 포화습도 공기에서 배양하였다. 회수한 상정액 중 100 μ l를 취하고 여기에 동량의 비환원조건의 sample buffer(50 mM Tris-Cl, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, pH 6.8)를 첨가하여 단백질 시료를 제조하였다. 시료를 1% gelatin이 포함된 10% acrylamide gel에서 전기영동으로 분획한 다음, renaturation buffer(2.5% Triton X-100)로 gel을 15분씩 3회 37°C에서 완충시키고 다시 zymogram buffer(50 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 50 mM NaCl, pH 7.6)로 30분간 gel를 세척하고 나서 20시간 이상 zymogram buffer에 보존하였다. 반응이 끝난 gel을 2.5% coomassie solution에서 염색한 후, destaining buffer(45% methanol, 10% acetic acid)로 탈색시켜 단백질 band를 확인하였고, band의 강도는 gel documentation system(LAS-1000CH, Fuji Film, Japan)을 사용하여 측정하였다.

항변이원성 측정. 항변이원성은 *E. coli* PQ 37을 지시균주로 사용한 SOS chromotest 기법을 이용하여 조사하였다.^{17,18)} 37°C에서 LB배지에 하룻밤 진탕배양한 배양액을 동일한 액체배지로 10배수 희석하여, 37°C서 2시간 진탕배양하였다. 배양 후 액체 배지로 다시 4배수 희석한 배양액 0.4 ml를 취한 다음, 80 μ g 및 160 μ g의 시료와 mitomycin C(6 ng/ml)를 첨가한 다음, 최종 반응용량을 액체배지로 4 ml가 되도록 조정하여 다시 2시간 진탕 배양하였다. 배양이 끝난 배양액 0.2 ml에 1.8 ml의

Table 1. The reducing power of the oak mushroom extracts

Experiment	Absorbance at 700 nm					
	0.083 mg/ml	0.166 mg/ml	0.83 mg/ml	1.66 mg/ml	3.32 mg/ml	
BHT	0.874±0.020 ^a	1.131±0.016 ^a	1.238±0.054 ^a	1.169±0.011 ^a	1.088±0.023 ^c	
Aqueous extracts	Raw	0.039±0.001 ^c	0.055±0.003 ^d	0.281±0.007 ^e	0.521±0.041 ^d	0.990±0.049 ^d
	Dried	0.038±0.001 ^c	0.051±0.000 ^e	0.308±0.006 ^e	0.639±0.017 ^e	1.163±0.031 ^b
	Browned	0.044±0.001 ^b	0.058±0.000 ^b	0.357±0.009 ^b	0.676±0.011 ^b	1.271±0.006 ^a
Ethanol extracts	Raw	0.051±0.001 ^d	0.062±0.002 ^e	0.241±0.003 ^d	0.426±0.014 ^e	0.768±0.038 ^e
	Dried	0.037±0.001 ^d	0.06±0.001 ^e	0.239±0.001 ^d	0.393±0.008 ^e	0.783±0.037 ^e
	Browned	0.045±0.001 ^{cd}	0.066±0.001 ^d	0.270±0.001 ^{cd}	0.498±0.013 ^d	0.973±0.025 ^d

Values not sharing common superscript letter in column were significantly different at $p < 0.05$. Results are expressed as mean \pm SD ($n=3$).

B buffer(60 mM Na_2HPO_4 , 10 mM KCl, 40 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 50 mM β -mercaptoethanol, pH 7.0)를 첨가하고, 여기에 1.6 mg의 ONPG를 첨가하여, 37°C에서 30분간 반응시켰고, Na_2CO_3 의 첨가로 반응을 정지시킨 후, UV/VIS spectrophotometer(V-550, JASCO, Japan)로 420 nm의 흡광도로 변이원성의 발현도인 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. 지시세포수를 측정하기 위하여 *E. coli*의 house keeping 단백질 중 하나인 alkaline phosphatase의 활성을 측정하였고, alkaline phosphatase의 활성에 대한 β -galactosidase 활성의 비율로 유도 값(R)을 평가하였다.

