

## 표고버섯 에탄올 추출물의 산화적 스트레스 억제 효과와 항돌연변이 효과

오 세 인\* · \*이 미 숙

\*서일대학 식품영양과, 한남대학교 식품영양학과

### Antioxidative Stress and Antimutagenic Effects of *Lentinus edodes* Ethanol Extracts

Se-In Oh\* and \*Mee-Sook Lee

\*Dept. of Food and Nutrition, Seoil College, Seoul 131-702, Korea

Dept. of Food and Nutrition, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

#### Abstract

The antioxidative effect and antimutagenic capacity in ethanol extracts of *Lentinus edodes* were studied for suggestion of prevention and dietetic treatment of chronic diseases and development of antioxidative and antimutagenic functional food by employing biological and biochemical assay. The IC<sub>50</sub> of MDA with BSA conjugation reaction, lipid peroxidation and scavenging effect on DPPH radical in ethanol extracts of *Lentinus edodes* showed 74.58 mg/assay, 5.747 mg/assay and 0.939 mg/assay respectively. So, the most effective antioxidative capacity in ethanol extracts of *Lentinus edodes* was the scavenging effect on DPPH radical, among the method used this study. The indirect and direct antimutagenic effects of ethanol extracts of *Lentinus edodes* were examined by Ames test using *Salmonella typimurium* TA98 and TA100. The inhibition rates on indirect mutagenicity mediated by 2-anthramine showed 91.67% in the *Salmonella typimurium* TA98 and 96.60% in the *Salmonella typimurium* TA100. The inhibitory effect on direct mutagenicity mediated by sodium azide in *Salmonella typimurium* TA100 was 22.83%. and mediated by 2-nitrofluorene in *Salmonella typimurium* TA98 was 5.34%. This data indicates that ethanol extracts of *Lentinus edodes* have more effective effects on indirect mutagenicity than direct mutagenicity. From this result, it believed to have a possible antioxidative and antimutagenic capacities, and taken for the candidate of prevention and dietetic treatment of chronic diseases and development of antioxidative and antimutagenic functional food.

Key words: MDA & BSA conjugation reaction, lipid peroxidation, DPPH radical scavenging effect, antimutagenicity.

#### 서 론

버섯류는 진균류에 속하는 담자균과 자낭균 중 자실체를 형성하는 고등균류로서 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질 및 비타민 등의 영양소를 골고루 함유하고 있을 뿐더러 독특한 맛과 향기를 지니고 있어 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 왔으며, 자연 식품, 저칼로리 식품 및 무공해 식품으로도 진가가 인정되는 식품이다. 특히 버섯의 항암 작용<sup>1)</sup>,

항산화 효과<sup>2)</sup>, 항돌연변이 효과<sup>3)</sup>, 혈당 강하<sup>4)</sup>, 콜레스테롤 저하<sup>5)</sup> 등의 여러 가지 생리활성 기능을 나타내기 때문에 암이나 성인병에 대한 예방 및 개선 효과가 기대되는 좋은 소재라 할 수 있고, 최근에는 건강 식품 및 의약품 소재로 널리 이용되고 있다.

이 중 표고버섯은 참나무, 밤나무, 서어나무 등의 활엽수에 기생하는 담자균 주름버섯목 느타리과에 속하며, 향미 성분과 약리 효과를 가지고 있어 국내에서도 식용 및 약용으로

† Corresponding author: Mee-Sook Lee, Dept. of Food and Nutrition, Hannam University, 461-6 Jeonmin-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Korea.

Tel: +82-42-629-8794, Fax: +82-42-629-8789, E-mail: meesook@hannam.ac.kr

널리 이용되며, 필수아미노산의 함량이 육류나 채소보다 높고<sup>6)</sup>, 저열량 고단백식품으로 칼슘, 인, 철 등의 무기질과 비타민 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub> 및 D 등이 함유되어 있다.

표고버섯에 관한 많은 연구가 진행되고 있는데, alloxan 유발 당뇨 마우스에서 체중 및 포도당 농도 감소 효과가 있었으며<sup>7)</sup>, 표고버섯 단백질 다당류가 콜레스테롤 흡수 저해와 콜레스테롤 생합성을 억제하여 비만과 고지혈증의 예방에 효과가 있었다<sup>8)</sup>. 발암원이 급여된 흰쥐의 혈장 및 간에서 중성 지질과 콜레스테롤의 상승 억제 작용이 있고<sup>9)</sup> 혈전 생성에 관여하는 조직 혈액 응고 인자에 대한 저해 활성<sup>10)</sup>이 있었다. 표고버섯은 고혈압 흰쥐(SHR)의 수축기 및 이완기 혈압을 감소시켰으며<sup>11)</sup>, 표고버섯은 당뇨가 유발된 흰쥐에 혈당 강하 효과가 있었다<sup>12,13)</sup>. 표고버섯 추출액은 loperamide 처치에 의해 감소된 흰쥐의 변의 개수 및 중량을 증가시키고, 원위 결장내 잔류 변 및 cecocolonic segment의 무게를 감소시켜 변비 증상을 개선하는 효과를 보였다<sup>14)</sup>. 또한, 표고버섯 물추출물 및 표고버섯에서 분리한 trehalose는 흰쥐의 장내 유산균 증식 효과가 있으며, 대장암 발생과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진  $\beta$ -glucuronidase와 tryptophanase의 활성 억제 효과<sup>15,16)</sup> 및 백혈병 세포, 간암 세포, 대장암 세포 및 자궁경부암 세포에 대한 사멸 효과가 있었다<sup>17-20)</sup>. 특히, 표고버섯의  $\beta$ -1,3 glucan은 항암제로 개발되어 사용하는데, 체내 면역계의 기능을 활성화하므로 항암 작용을 나타낸다<sup>21)</sup>.

