β -Glucuronidase 저해 활성이 우수한 결명자를 첨가한 상황 군사채 배양액의 생리활성

오은희 · 박정미 · 김상희 · 송인규 · 한남수* · †윤향식

충북농업기술원, *충북대학교 식품공학과

Biological Activities of *Phellinus linteus* Mycelium Culture with Cassiae Semen Extract on β -Glucuronidase Inhibitory Activity

Eun Hee Oh, Jung-Mi Park, Sang Hee Kim, In Gyu Song, Nam Soo Han* and †Hyang-Sik Yoon

Chungcheongbukdo Agricultural Research and Extension Services, Cheongwon 363-883, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract

We examined the effects of biological activity *Phellinus linteus* mycelium culture with cassiae semen extract. Firstly, the optimal temperature, initial pH and culture period for mycelial growth in a liquid culture of *P. linteus* were determined, and they were 30°C, pH 5.0 and 8 days respectively. The five herbal materials were examined against several health functional efficacies, and, as a result, *Cassiae semen* was chosen, with its superior inhibitory effects in β -glucuronidase inhibitory activity, electron donating activity, ACE inhibitory, and α -glucosidase inhibitory activities(95.3%, 80.9%, 96.1 and 24.2%, respectively). *P. linteus* fruit body was investigated on β -glucuronidase inhibitory activity, electron donating activity, ACE inhibitory, and α -glucosidase inhibitory activities, and they were 54.7%, 81.9%, 30.0% and 20.1%, respectively. Accordingly, *C. semen* was used in the following experiment, to give an additive functional effect on the *P. linteus*. As the amount of *C. semen* in the cultural media increased, mycelial weight and β -glucan contents also increased, but final pH was not influenced. In addition, the β -glucuronidase inhibitory activity, electron donating activity, and α -glucosidase inhibitory activity increased. *P. linteus* mycelium culture showed higher activities in the other three tests above, except for electron donating activity, when *C. semen* was added to the medium before cultivation.

Key words: *Phellinus linteus* mycelium culture, β -glucuronidase inhibitory activity, biological activity, *Cassiae semen* extract, ACE inhibition

서론

우리나라는 급속한 경제화와 더불어 생활수준이 향상되었지만 서구화되어 가는 식생활로 대장암 발생 빈도가 증가하는 추세이다. 대장암은 선진국에서 발생 빈도가 높으며, 암으로 인한 사망률이 4위를 차지해 주요 암으로 대두되고 있다. 이러한 경향은 식습관의 차이에 의한 것으로 채소의 섭취가 적고, 육류의 섭취가 높은 식습관에서 비롯되었다. 장내세균

의 β -glucosidase, β -glucuronidase, tryptophanase, azoreductase, nitroreductase 등은 활성이 높아지면 아민류와 독성물질, 변이원 등이 생성되고, 장점막에 손상을 주어 대장암을 일으키거나, 장관내로 흡수된 유독 물질들이 체내를 순환하면서 암 유발, 동맥경화, 간장 장애, 면역기능 저하 등의 다양한 질병의 원인이 된다(Kang 등 1998; Rhee 등 1998).

β -Glucuronidase(EC 3.2.1.31)는 glucuronic acid의 β -형태의 1번 탄소에 비당체가 결합한 glucuronide unit를 가수분해

† Corresponding author: Hyang-Sik Yoon, Chungcheongbukdo Agricultural Research and Extension Services, Cheongwon 363-883, Korea. Tel: +82-43-220-5692, Fax: +82-43-220-5679, E-mail: aroma67@korea.kr

하는 효소로 미생물, 식물, 동물 등에 폭넓게 분포하고 있으며, 동물에서는 주로 간장과 신장에 분포하고 있다. 이 효소는 간에서 benzopyrene 등 β -glucoside 배당체 화합물과 glucuronic acid 화합물이 glucuronic acid conjugate로 무독화되어 장으로 보내졌을 때 이 결합을 끊어 주어 발암 원인을 제공한다(Nanno 등 1986). β -Glucuronidase는 세균 및 장내의 생태에 의해 결정되는데, *Clostridium* 속에서 가장 활성이 높고, *Bacteroides* 속, *Eubacterium* 속, *Peptostreptococcus* 속 등도 이 효소를 생산하지만, *Bifidobacterium* 속에서는 β -glucuronidase의 활성이 없는 것으로 보고되었다(Han 등 2001). 현재, β -glucuronidase 저해효과를 갖는 식품들이 많이 알려져 있는데, Rhee 등(1998)은 감초의 ether 분획과 대추의 ethylacetate 분획에서 β -glucuronidase 생산에 대한 저해효과가 우수하다고 보고하였다. Kim 등(1998)은 재배상황버섯을 배지에 첨가한 경우, 사람의 장내세균 총과 흰쥐의 장내세균 총을 이식한 모든 경우에 약 30%의 저해효과를 나타내었다고 한다.