결과 및 고찰

갈변반응에 의한 환원력 변화. Ferricyanide(Fe^{+3})가 시료에 의한 환원으로 생성된 ferrocyanide(Fe^{+2})를 비색정량하는 방법으로 시료의 전자공여능인 환원력을 측정하여 항산화활성을 평가하였다. 본 실험에서는 신선한 생표고버섯, 건조표고버섯, 갈변화된 표고버섯에서 각각 열수 및 70% 에탄올로 추출한 분획물의 투여량 별 환원력을 측정하였고 그 활성을 인공항산화제인 BHT와 비교·정리하여 Table 1에 나타내었다. 전반적으로 시료의 환원력은 추출방법에 관계없이 시료의 양이 증가함에 비례하여 증가하였고 3.32 mg/ml의 시료처리 농도에서 BHT와 비슷한 수준의 활성을 보였다. 추출방법에 따른 환원력의 차이를 조사한 결과, 열수추출물의 환원력이 에탄올추출물보다 높은 경향을 보였으며, 특히 건조표고버섯에 이런 경향은 뚜렷하여, 1.66 mg/ml의 시료 처리조건에서 63%의 환원력 증가가 관찰되었다. 상품성 상실의 원인인 갈변화가 표고버섯의 환원력에 미치는 영향을 조사한 결과, 갈변표고버섯의 환원력은 추출방법에 관계없이 상품성을 가진 생표고버섯이나 건조표고버섯보다 유의하게 높았다. Table 1에서 보듯이 3.32 mg/ml의 처리 농도에서 갈변표고버섯의 열수추출물이나 에탄올추출물은 생표고버섯에 비하여 27~28% 정도 환원력이 증가하였고, 건조표고버섯에 비해서도 환원력이 증가하는 것으로 나타났다. 이상의 실험 결과, 환원력을 지표로 한 시료의 항산화 활성은 갈변표고버섯이 오히려 상품성을 가진 표고버섯들보다 우수함을 알 수 있었다.

갈변반응에 의한 phenolic compound와 phytic acid 함량변화. 환원력의 변화는 갈변 반응과정에서 발생된 조성물의 변화

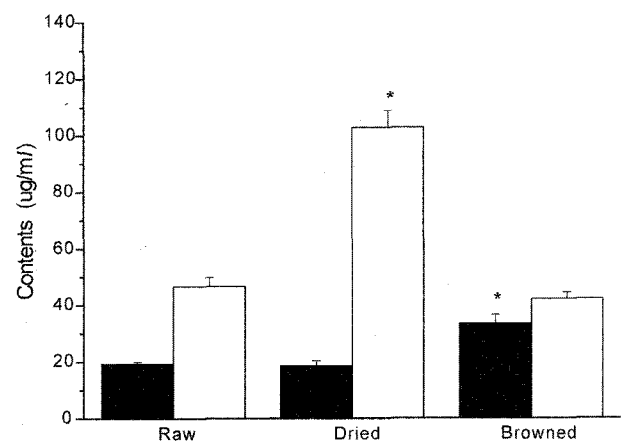


Fig. 1. Contents of phenolic compounds and phytates in the various oak mushroom. Closed bar and open bar indicate the amount of phenolic compound and phytate, respectively. * indicates significant difference at a value of $p < 0.05$.

때문으로 생각된다. 천연물에서 항산화 활성의 발현에 페놀화합물이 광범위하게 관여되어 있다고 알려져 있으며, 특히 버섯류에서 갈변반응에 의하여 melanoidine류의 폴리페놀 화합물이 생성된다고 보고됨에 따라^{19,20} 페놀 화합물의 함량변화를 조사하였다. Fig. 1에 나타난 것처럼 생표고버섯과 건조표고버섯 간에는 페놀화합물의 함량에 차이가 보이지 않은 반면, 갈변표고버섯은 생표고버섯에 비하여 페놀화합물의 함량이 약 73% 증가한 것으로 측정되었다. 한편, 천연물 성분 중 인산화 inositol 계열의 세포 내 신호전달 조절기능으로 근래에 주목을 받고 있을 뿐 아니라 항산화활성도 보고된 phytic acid 함량 변화에 미치는 갈변반응의 효과에 대하여 조사하였다.^{21,22} 그 결과, 갈변반응으로 인한 phytic acid의 함량 변화는 없었지만 건조처리에 의하여 2배 이상 증가하는 현상을 발견하였다. 본 실험 결과는 표고버섯에 있어서 갈변반응에 따른 페놀화합물 함량의 증가를 통하여 갈변표고버섯의 항산화활성이 증가되었을 가능성을 시사한다.