최근 생체 내 각 조직에서 활성산소의 반응 물질이 증가되어 암, 당뇨, 간경화증, 심혈 관계 질환 등의 여러 가지 질병이나 노화를 가져오는 것으로 보고되고 있다<sup>22)</sup>. 암화 과정의 개시 단계에서 발생하는 세포 돌연변이는 DNA의 산화적 손상에 의해 초래되며 그 원인 물질 중 하나가 산소를 소비하는 정상적인 세포 대사 과정에서도 다량 생성되는 free radical이다<sup>22)</sup>. 즉, 친전자성을 띤 free radical들은 세포 내 DNA의 친핵성 부위와 결합함으로써 세포변이를 일으키게 된다. 따라서 대사 과정 중 free radical 생성은 세포의 암화 과정과 긴밀하게 연관되어 관여하는 것으로 보인다<sup>23)</sup>. 버섯류의 항산화 활성은 버섯류 추출물의 polyphenol 함량에 따라 free radical 제거 활성, reducing power, Fe<sup>2+</sup> 이온의 chelating effect 등이 농도 의존적으로 증가하며<sup>1-3)</sup> 버섯류로부터 추출한 단백질 다당체에 대한 free radical 제거 활성도 보고되었고<sup>4,5)</sup>, 표고버섯은 항산화 활성 및 아질산염 소거 작용이 있음이 보고되었다<sup>24)</sup>.

따라서 본 연구에서는 표고버섯 추출물의 생리적 기능에 대한 활성을 탐색하기 위하여 표고버섯의 항산화 효과와 항돌연변이 효과가 어느 정도인지 측정해 보고자 한다. 즉, 표고버섯 에탄올 추출물의 Malondialdehyde(MDA)에 대한 단백질의 보호 효과와 lipid peroxidation 저해 효과, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) radical 소거 효과를 측정하여 단백질의

산화 및 유지류의 과산화 반응에 대한 항산화 효과를 알아본다. 또한, Ames test를 이용하여 표고버섯 에탄올 추출물의 직접 및 간접 돌연변이 유발 억제능을 탐색하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

표고버섯(*Ganoderma lucidum* Krast)을 구입하여(대전 중앙시장) 수세한 다음 동결 건조하고, 분쇄한 후 밀봉 냉동 보관(-20°C)하여 시료로 사용하였다.

### 2. 에탄올 추출물의 제조

표고버섯의 에탄올 추출물은 건조시료 일정량(5 g)에 20배의 95% 에탄올을 가하여 실온에서 24시간 동안 2회 반복 추출하여 Whatman 여과지 No. 6로 여과한 후 여과액을 회전 진공증발기(EYELA, Rotary vacuum evaporator N-N series, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후 냉동 보관하였다가 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 지질 과산화 억제 활성, DPPH 라디칼 소거 활성, Ames test를 위한 시료로 사용하였고, MDA와 BSA(Bovine serum albumin, Sigma, Mo, USA) conjugation 억제 활성 실험을 위해서는 건조 시료를 80% 에탄올로 추출한 다음 여과하여 농축시켰다.

### 3. 항산화 효과 측정

#### 1) 지질 과산화물과 단백질의 결합 억제 효과

Park<sup>25)</sup>의 방법에 따라 BSA, 2 mg/ml, MDA, 20 mM, 표고버섯 추출물, 0.1 M PBS를 혼합하여 37°C에서 24시간 반응시켰다. 이때 BSA 단백질정량은 Bradford법을 사용하였고, MDA는 Gomez-Sanchez<sup>26)</sup>의 방법에 따라 제조하였다. 반응시킨 시료 500  $\mu$ l를 Centricon(Amicon, Centricon YM-10, USA)에 넣고 1,400 $\times$ g에서 2시간 동안 원심분리하여(Beckman, Model J2-21 centrifuge, Oregon, USA) MDA와 BSA의 결합물을 분리한 후, 증류수 700  $\mu$ l를 넣고 1,400 $\times$ g에서 2시간 동안 원심분리하여 여분의 염 등을 세척하였다. 세척은 동일한 방법으로 3회 실시하였다. 세척한 시료를 분리하여 12% SDS-PAGE(SDS polyacryl amide gel electrophoresis)를 120V에서 3시간 동안 실시한 후, gel을 Coomassie 염색하여 Densitometer(Vilber Lourmat, BIO-ID Image Analysis, Vilber Lourmat, Germany)로 정량한 다음, 저해율(inhibition rate, %)을 산출하였다.