팽나무의 그루터기에 자생하는 다년생 담자균류인 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 항암·항종양효과(Guo 등 2007; Zhu 등 2007), 항돌연변이원성(Shon & Nam 2001), 면역 활성(Park 등 2003; Kim 등 2004b), 항산화능(Song 등 2003; Ye 등 2007), 염증저해효과(Kim 등 2003), 항알르레기성(Choi 등 2006), 항균효과(Hur 등 2004) 등의 다양한 생리활성을 가지고 있다. 버섯균사체의 생육특성을 이용하여 액체배양을 할 경우, 버섯균사체는 배지에 함유된 성분에서 다양한 기능을 갖는 물질로 생물 전환할 수 있으며, 배지에 함유된 기능성 물질도 배양액으로 포함시킬 수도 있다. 또한 버섯균사체가 생산하는 여러 가지 기능성 물질도 배양액에 부가시킬 수 있다(Kim 등 2006b; Oh & Lee 2010). 또한 천연소재를 이용한 버섯균사체 배양에 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다. Kim 등(2006a)은 감귤농축액 첨가배지에서 배양한 번데기 동충하초와 영지버섯의 배양 추출물의 라디칼 소거능이 증가한 것을 확인하였고, Han 등(2003)은 곡물 액체배지에서 배양시킨 팽이버섯의 생리특성을 보고하였으며, Mun 등(2004)은 마늘 첨가 복합배지에서 배양된 영지 균사체의 면역 증진 효과를 관찰하였다.

상황균사체를 쥐에 미리 섭취한 결과, mucus 막이 유지되어 ethanol로 인한 위궤양을 방지하고(Lee 등 2006a), 열수 추출물에서는 항알레르기 효과가 있으며(Inagaki 등 2005), 말아현미에서 키운 상황버섯에서는 IgE 생산 억제능이 존재하였다(Lim 등 2005). Pack 등(2004)은 yeast-malt medium에서 키운 상황균사체에서 분리한 노인성 치매예방 물질인 hispidin이 super oxide anion radical, hydroxyl radical, DPPH radical 저해 효과가 있으며, Nakamura 등(2004)은 상황버섯 균사체는 항종양 효과가 있으며, 그 효과를 갖는 물질은 α -1,3-glucan

chain을 형성하고 있음을 보고하였다. 한편, Song 등(1998)은 상황버섯 자실체 추출 다당의 면역 활성이 63.94%로 균사체 추출 다당의 활성 41.95%, 그리고 균체 외 다당 21.87%보다 높은 활성을 나타내었다고 하였다.

결명자(*Cassiae semen*)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 1년생 열매로서 눈을 밝게 하고, 간장과 신장의 보호 효과, 혈중 콜레스테롤의 저하 효과가 있으며, 야맹증, 고혈압, 변비개선에도 이용된다. 또한 간장보호효과, 항균작용, radical scavenging activity, antimutagenic activity, antiallergic activity, cAMP phosphodiesterase 저해작용 등이 알려져 있다(Ju 등 2001).

인공재배 상황버섯의 배양기간은 보통 90~120일 정도 소요된다. 반면, 버섯의 액체배양은 배양기간이 짧고, 노동력을 단축시키며, 균일한 품질의 대량 생산이 가능한 장점을 가지고 있다(Baek 등 2004). 상황균사체를 응용한 식품은 빵, 술, 차 등이 있으나, 이를 이용한 식품 또는 식품소재의 개발은 아직 초기 단계이다. 본 연구에서는 β -glucuronidase 저해 활성이 강화된 상황균사체 배양액을 이용한 식품 또는 식품소재를 개발하고자, 상황버섯의 최적 액체 배양 조건을 확립하고, β -glucuronidase 저해활성을 갖는 천연소재를 탐색하여 천연소재를 첨가한 상황균사체 배양액의 전자공여능, ACE 저해활성, 혈당강하능 등의 생리활성 평가 및 관능평가를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시약

결명자(*Cassiae semen*)는 거창북부농협협동조합에서, 갈근(*Puerariae radix*), 감초(*Glycyrrhizae radix*), 대추(*Zizyphi fructus*), 오미자(*Schizandrae fructus*)는 농협약용작물전국협회에서 구입하였고, 상황버섯 자실체는 (주)머쉬벌(Seongnam, Korea)에서 건조체를 구입하였으며, *Phellinus linteus*는 (주)바이오라이프(Cheongwongun, Korea)로부터 분양 받아 사용하였다. Potato dextrose broth(PDB)는 Difco Co.(Detroit, MI, USA)에서 구입하여 사용했으며, angiotensin converting enzyme(EC 3.4.15.1, from rabbit lung), α -glucosidase(EC 3.2.1.20, from *Bacillus stearothermophilus*), β -glucuronidase(EC 3.2.1.31, from *Escherichia coli*)와 기질들은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 그 외 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2. 상황균사체의 배양