갈변반응이 표고버섯 추출물의 NO(nitric oxide) 생성에 미치는 영향. 활성산소종(ROS)와 더불어 활성질소종(RNS) 중 대표적인 nitric oxide(NO)에 대한 각 표고버섯 추출물의 소거활성을 조사하였다. NO는 면역세포인 대식세포에서 항균활성 및

Table 2. Nitrite scavenging ability of the oak mushroom extracts (at pH 1.2)

Experiment	Sample dose (mg)	Absorbance (520 nm)	Nitrite scavenging ability (%)
Control		0.901±0.001 ^a	0
Aqueous extracts	Raw	10	0.624±0.016 ^d
	Dried	10	0.461±0.005 ^f
	Browned	10	0.457±0.005 ^f
Ethanol extracts	Raw	10	0.728±0.006 ^b
	Dried	10	0.648±0.001 ^c
	Browned	10	0.605±0.016 ^e

Values not sharing common superscript letter in column were significantly different at $p < 0.05$. Results are expressed as mean \pm SD ($n=3$).

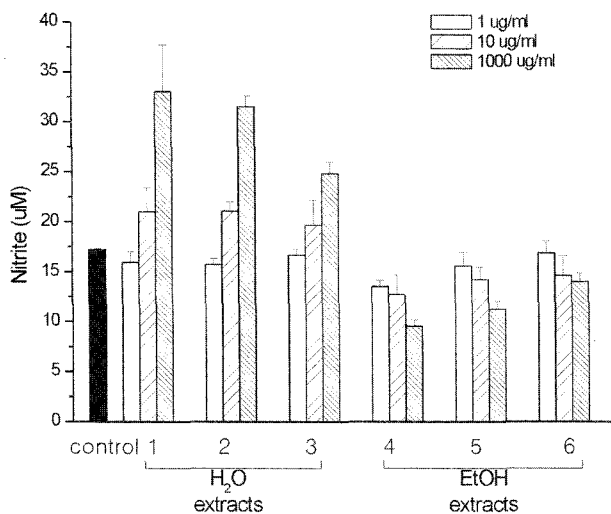


Fig. 2. Modulatory effect of various oak mushroom extracts on nitric oxide (NO) generation from LPS-stimulated RAW264.7 cells. Closed bar indicates NO generation in RAW264.7 cells stimulated only with LPS. Others indicate NO generation values obtained when the cells are treated simultaneously with LPS and various dose of the samples. 1 and 4, raw oak mushroom; 2 and 5, dried oak mushroom; 3 and 6, browned oak mushroom.

세포 신호전달에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있고, 면역계 세포 이외에서도 세포 신호전달물질로 그 역할이 알려지고 있다.²³⁾ 또한 NO는 superoxide anion과 반응하여 강력한 세포독성을 갖는 peroxynitrite 라디칼을 생성하기 때문에,²⁴⁾ NO에 대한 소거능 등의 제어활성은 건강기능적 측면에서 매우 중요하다. 본 실험에서는 *in vitro*와 배양세포계에서 버섯추출물의 NO 소거능을 조사하였다. 먼저 *in vitro*에서 시료의 NO 소거활성을 NO 생성에 있어서 전자수용체로 작용하는 nitrite에 대한 소거활성을 지표로 측정하였다. 결과, 열수추출물이 에탄올 추출물에 비하여 전반적으로 NO 소거능이 높았으며, 갈변표고버섯의 NO 소거능은 생표고버섯에 비하여 열수추출물은 60%, 에탄올추출물은 72% 정도 높았다(Table 2). *In vitro*계의 NO 소거활성이 세포수준에서도 작용하는지를 LPS로 자극된 RAW264.7 세포의 NO 생성에 대한 제어효과로 측정하였다. Fig. 2에 나타난 것처럼, 실험에 사용한 모든 시료처리농도에서 열수추출물과 LPS의 동시 처리는 LPS의 단독 처리보다 NO 생성을 더욱 증진시키는 반면, 에탄올 추출물은 LPS와의 동시