#### 2) 지질 과산화 억제 효과 측정

Saija 등<sup>27)</sup>과 Haase 등<sup>28)</sup>의 방법에 따라 Fe<sup>2+</sup>에 의해 유도된 linoleate의 과산화에 대한 억제 활성을 TBA(Thiobarbituric acid,

MO, NY, Sigma)로 발색시켜 측정하였다. 10 ml의 10 mM linoleate 용액에 시료 20  $\mu$ l를 가하고 37°C shaking incubator에서 1시간 동안 shaking 시킨 후, 0.05 M iron sulfate( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 20  $\mu$ l를 첨가한 다음 다시 37°C에서 2시간 동안 shaking하여 과산화 반응을 유발시켰다. 처리된 linoleate 용액 800  $\mu$ l를 4°C에서 10 min 동안 tempering시키고, 400  $\mu$ l의 TBA를 첨가한 다음 잘 혼합한 후 boiling water bath에서 15 min 동안 처리한 후 흐르는 물에 냉각시켰다. 냉각된 용액에 n-butanol 1,120  $\mu$ l 가하고 잘 섞은 다음 250 $\times$ g로 20 min 동안 원심분리하여(Hanil, Union 5KR, Incheon, Korea) n-butanol 층을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정(Molecular Devices, SpectraMAX 340 pc, CA, USA)하였다.  $\text{Fe}^{2+}$ 에 의해 유도된 linoleate의 과산화에 대한 억제 활성을 TBA로 발색시킨 것을 100%로 가정하였을 때, 표고버섯 에탄올 추출물을 첨가하여 50%로 감소시킬 수 있는 농도( $\text{IC}_{50}$ )로 나타내었고, inhibition rate(%)를 산출하였다.

### 3) DPPH 라디칼 소거 활성

Chen 등<sup>29)</sup>의 방법에 따라 DMSO 10  $\mu$ l(대조구)와 DMSO에 녹여 농도별로 희석한 시료 10  $\mu$ l에 200  $\mu$ M DPPH/ethanol 190  $\mu$ l를 가한 후, 37°C에서 30 min 동안 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구에 대해 시료를 넣었을 때의 흡광도의 감소 정도를 측정하였다. 대조구의 흡광도를 100%로 하였을 때 표고버섯 에탄올 추출물을 첨가하여 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 시료의 농도를  $\text{IC}_{50}$ 으로 나타내고, inhibition rate(%)를 산출하였다.

### 4. 항돌연변이능 측정

*Salmonella typhimurium* TA98, TA100 균주를 이용하여 항돌연변이능을 측정하였다. 정기적으로 이들 균주의 histidine 요구성, deep rough(*rfa*) 돌연변이, *uvrB* 돌연변이와 R factor 등의 유전 형질을 확인하였다. 이들 균주는 nutrient broth(Difco)에 접종, 배양하여 현탁액 1 ml당 DMSO 90  $\mu$ l를 가하여 냉동 보관용 tube에 채워 액체질소(Thermolyne, Bio Cane<sup>TM</sup> 20)에 보관하면서 사용하였다. Master plate에 배양한 균주를 nutrient broth에 접종하여 37°C에서 14~16시간 동안 진탕배양(KMC-8480S, Vison Scientific Co Ltd, Seoul, Korea)한 후  $1 \sim 2 \times 10^9$  cells/ml의 밀도가 되도록 하여 실험에 사용하였다.

돌연변이 유발 물질로는 간접 또는 직접 돌연변이 물질을 사용하였는데, 간접 돌연변이 물질로는 환경성 돌연변이 물질인 2-Anthramine(2-AA, Sigma, MO, USA)을 사용하였고, 직접 돌연변이 물질로는 2-Nitrofluorene(2-NF, Aldrich, WI, USA)와 Sodium azide phosphate(Sigma, USA)를 사용하였다. 2-AA와 2-NF는 DMSO에 녹여 사용하였고, Sodium azide phosphate

는 증류수에 녹여 사용하였다. 각 돌연변이 유발 물질은 2-AA의 경우 TA98과 TA100에서 2.5  $\mu$ g/plate, 2-NF는 TA98에서 4  $\mu$ g/plate, Sodium azide phosphate는 TA100에서 2  $\mu$ g/plate의 농도로 사용하였다.

항돌연변이 유발 실험을 위한 배지 및 시약의 조제는 Maron과 Ames의 방법<sup>30)</sup>에 따라 행하였으며, Matsushima 등의 방법<sup>31)</sup>에 따라 실험하였다. 모든 실험은 ice bath 상에서 행하였고 중복 실험하였다. 대사 활성 물질이 필요한 간접 돌연변이 물질을 사용할 때는 S9 mix(11-01L RAT LIVER LS-9, Moltox, NC, USA)를 첨가하였다. DMSO에 녹인 시료 90  $\mu$ l와 배양한 실험균주 0.1 ml, 돌연변이 유발 물질 10  $\mu$ l, 직접 돌연변이원에는 0.5 ml의 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를, 간접 돌연변이원에는 0.5 ml의 S9 mix를 멸균된 시험관에 첨가한 후 가볍게 vortex하여 37°C shaking water bath(KMC-1205SW1, Vison Co Ltd, Seoul, Korea)에서 30분 동안 예비 배양하였다. 0.5 mM histidine/biotin 용액을 100 ml당 10 ml 첨가한 45°C 정도의 Top agar를 2 ml씩 각 시험관에 붓고 3초간 vortex한 후 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 한 후 굳게 하였다. 그 다음 plates를 뒤집어 37°C incubator(VS-1203P3, Vison scientific Co Ltd, Seoul, Korea)에서 48시간 배양한 후 각각의 복귀돌연변이주(revertant colonies)를 계수하였고, 돌연변이 억제율(inhibition rate, %)을 구하였다.