상황균사체의 배양 온도와 초기 pH, 배양기간을 최적화하기 위해 PDB(2.4 g/200 ml) 배지에 5%(v/v)의 균사체를 접종하였다. 온도는 20, 25, 30, 35 및 40°C에서 4일 동안 정치 배양하였으며, pH는 0.1 N NaOH와 0.1 N HCl을 이용하여 배지

의 pH를 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 및 6.5로 조절하여 30℃에서 150 rpm으로 4일 동안 배양하였다. 배양기간은 선정된 pH, 온도 조건으로 150 rpm에서 10일 배양하여 균사체량을 상압 가열 건조하여 측정하였다.

3. 천연소재 추출액 첨가

상황균사체 배양액의 생리활성을 강화하기 위한 천연소재로 갈근(*Puerariae radix*), 감초(*Glycyrrhizae radix*), 결명자(*Cassiae semen*), 대추(*Zizyphi fructus*), 오미자(*Schizandrae fructus*)를 이용하여 생리활성을 분석하였다. 균사체 배양액 배지 조성은 30 mesh 콩 0.5%(w/v), 설탕 3%(w/v), pH 5로 조정된 다음 121℃, 15분 멸균하여 제조하였으며, 종균은 5%(v/v) 접종하고, 30℃에서 8일 동안 배양하였다. 천연소재 추출액 첨가 시기를 결정하기 위하여 고형물 함량이 2.28%(w/v)인 추출액을 3, 5, 7 및 10%(v/v) 농도로 배양 전, 후에 첨가하였다.

4. 추출

1) 천연소재 및 버섯 추출

천연소재는 blender(Halldé SB-4, Halldé Maskiner, Kista, Sweden)로 분쇄한 시료 30 g에 증류수 300 mL를 가하여 3시간 동안 환류추출하였다. 이를 filter paper(advantec No. 2, Tokyo, Japan)로 여과한 후 생리활성 분석에 사용하였다. 버섯은 cyclotec 1093 Sample Mill(FOSS Tecator, Hoganas, Sweden)을 이용하여 100 mesh로 분쇄한 시료 2 g에 증류수 100 mL를 가하여 4시간 동안 환류추출한 후 filter paper(advantec No. 2)로 여과하여 얻은 추출액을 생리활성 분석에 사용하였다.

2) 상황균사체 배양액 추출

추출방법은 Fig. 1과 같이 배양액을 균질화하여 121℃에서 60분간 고압추출(VS-1221, Vision scientific Co., Bucheon, Korea)한 후 2,000×g에서 10분간 원심분리(Supra 22K, Hanil science Industrial, Gangneung, Korea)하여 균사체 제거 후 여과액의

Fig. 1. Extraction procedure from liquid culture of *P. linteus* mycelium.

일부는 생리활성 분석에 사용하였고, 나머지 여액은 3배의 에탄올을 첨가하여, 4℃에서 24시간 방치한 후 에탄올 층을 제거하고 얻어진 침전물을 동결 건조하여 β -glucan 실험에 사용하였다(Lee 등 2000).

5. 생리활성 측정

1) β -Glucuronidase 저해활성

β -Glucuronidase 저해활성은 Rhee 등(1998)의 방법에 준하여 측정하였다. β -Glucuronidase 효소액(100 unit) 0.02 mL에 2 mM ρ -nitrophenyl- β -D-glucuronide 0.2 mL, 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 0.2 mL, 시료 0.1 mL를 혼합하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 0.25 N NaOH 0.5 mL를 가하여 반응을 종료시켰다. 증류수 1 mL를 가하여 원심분리(2,000×g, 20분)한 후 상등액을 405 nm에서 흡광도(Cary 100 UV-Vis, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 측정하였다. 다음 식에 의하여 β -glucuronidase의 inhibition을 계산하였고, 대조구로는 증류수를 사용하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{C_{\rho\text{-nitrophenol}} - S_{\rho\text{-nitrophenol}}}{C_{\rho\text{-nitrophenol}}} \times 100$$

$C_{\rho\text{-nitrophenol}}$: Amount of ρ -nitrophenol of control (ppm)

$S_{\rho\text{-nitrophenol}}$: Amount of ρ -nitrophenol of sample (ppm)