처리가 오히려 NO 생성을 억제하는 경향을 보였다. 특히 100 µg/ml의 시료 농도에서 생표고버섯과 건조표고버섯의 열수추출물은 LPS 단독처리에 비하여 NO의 생성을 약 81% 이상 증진시켰으며, 생표고버섯, 건조표고버섯 > 갈변표고버섯의 순서로 NO 생성을 증진시키는 효과를 보였다. 열수추출물의 경우는 100 µg/ml의 시료처리 조건에서 생표고버섯의 NO 생성 억제능이 약 44%로 가장 높았고 그 다음이 건조표고버섯 > 갈변표고버섯의 순서였다(각각 34% 및 20% 억제). 열수추출물이 LPS에 의한 NO 생성을 증진시키는 것은 glucan이나 galatan 등 균사체 유래의 내재면역계 세포의 활성화물질이 열수에 의하여 효과적으로 추출되었기 때문으로 생각된다.²⁵⁾ 고농도(100 µg/ml)의 추출물을 처리한 경우 갈변표고버섯의 NO 생성에 대한 제어활성은 생표고버섯에 비하여 유의한 변화가 있었지만, 갈변반응은 이와 같은 면역조절 polysaccharide이 보유한 생리활성의 급격한 변화를 일으키지는 않는 것으로 판단된다. 이상의 실험에서 갈변표고버섯 추출물은 NO 생성에 대한 제어작용에 있어서 고상품성의 표고버섯들과 동일한 경향을 나타낸다는 사실을 알 수 있었다.

표고버섯 추출물의 세포독성. RAW264.7 세포에서 나타난 NO 생성에 대한 제어활성의 차이가 각 추출물에 의한 세포독성에 기인할 가능성이 있기 때문에, 추출물의 세포독성을 RAW264.7 세포를 지시세포로 사용하여 MTT법으로 측정하였다. 측정 결과(Table 3), 10 µg/ml에서는 세포가 93% 이상의 생존율을 보였지만 100 µg/ml의 시료 농도에서 생표고버섯과 건조표고버섯 열수추출물 처리 시의 세포생존율은 50% 수준까지 현저하게 낮아졌다. 그러나 갈변표고버섯의 경우 열수추출물 및 에탄올추출물의 세포생존율이 각각 92%와 83%로서, 세포독성이 오히려 낮아진 것을 볼 수 있었다. 이 사실은 Fig. 2에 나타난 각 표고버섯 추출물의 NO 생성에 대한 제어활성의 차이가 지시세포의 생존율과는 무관하며 오히려 갈변반응으로 표고버섯의 세포독성이 저하된다는 사실을 알았다.

갈변반응이 대식세포 matrix metalloproteinase 9(MMP9) 활성에 미치는 영향. 대식세포는 생체에 1차감염이 성립되었을 때 감염체를 포식작용으로 직접 제거하거나 특징적인 cytokine 들을 분비하여 항체생성이나 T_{H1}세포의 활성화를 유도시키는 연결자로 작용하는 등 내재면역계에서 필수적인 역할을 담당하는 면역세포이다.^{26,27)} 최근 동맥경화증성 병반의 진행에 대식세포의 MMP9의 과다발현이 중요한 병리학적 소인임이 알려져

Table 3. Cytotoxic effect of the oak mushroom extracts on RAW264.7 cells

Experiment		Cell viability (%)		
		1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
Aqueous extracts	Raw	106.62±9.98 ^a	84.05±5.57 ^d	50.14±6.09 ^d
	Dried	104.11±6.81 ^a	96.75±8.05 ^c	52.70±6.92 ^d
	Browned	109.67±3.34 ^a	106.27±1.87 ^{ab}	91.79±3.80 ^a
Ethanol extracts	Raw	106.41±5.90 ^a	99.58±3.89 ^{bc}	77.71±6.52 ^{bc}
	Dried	94.40±12.74 ^a	93.03±2.74 ^c	68.76±7.38 ^c
	Browned	100.34±10.57 ^a	113.36±3.37 ^a	82.67±1.46 ^{ab}

Values not sharing common superscript letter in column were significantly different at $p < 0.05$. Results are expressed as mean ± SD (n=3).

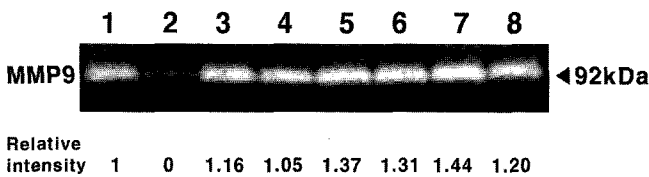


Fig. 3. Modulatory effect of various oak mushroom extracts on MMP9 activity in RAW264.7 cells. Relative intensity indicates the ratio of band intensity when treated with the samples to that stimulated with only LPS. The photograph presented is the representative of triplicate experiments. Lane 1, stimulation with only LPS; lane 2, no stimulation; lane 3 and 6, raw oak mushroom; lane 4 and 7, dried oak mushroom; lane 5 and 8, browned oak mushroom. Lane 3 to 5, extraction with 70% ethanol; lane 6 to 8, extraction with hot water.