### 5. 통계 처리

실험의 결과는 SAS Package(Statistical Analysis System, ver. 5.1)을 이용하여 처리하였다. 각 실험군마다 데이터의 평균과 표준 오차를 산출하였고, 각 실험군의 평균치간의 차이의 유의성은 ANOVA 실시 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 항산화 효과

#### 1) 지질 과산화물과 단백질의 결합 억제 효과

표고버섯이 체내에서 생성된 지질 과산화물이 단백질과 결합하는 반응을 억제하는지를 알아보고자 0.2  $\mu$ mole MDA와 0.2 mg BSA에 표고버섯 에탄올 추출물을 농도별로 첨가하여 전기영동한 후 이를 대조군의 결합 정도에 대한 저해율로 표시한 결과는 Table 1과 Fig. 1과 같다. 시료의 농도가 10 mg/assay이었을 때 저해율은 19.82%였고, 시료의 농도가 그의 40배인 400 mg/assay이었을 때 저해율은 75.56%로 표고버섯 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 MDA와 BSA의 결합으로 인해 생성된 band가 감소함을 볼 수 있어 표고버섯 에탄올

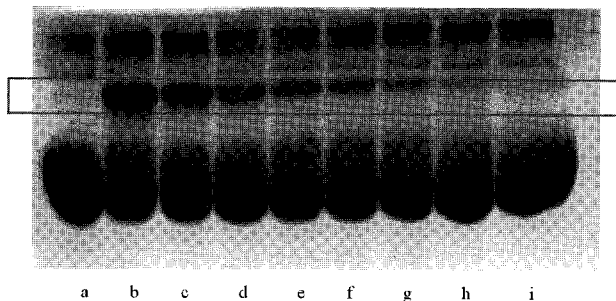
**Table 1. Inhibition rate of ethanol extracts of *Lentinus edodes* on the conjugated MDA with BSA**

Conc.(mg/assay)	Inhibition rate(%)
10	19.82±1.20 <sup>a</sup>
20	26.79±1.53 <sup>b</sup>
40	50.26±0.83 <sup>c</sup>
80	55.96±1.51 <sup>d</sup>
160	57.60±1.39 <sup>d</sup>
320	64.31±1.09 <sup>e</sup>
400	75.56±2.64 <sup>f</sup>
IC <sub>50</sub> <sup>3)</sup> (mg/assay)	74.58
Dry sample wt(mg)	310

<sup>1)</sup> Values are mean±SE,

<sup>2)</sup> Values followed by different letters are significantly different at  $p<0.0001$ ,

<sup>3)</sup> Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve.



**Fig 1. Inhibitory effects of ethanol extracts of *Lentinus edodes* on conjugation of malondialdehyde with protein.**

SDA-PAGE of extracts with MDA and BSA on 12% acryamide gel,

- a: BSA(100  $\mu$ l)+PBS(900  $\mu$ l),
- b: BSA(100  $\mu$ l)+MDA(100  $\mu$ l)+PBS(800  $\mu$ l),
- c: BSA(100  $\mu$ l)+MDA(100  $\mu$ l)+extract(10  $\mu$ l)+PBS(790  $\mu$ l),
- d: BSA(100  $\mu$ l)+MDA(100  $\mu$ l)+extract(20  $\mu$ l)+PBS(780  $\mu$ l),
- e: BSA(100  $\mu$ l)+MDA(100  $\mu$ l)+extract(40  $\mu$ l)+PBS(760  $\mu$ l),
- f: BSA(100  $\mu$ l)+MDA(100  $\mu$ l)+extract(80  $\mu$ l)+PBS(720  $\mu$ l),
- g: BSA(100  $\mu$ l)+MDA(100  $\mu$ l)+extract(160  $\mu$ l)+PBS(640  $\mu$ l),
- h: BSA(100  $\mu$ l)+MDA(100  $\mu$ l)+extract(320  $\mu$ l)+PBS(480  $\mu$ l),
- i: BSA(100  $\mu$ l)+MDA(100  $\mu$ l)+extract(400  $\mu$ l)+PBS(400  $\mu$ l).

추출물에는 지질 과산화물인 MDA가 단백질인 BSA와 결합하는 것을 억제시키는 성분이 있음을 알 수 있었다. 지질 과산화물이 단백질과 결합하는 것을 50% 억제하는 IC<sub>50</sub>은 74.58 mg/assay이었으며, 이를 건조 시료 무게로 환산하면 310 mg이다.

**Table 2. Antioxidative effects of ethanol extracts of *Lentinus edodes* on Fe<sup>2+</sup>-induced linoleate peroxidation**

Conc.(mg/assay)	Inhibition rate(%)
0.01	2.42±1.24 <sup>a</sup>
0.03	5.82±1.21 <sup>ab</sup>
0.10	7.20±0.61 <sup>b</sup>
0.30	11.02±1.73 <sup>c</sup>
1.00	12.23±0.90 <sup>c</sup>
IC <sub>50</sub> <sup>3)</sup> (mg/assay)	5.747
Dry Sample w.t.(mg)	33.43

<sup>1)</sup> Values are mean±SE,

<sup>2)</sup> Values followed by different letters are significantly different at  $p<0.001$ ,

<sup>3)</sup> Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve.

## 2) 지질 과산화 억제 효과

Fe<sup>2+</sup>에 의해 유도된 linoleate의 과산화를 유도하는 과정에서 표고버섯 에탄올 추출물에 의한 지질 과산화 억제 효과를 살펴본 결과는 Table 2와 같다. 표고버섯 에탄올 추출물의 농도 0.01 mg/assay시 2.42%, 1.0 mg/assay시 12.23%의 저해율을 보였으며, 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 지질 과산화의 억제 정도가 증가하였으나, 저해율은 낮았다. Fe<sup>2+</sup>에 의해 유도된 linoleate의 과산화에 대한 억제 활성을 TBA로 발색시킨 것을 100%로 가정하였을 때, 표고버섯 에탄올 추출물을 첨가하여 50%로 지질 과산화를 감소시킬 수 있는 농도(IC<sub>50</sub>)는 5.747 mg/assay이었으며, 이를 건조 무게로 환산하면 33.43 mg이다.

## 3) DPPH 라디칼 소거 효과

표고버섯 에탄올 추출물의 항산화능을 DPPH에 대한 전자공여능(electron donating ability) 즉, DPPH 라디칼 소거능으로 측정할 결과는 Table 3과 같다. 표고버섯 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거율은 시료 농도 0.02 mg/assay시 4.46%, 0.5 mg/assay시 16.28%, 1.0 mg/assay시 26.90%의 라디칼 제거능을 나타내었다. 표고버섯 에탄올 추출물의 처리 농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가함을 알 수 있었다. Kang 등<sup>32)</sup>도 표고버섯 70% 에탄올 추출물에서 0.2 mg에서 3.6%, 2 mg에서 38.0%의 DPPH 라디칼 소거율이 있음을 보고하였다. 또한, DPPH를 첨가하여 안정한 라디칼을 발생시키는 농도를 100%로 하였을 때, 표고버섯 에탄올 추출물을 첨가하여 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)는 0.939 mg/assay였고, 이를 건조 중량으로 환산하면 5.46 mg이다.

표고버섯의 항산화 효과에 대한 이전의 보고에서 Lee 등<sup>33)</sup>

**Table 3. Scavenging effects of DPPH radical by ethanol extracts of *Lentinus edodes***

Conc.(mg/assay)	Inhibition rate(%)
0.002	1.39±0.47 <sup>a</sup>
0.006	2.52±0.21 <sup>ab</sup>
0.020	4.46±0.34 <sup>b</sup>
0.060	8.65±1.04 <sup>c</sup>
0.500	16.28±1.22 <sup>d</sup>
1.000	26.90±1.05 <sup>e</sup>
IC <sub>50</sub> <sup>3)</sup> (mg/assay)	0.939
Dry sample wt(mg)	5.46

<sup>1)</sup> Values are mean±SE,

<sup>2)</sup> Values followed by different letters are significantly different at  $p < 0.0001$ ,

<sup>3)</sup> Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve.

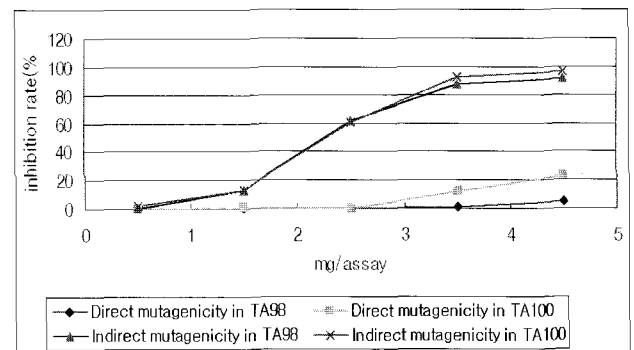
은 표고버섯의 diethylether 추출물에서는 38.35%, 부탄올 추출물에서는 96.09%의 전자 공여 작용이 있었다고 보고하였다. 한편, 유사한 실험으로 Oh 등<sup>34)</sup>은 영지버섯 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거율은 시료 농도 1.0 mg/assay시 67.20%, 2.5 mg/assay시 92.52%의 라디칼 제거능을 나타내어 표고버섯은 영지버섯에 비해 DPPH 라디칼 소거 활성이 낮은 것을 알 수 있었다. 이와 같은 라디칼 제거 활성은 주로 버섯 자실체 추출물 내에 존재하는 flavonoids 및 기타 phenol성 물질에 의한 작용으로<sup>35)</sup> 사료되는데, 왜냐하면 이들 성분은 산화성 생물 활성 자유 라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 효과가 있었고, Kang 등<sup>36)</sup>도 표고버섯에 phenol성 물질이 존재한다고 보고하였기 때문이다.

표고버섯 에탄올 추출물의 항산화 효과를 탐색하기 위해 MDA와 BSA conjugation 반응, 지질 과산화 억제 활성, DPPH 라디칼 소거 활성을 측정된 결과, 표고버섯 에탄올 추출물은

각각의 측정법에 대해 항산화 효과가 있었으나, 측정법에 따라 항산화 효과의 정도는 차이가 있었다. IC<sub>50</sub>은 MDA와 BSA conjugation 억제 반응에서 74.58 mg/assay로 가장 농도가 높았으며, 다음은 지질 과산화 억제 활성으로 5.747 mg/assay였으며, 가장 낮은 농도의 IC<sub>50</sub>은 DPPH 라디칼 소거 활성으로 0.939 mg/assay였다. 따라서 IC<sub>50</sub>으로 보았을 때 표고버섯 에탄올 추출물은 DPPH 라디칼 소거 활성이 상대적으로 가장 우수함을 알 수 있었고, 그 다음은 지질 과산화 억제 활성이었으며, 단백질 산화를 억제하는 효과는 가장 적었음을 알 수 있었다.