있지만, MMP9의 일차적인 역할은 주로 세균인 감염체의 막성분을 인식한 대식세포가 조직의 감염부위로 침윤하여 세균을 제거하는데 있다. 따라서 본 실험에서는 대식세포주인 RAW264.7 세포를 대상으로 각 버섯추출물의 처리가 LPS의 자극으로 유도되는 MMP9의 발현에 미치는 영향을 조사하였고 그 결과를 Fig. 3에 정리하였다. 결과에서 보듯이 LPS만을 처리한 대조구의 세포에서는 92 kDa의 MMP9의 활성이 관찰되

었다. 대조구의 단백질 band intensity를 기준으로 시료와 LPS를 동시에 처리한 실험구의 상대적인 band intensity를 측정할 결과, 표고버섯추출물 처리에 의하여 MMP9의 활성이 5~44% 정도 증가되는 것을 알 수 있었고, 특히 열수추출물에서 평균적으로 MMP9의 활성이 높게 나타났는데 (lane 5,6,7 참조), 이 현상도 버섯추출물에 함유된 polysaccharide의 작용에 의한 것으로 보여진다.²⁸⁾ 시료처리에 의한 MMP9의 활성증가도와 표고버섯의 갈변화 정도가 일치하지는 않았지만, 갈변표고버섯도 고상품성의 표고버섯들과 마찬가지로 활성화 대식세포의 MMP9 생성을 증진시킨다는 것을 알았다.

갈변반응이 돌연변이 억제효과에 미치는 영향. 각 표고버섯 추출물 분획에 대하여 직접변이원인 mitomycin C가 유발하는 DNA의 돌연변이를 억제하는지 여부를 *E. coli* PQ37을 지시세포로 SOS chromotest 기법으로 조사하였다. 실험 결과, 표고버섯 추출물의 돌연변이 억제활성은 시료의 첨가량에 의존하여 변화하였으며, 추출에 사용된 용매에 따른 항돌연변이원성의 차이는 관찰되지 않았다. 특히 갈변표고버섯의 열수추출물 및 에탄올 추출물의 항돌연변이원성은 80 µg 및 160 µg의 투여량에서 각각 약 35 및 72%의 억제수준으로서, 동일한 조건에서 측정된 생표고버섯의 항돌연변이원성인 39% 및 61% 억제와 유사한

Table 4. Effects of the oak mushroom extracts on mitomycin C-induced mutagenicity using *E. coli* PQ37 as an indicator cell

Experiments	Sample dose	β-galactosidase activity (units)	Alkaline phosphatase activity (units)	R-factor	Antimutagenic activity (%)	
	Positive control	11.836±0.009	10.900±0.007	1.085	0	
	Negative control	0.475±0.001	28.230±0.031	0.016	100	
Aqueous extracts	80 g	Raw	11.796±0.047	15.116±0.019	0.780	28.5
		Dried	11.350±0.046	13.103±0.018	0.866	20.5
		Browned	12.820±0.006	14.938±0.009	0.858	21.3
	160 g	Raw	6.106±0.016	14.087±0.050	0.433	61.0
		Dried	6.326±0.001	14.801±0.000	0.427	61.5
		Browned	3.738±0.006	11.958±0.035	0.312	72.3
Ethanol extracts	80 g	Raw	10.555±0.019	15.695±0.003	0.672	38.6
		Dried	10.070±0.004	12.666±0.073	0.795	27.2
		Browned	10.525±0.016	14.821±0.035	0.710	35.1
	160 g	Raw	5.473±0.003	12.656±0.020	0.432	61.1
		Dried	7.113±0.008	14.380±0.000	0.494	55.3
		Browned	7.811±0.000	14.858±0.020	0.525	52.3

Values are expressed as mean ± SD (n=3).

수준이었다(Table 4). 이 결과는 표고버섯의 갈변화가 표고버섯에 내재된 돌연변이 억제활성물질의 활성의 변화를 일으키지 않는다는 사실을 가리킨다.