**2. 항돌연변이능**

Ames test로 표고버섯 에탄올 추출물의 직접 작용 항돌연변이능을 측정하기 위하여 직접 돌연변이 물질인 2-nitrofluorene (4 µg/plate)를 돌연변이주인 *Salmonella typhimurium* TA98에, Sodium azide(2 µg/plate)를 사용하여 염기쌍 치환 변이주인 *Salmonella typhimurium* TA100으로 실험한 결과는 Table 4 및 Fig. 2와 같다. *Salmonella typhimurium* TA98에서 직접 작용



**Fig. 2. Effects of ethanol extracts of *Lentinus edodes* on direct mutagenicity mediated by 2-Nitrofluorene in *Salmonella typhimurium* TA98 and sodium azide in *Salmonella typhimurium* TA100 and indirect mutagenicity mediated by 2-Anthramine in *Salmonella typhimurium* TA98 and *Salmonella typhimurium* TA100 with S9 mix.**

**Table 4. Effects of ethanol extracts from *Lentinus edodes* on direct mutagenicity mediated by 2-Nitrofluorene in *Salmonella typhimurium* TA98 and sodium azide in *Salmonella typhimurium* TA100**

Extracts Conc. (mg/plate)	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98		<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	
	Revertants/plate	Inhibition rate(%)	Revertants/plate	Inhibition rate(%)
0.5	1,102±132 <sup>1)</sup>	0 <sup>a</sup>	2,189±134	0 <sup>a</sup>
1.5	1,125±104	0 <sup>a</sup>	2,184± 93	1.20±1.20 <sup>a</sup>
2.5	1,151±142	0 <sup>a</sup>	2,134±151	0 <sup>a</sup>
3.5	1,098±120	1.12±1.12 <sup>a</sup>	1,963±124	12.30±5.10 <sup>a</sup>
4.5	993± 45	5.34±0.52 <sup>a</sup>	1,557± 98	22.83±1.54 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Values are mean±SE, <sup>2)</sup> Values followed by different letters are significantly different at  $p < 0.001$ .

돌연변이능에 대한 저해 효과는 표고버섯 에탄올 추출물 농도 0.5~2.5 mg/plate까지 항돌연변이능이 없었으며, 4.5 mg/plate 농도에서 5.34%의 낮은 항돌연변이 작용을 보여주었다. *Salmonella typhimurium* TA100인 경우는 0.5~2.5 mg/plate 농도에서 돌연변이 억제작용이 없었으며, 3.5 mg/plate 농도에서 12.30%, 4.5 mg/plate 농도에서 22.83%의 항돌연변이능을 보여주었다.

환경성 돌연변이 물질인 2-anthramine(2.5 µg/plate)을 사용하여 *Salmonella typhimurium* TA98과 *Salmonella typhimurium* TA100으로 표고버섯 에탄올 추출물의 간접 작용 항돌연변이능을 측정된 결과는 Table 5 및 Fig. 2와 같다. 간접 작용 돌연변이능에 대한 저해 효과는 *Salmonella typhimurium* TA98에서 0.5 mg/plate 표고버섯 에탄올 추출물 농도에서는 효과가 없었으나, 2.5 mg/plate에서 61.34%, 3.5 mg/plate에서 87.60%, 4.5 mg/plate에서 91.67%의 돌연변이 저해 효과가 있었다. *Salmonella typhimurium* TA100에서는 표고버섯 에탄올 추출물의 농도가 0.5 mg/plate일 때 1.52%, 2.5 mg/plate일 때 60.33%, 4.5 mg/plate일 때 96.60%의 돌연변이 억제능을 보여주었다.

Kang 등<sup>36)</sup>은 표고버섯 추출물 분획에 대하여 직접변이원인 mitomycin C가 유발하는 DNA의 돌연변이를 억제하는지를 *E. coli* PQ37를 지시세포로 SOS chromotest 기법으로 조사한 결과, 표고버섯 추출물의 돌연변이 억제 활성은 시료의 첨가량에 의존하여 변화하였으며, 생표고버섯의 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 항돌연변이성은 39% 및 61% 정도였다고 보고하였다.

표고버섯류의 항돌연변이능 측정 결과, 표고버섯류 에탄올 추출물이 간접작용 돌연변이원에 관여한 전구물질을 최종 돌연변이 물질로 전환되는 것을 방지하는 데는 효과적이거나, 활성화된 돌연변이 물질에 직접 결합하여 돌연변이성을 제거하는 작용은 적으리라 추측된다. 특히, 직접 돌연변이 물질인 2-nitrofluorene를 처리한 *Salmonella typhimurium* TA98의 항돌연변이 효과는 본 실험조건에서는 거의 없는 것으로 사료된다.

## 요약 및 결론

예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용하는 표고버섯 추출물의 생리적 기능에 대한 활성을 탐색하기 위하여 표고버섯 (*Lentinus edodes*)의 에탄올 추출물의 MDA에 대한 단백질의 보호 효과, linoleate를 이용한 지질 과산화 억제, DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하여 항산화 효과를 측정하였고, Ames test를 통한 돌연변이 유발 억제능을 탐색하였다.