본 연구의 목적은 시장에서 상품성을 상실한 갈변화 표고버섯을 건강기능성 가진 가공식품으로 활용할 수 있는 가능성을 탐색하는데 있다. 이와 같은 목적의 일환으로 표고버섯의 갈변화가 건강기능성 생리활성의 가장 기초적 지표인 항산화활성에 미치는 영향을 ferricyanide의 환원도를 지표로 한 환원력을 측정하여 조사하였다. 또한 감염 및 종양면역계에서 중심적인 역할을 담당하는 세포인 대식세포의 기능을 측정하는 지표로서 NO 및 MMP9 생성 제어활성을 측정하였고, 화학적 돌연변이원에 의하여 유발된 돌연변이에 대한 억제활성을 조사함으로써 종양발생의 첫 단계를 억제할 수 있는지 여부를 평가하였다. 실험 결과, 갈변표고버섯의 환원력이 생표고버섯이나 건조표고버섯보다 높은 것으로 보아, 항산화활성은 오히려 갈변반응에 의하여 증가된다는 것과 항산화활성이 보고된 phenolic compound의 함량이 갈변반응으로 유의하게 증가된다는 사실을 알았다. *In vitro*에서의 NO 소거능도 갈변반응으로 증가되었으며 배양 세포를 이용한 NO 생성 제어능도 상품성을 가진 생표고버섯과 동일한 경향을 보였을 뿐 아니라, 고농도의 추출물 처리조건에서 갈변표고버섯의 세포독성은 오히려 낮았다. 또한 mitomycin C에 의하여 유발된 돌연변이에 대한 억제활성도 갈변반응으로 크게 변화하지 않았다. 이상의 실험 결과로 볼 때, 갈변표고버섯은 미관상의 결함 이외에는 생표고버섯 등 상품성이 있는 표고버섯과 건강기능성 측면에서 차이를 발견할 수 없었다. 이 사실은 현재 재배 및 저장과정에서 폐기되고 있는 갈변표고버섯을 표고버섯분말이나 추출액 등 건강기능성 가공식품의 형태로 소비될 수 있는 하나의 가능성을 제시하며, 재배 농가의 소득을 안정적으로 보장시켜줄 수 있다는 점에서 상당히 의미를 가지기 때문에 향후 안정성 확보를 위한 보다 세밀한 검정작업이 필요하다고 생각된다.

참고문헌

- Hong J. S. and Kim, T. H. (1989) Contents of free amino acids and total amino acids in *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **21**, 58-62.
- Hwang, B. H. (1983) Analysis of amino acids and vitamin in oak mushroom (*Lentinus edodes* Sing). *Mokchae Konghak* **11**, 18-24.
- Park, M. H., Oh, K. Y. and Lee, B. W. (1998) Anti-cancer activity of *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 702-708.
- Lee, B. K. and Park, K. M. (1998) Antitumor activity of protein-bound polysaccharides extracted from mycelia of *Lentinus edodes*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 665-671.
- Park, K. M. and Lee, B. W. (1998) Extraction and purification of antitumor protein-bound polysaccharides from mycelia of *Lentinus edodes*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 1236-1242.
- Ma, S. J. (1983) Effects of the substances extracted from dried mushroom (*Lentinus edodes*) by several organic solvents on the stability of fat. *Korean J. Food Sci. Technol.* **15**, 150-155.
- Cho, Y. J., Kim, H. A., Bang, M. A. and Kim, E. H. (2002) Effect of dietary mushroom on blood glucose levels, lipid concentrations and glutathione enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Nutri.* **35**, 183-191.
- Kim, Y. S., Lim, C. H. and Cho, N. S. (2002) Hemagglutinative activity of lectin isolated from shiitake, *Lentinula edodes*. *Korean J. Mycol.* **30**, 31-36.
- Kang, M. Y., Kim, S., Yun H. J. and Nam S. H. (2004) Antioxidative activity of the extracts from browned Oak Mushroom (*Lentinus edodes*) with unmarketable quality. *Korean J. Food Sci. Technol.* in press.
- Oyaizu, M. (1986) Studies on production of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutri.* **44**, 307-315.
- Swine, T. and Hillis, W. E. (1959) The polyphenolic constituents of *Prunus domestica* I: The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **10**, 63-68.
- Haug, W. and Lantzsch, H. J. (1983) Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agric.* **34**, 1423-1426.
- Kato, H., Lee, S., Chuyen, N. V., Kim, S. B. and Hayase, F. (1987) Inhibition of carcinogenic nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric Biol. Chem.* **51**, 1333-1339.
- Murakami, A., Gao, G., Kim, O. K., Omura, M., Yano, M., Ito, I., Furukawa, H., Jiwajinda, S., Koshimizu, K. and Ohgashi, H. (1999) Identification of coumarins from the fruit of *Citrus hystrix* DC as inhibitor of nitric oxide generation in mouse macrophage RAW 264.7 cells. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 333-339.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Birkedal-Hansen, H. and Taylor, R. E. (1982) Detergent activation of latent collagenase and resolution of its component molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 1173-1178.
- Quiladet, P., Huisaman, O. D. and Hofnung, M. (1982) SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5971-5980.
- Pang, H. A., Lee, Y. W., Suh, N. J. and Chang, I. M. (1990) Toxicological study on Korean tea materials: Screening of potential mutagenic activities by using SOS chromotest. *Korean J. Pharmacol.* **21**, 83-87.
- Lindenmeier, M., Faist, V. and Hofmann, T. (2002) Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing *in vitro* antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6997-7006.
- Tsuchihashi, H., Kigoshi, M., Iwatsuki, M. and Niki, E. (1995) Action of β -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **323**, 137-147.
- Shear, S. B. (2001) Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. *Cell Signal.* **13**, 151-158.
- Muraoka, S. and Miura, T. (2004) Inhibition of xanthine oxidase by phytic acid and its antioxidative action. *Life Sci.* **74**, 1691-1670.
- Gong, L., Pitari, G. M., Schultz, S. and Waldman, S. A. (2004)

- Nitric oxide signalling: systems integration of oxygen balance in defense of cell integrity. *Curr. Opin. Hematol.* **11**, 7-14.
24. Channon, K. M., Guzik, T. J. (2002) Mechanism of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J. Physiol. Pharmacol.* **53**, 515-524.
25. Mizuno, M., shiomi, Y., Minako, K., Kawakami, S., Ashida, H. and Tsuchida, H. (2000) Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis- and nitric oxide from murine macrophages. *Immunopharmacology* **46**, 113-121.
26. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. (2001) In *Immunology: The immune system in health and disease* (5th ed.) Garland Publishing, New York.
27. Ding, Y., Haapasalo, M., Kerosuo, E., Lounatmaa, K., Kotiranta, A. and Sorsa, T. (1997) Release and activation of human neutrophil matrix metallo-serine proteinases during phagocytosis of *Fucobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *J. Clin. Periodontol.* **24**, 237-248.
28. Ikeda, T. and Funaba M. (2003) Altered function of murine mast cells in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Immunol. Lett.* **88**, 21-26.

Screening of Physiological Functionality for Unmarketable Browned Oak Mushroom (*Lentinus edodes*)

Mi Young Kang¹, Sulyi Kim, Hyejung Yun¹ and Seok Hyun Nam* (¹Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea; Department of Biological Science, Ajou University, 443-749, Korea)

Abstract: For industrial application to manufacturing functional foods for health using browned oak mushroom, we examined its reducing power, inhibitory effect on intracellular reactive oxygen species, phenolic compounds and phytates contents, modulatory effects on NO radical and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) generation by activated macrophages, and antimutagenicity in order to evaluate the functionality of browned oak mushroom for health. While overall ethanolic extracts have higher reducing power than aqueous extracts, browning reaction was found to increase reducing power by up to 28% at a 3.32 mg/ml sample concentration. Browning reaction also increased phenolic compound content by about 73% compared to raw mushroom. However, any significant change in phytate content could not be detected. At a concentration of 100 µg/ml, treatment of ethanolic extract of oak mushroom increased NO generation over 43% in LPS-stimulated macrophage. On the contrary, the aqueous extracts rather decreased it over 17% at the same sample dose. However, any solvent extract from browned oak mushroom seems not to cause any change in both NO production and MMP9 activity. In addition, browning reaction did not allow any significant change in suppressive effect on mitomycin C-induced mutagenesis as examined with SOS chromotest. These results suggest a possible use of browned oak mushroom with unmarketable quality as a material for development of a variety of processed functional foods for health.

Key words: oak mushroom, browning reaction, antioxidative activity, macrophage activation, antimutagenicity

*Corresponding author