1. 지질 과산화물에 대한 단백질 보호 효과를 알아본 결과, 표고버섯 에탄올 추출물은 MDA의 교차 결합 형성을 400 mg/assay 이었을 때 75.56% 저해하였고, Fe<sup>2+</sup>에 의해 유도된 지질의 과산화에 대한 저해율은 1.0 mg/assay일 때 12.23%였으며, DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과, 1.0 mg/assay 일 때 26.90%의 저해율을 보였으며, 처리농도가 증가할수록 저해율은 증가하였다. 따라서 각 측정법에 따라 항산화 효과에 차이가 있었는데, IC<sub>50</sub> 값으로 항산화능의 상대적 비교를 하였을 때 표고버섯 추출물은 DPPH 라디칼 소거 활성이 가장 강하였으며, 그 다음은 지질 과산화 억제능이었고, MDA와 BSA의 교차결합 억제능은 가장 낮았다.
  2. Ames test를 이용하여 돌연변이 유발 억제능을 알아본 결과, 표고버섯 에탄올 추출물은 간접작용 돌연변이능에 대한 저해작용은 *Salmonella typhimurium* TA100에서 96.60%, *Salmonella typhimurium* TA98에서 91.67%로 탁월한 효과를 보였다. 직접작용 돌연변이능에 대한 저해 효과는 적었는데, 직접 돌연변이 물질인 2-Nitrofluorene를 처리한 경우, *Salmonella typhimurium* TA98에서 항돌연변이 효과는 5.34%였고, Sodium azide를 처리한 *Salmonella typhimurium* TA100에서는 22.83%의 낮은 항돌연변이 작용을 보여주었다. 따라서 표고버섯 에탄올 추출물은 간접작용 돌연변이능을 억제하는데 효과적임을 알 수 있었다.
- 본 연구의 결과로 표고버섯은 항산화성, 항돌연변이성이

**Table 5. Effects of ethanol extracts from *Lentinus edodes* on indirect mutagenicity mediated by 2-Anthramine in *Salmonella typhimurium* TA98 and *Salmonella typhimurium* TA100 with S9mix**

Extracts Conc. (mg/plate)	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98		<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	
	Revertants/plate	Inhibition rate(%)	Revertants/plate	Inhibition rate(%)
0.5	3,653±205 <sup>1)</sup>	0 <sup>a</sup>	3,728±444	1.52±1.52 <sup>a</sup>
1.5	3,066±113	13.04±0.63 <sup>b</sup>	3,202±325	13.04±0.63 <sup>b</sup>
2.5	1,138± 76	61.34±2.84 <sup>c</sup>	1,510±106	60.33±4.27 <sup>c</sup>
3.5	386± 17	87.60±0.51 <sup>d</sup>	396± 28	92.87±1.44 <sup>d</sup>
4.5	267± 46	91.67±1.61 <sup>e</sup>	263± 30	96.60±1.09 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup> Values are mean±SE, <sup>2)</sup> Values followed by different letters are significantly different at  $p < 0.001$ .

있음을 알 수 있었고, 이를 토대로 표고버섯을 상용함으로써 광범위하게는 만성 성인병의 예방 및 치료에 효과가 있으리라 사료된다. 또한, 본 연구의 결과는 표고버섯을 기능성 식품으로 개발할 수 있는 기초 자료로 활용될 수 있으리라 본다.

## 감사의 글

이 논문은 2006년도 서일대학 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

## 참고문헌

1. Lee, IS, Nishikawa, A. *Polyzellus multiplex*, a Korean wide mushroom, as a potent chemopreventive agent against stomach cancer. *Life Sci.* 73:3225-3234. 2003
2. Cheung, LM, Cheung, PCK and Ooi, VEC. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.* 80:1-7. 2003
3. Ham, SS, Oh, SW, Kim, YK, Shin, KS, Chang, KY, Chung, GH. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 32:1088-1094. 2003
4. Konno, S, Tortorelis, DG, Fullerton, SA, Samadi, AA, Hettiarachchi, J, Tazaki, H. A possible hypoglycemic effect of Maitake mushroom on type 2 diabetic patients. *Diabetic Medicine.* 18:1010-1011. 2001
5. Kim, BK, Shin, GG, Jeong, BS, Cha, JY. Cholesterol-lowering effect of mushrooms powder in hyperlipidemic rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 30:510-515. 2001
6. Hong, JS and Kim, TH. Contents of free amino acids and total amino acids in *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 21:58-62. 1989
7. Song, JY, Yoon, KJ, Yoon, HK and Koo, SJ. Effects of  $\beta$ -glucan from *Lentinus edodes* and *Hordeum vulgare* on blood glucose and lipid composition in alloxan-induced diabetic mice. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 33:802-807. 2001
8. Kweon, MH, Kwon, ST, Kwon, SH, Ma, MS and Park, YI. Lowering effects in plasma cholesterol and body weight by mycelial extracts of two mushroom: *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 402-409. 2002
9. Choi, MY, Lim, SS and Chung, TY. The effects of hot water soluble polysaccharides from *Lentinus edodes* on lipid metabolism in the rats fed butter yellow. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 29:294-299. 2000
10. Hwang, KH, Kim, HK and Han, TN. Inhibitory activity of edible mushrooms on the tissue thromboplastin (tissue factor). *Kor. J. Food Sci. Technol.* 29:161-166. 1997
11. Lee, SH, Park, HJ, Cho, SY and Jeong, HJ. Supplementary effect of *Lentinus edodes* on serum and hepatic levels in spontaneously hypertensive rat. *Kor. Nutr. Soc.* 37: 507-514. 2004
12. Yang, BK, Kim, DH and Song, CH. Production of *Lentinus edodes* mycelia in submerged culture and its hypoglycemic effect in diabetic rats. *Kor. J. Mycology.* 30:131-135. 2002
13. Cho, YJ, Kim, HA, Bang, MA and Kim, EH. Effects of dietary mushroom on blood glucose levels, lipid concentration and glutathione enzymes in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor. Nutr. Soc.* 35:183-191. 2002
14. Park, MK, Jin, YG, Kim, DG, Jin, JY and Lee, YJ. Effects of *Lentinus edodes* extract on the loperamide-induced constipation in rats. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 39:88-93. 2007
15. Han, MJ, Bae, EA, Rhee, YK and Kim, DH. Effect of mushrooms on the growth of intestinal lactic acid bacteria. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 28:947-952. 1996
16. Han, MJ, Bae, EA, Rhee, YK and Kim, DH. Effect of *Lentinus edodes* on some enzymes of intestinal bacteria. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 33: 142-145. 2001
17. Lee, BW and Park, KM. Antitumor activity of protein-bound polysaccharides extracted from mycelia of *Lentinus edodes*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 30:665-671. 1998
18. Park, JM, Lee, SH, Kim, JO, Park, HJ, Park, JB and Sin, JI. *In vitro* and *in vivo* effects of extracts of *Lentinus edodes* on tumor growth in human papillomavirus 16 oncogene-transformed animal tumor model. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 36:141-146. 2004
19. Hwang, YJ, Nam, HK, Chang, MJ, Noh, GW and Kim, SH. Effect of *Lentinus edodes*. and *pleurotus eryngii* extracts on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 32:217-222. 2003
20. Park, MH, Oh, KY and Lee, BW. Anticancer activity of *Lentinus edodes*. and *Pleurotus ostreatus* *Kor. J. Food Sci. Technol.* 30:702-708. 1998
21. Chihara, G. Immune modulation agents and their mechanism(lentinan, a T cell-oriented immunopotentiator). *Basal.* 19:409-439. 1985
22. Comporti, M. Lipid peroxidation: An overview. In: Free

- Radicals: From Basic Science to Medicine: Molecular and cell biology updates(Poli G, Albano E & Dianzani MU, eds.), pp.65-79. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. 1993
23. Meneghini, R, Martins, EAL and Calderaro, M. DNA damage by reactive oxygen species: The role of metal. In: Free Radicals: From Basic Science to Medicine: Molecular and cell biology updates(Poli G, Albano E & Dianzani MU, eds.), pp.102-112. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. 1993
  24. Lee, GD, Chang, HG and Kim, HK. Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushroom. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 29:432-436. 1997
  25. Park, YH. Effect of polyamine on modification of biomodics by aldehyde. *PhD in Medicine Thesis*. Seoul National University. 2000
  26. Gomez-Sanchez, A, Hermonsin, I and Mayo, I. Cleavage and oligomerization of malondialdehyde under physiological conditions. *Tetrahedron Letters.* 28:4077-4080. 1990
  27. Saija, A, Scalese, M, Lanza, M, Marzullo, D, Bonina, F and Castelli, F. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology & Medicine.* 19:481-486. 1995
  28. Haase, G and Dunkley, WL. Ascorbic acid and copper in linoleate oxidation. I. Measurement of oxidation by ultraviolet spectrophotometry and the thiobarbituric acid test. *J. Lipid Research.* 10:555-560. 1969
  29. Chen, HM, Muramoto, K, Yamauchi, F, Fujimoto, K and Nokihara, K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agricultural & Food Chem.* 46:49-53. 1998
  30. Maron, DM and Ames, BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113:173-215. 1983
  31. Mutsushima, T, Sugimura, T, Nagao, M, Yahagi, T, Shirai, A and Sawamura, M. Factors modulating mutagenicity in microbial test, In "Short-term test, systems for detecting carcinogens". Norphth KH and Garner RC (eds.), Springer, Berling, p. 273. 1980
  32. Kang, MY, Kim, SY, Yun, HJ and Nam, SH. Antioxidative activity of the extracts from browned oak mushroom (*Lentinus edodes*) with unmarketable quality. *Korean J. Food Sci. Technol* 36:648-654. 2004
  33. Lee, GD, Chang, HG and Kim, HK. Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushroom *Kor. J. Food Technol.* 29:432-436. 1997
  34. Oh, SI and Lee, MS. Antioxidative and antimutagenic effects of *Ganoderma lucidum* krast extracts. *Kor. J. Food & Nutr.* 18:54-62. 2005
  35. Kang, YH, Park, YK and Lee, GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 28:232-239. 1996
  36. Kang, MY, Kim, SY, Yun, HJ and Nam, SH. Screening of physiological functionality for unmarketable browned oak mushroom(*Lentinus edodes*). *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 47:396-402. 2004
- 
- (2007년 10월 25일 접수; 2007년 12월 3일 채택)