2) 전자공여능

전자공여능은 Blois(1958)의 방법으로 측정하였다. 각 시료 0.2 mL에 0.4 mM α -diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) 용액 0.8 mL를 가한 후 상온에서 10분 동안 반응시켜 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 다음 식으로 나타내었으며, 대조구로는 증류수를 사용하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{C_{\text{Abs}} - S_{\text{Abs}}}{C_{\text{Abs}}} \times 100$$

C_{Abs} : Absorbance of control

S_{Abs} : Absorbance of sample

3) ACE 저해활성

ACE 저해활성은 Cushman & Cheng(1971)의 방법에 준하여 다음과 같이 조사하였다. 0.3 M NaCl을 함유한 0.1M potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 5 mM hippuryl-histidyl-leucine을 녹인 용액 0.1 mL와 ACE(0.2 unit/mL) 용액 0.08 mL 및 시료 0.1 mL를 혼합하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 1 N HCl을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 여기에 1.25 mL의 ethylacetate를 첨가하여 반응 산물을 추출한 후, 완전히 휘발

시키고 증류수를 첨가하여 효소에 의해 기질로부터 분리된 hippuric acid를 280 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 식으로 ACE 저해도를 계산하였고 대조구로는 증류수를 사용하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{C_{\text{Abs}} - S_{\text{Abs}}}{C_{\text{Abs}}} \right) \times 100$$

C_{Abs} : Absorbance of control

S_{Abs} : Absorbance of sample

4) 혈당강하능

혈당강하능은 Wenling 등(1996)의 방법으로 측정하였다. 기질 20 mM maltose 0.08 mL와 시료 0.02 mL에 α -glucosidase 효소액 0.02 mL를 가하여 37°C에서 20분간 반응시키고, 반응액 0.02 mL에 glucose 정량 kit인 Quantichrom TM Glucose Assay kit(BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) Reagent 1.5 mL를 가하여 끓는 물에서 8분간 반응시키고 4분간 냉각시킨 후 생성된 glucose를 510 nm 흡광도에서 측정하였다. 다음과 같은 식에 의해 혈당강하능을 구하였으며 대조구로는 증류수를 사용하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{C_{\text{glc}} - S_{\text{glc}}}{C_{\text{glc}}} \right) \times 100$$

C_{glc} : Amount of glucose of control (ppm)

S_{glc} : Amount of glucose of sample (ppm)

6. β -Glucan 정량

상황버섯 자실체는 건조 분말 시료를 사용하였고, 상황균사체 배양액은 ethanol을 침전하여 얻은 다당체를 사용하였다. β -Glucan 정량은 Megazyme(Wicklow, Ireland)의 β -glucan 분석법인 'Mushroom and Yeast Bata-Glucan Assay'법(McCleary & Glennie-Holmes 1985)에 준하여 측정하였다. Total-glucan은 추출 시료 0.05 mL에 exo-1,3- β -glucanase와 β -glucosidase의 혼합용액을 0.05 mL 첨가한 후 40°C에서 60분간 반응시켰다. Glucose 정량 kit인 GOPOD reagent를 사용하여 glucose를 정량하여 total-glucan으로 환산하였다. α -Glucan은 추출 시료 0.2 mL에 amyloglucosidase와 invertase 혼합용액을 0.2 mL 첨가한 후 40°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 원심 분리 후 상등액 0.05 mL를 GOPOD reagent를 사용하여 glucose로 정량하여 α -glucan으로 환산하였다. β -Glucan은 total-glucan과 α -glucan의 차에 의해 구하였다.

7. 관능평가

상황균사체 배양액을 관능검사용 시료로 하여 훈련된 관

능요원 10명이 9점 평점법과 차이 척도법(Herbert & Joel 1993)을 변형하여 평가하였다. 색, 향, 맛, 전반적인 기호도를 평가하였고, 평가방법은 제시된 표준시료와 비교하여, 표준시료에 비하여 좋을 경우 5점보다 높은 점수를, 나쁠 경우 5점보다 낮은 점수를 주었으며, 3회 반복 실시하였다.

8. 통계분석

각 시료에서 얻은 실험결과는 3회 반복 실험을 실시하였고, 모든 측정치는 평균(mean)±표준편차(standard deviation)로 나타내었으며, 결과의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 시료 간 차이의 유무를 Duncan's multiple range test로 비교 분석하였다($p < 0.05$). 모든 통계분석은 Statistical Analysis System(v8.1, SAS Institute Inc., NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다.

결과 및 고찰

1. 상황균사체 배양 최적화

상황버섯의 균사체를 배양하기 위한 최적 조건을 알아본 결과, 배양 최적 온도는 25~30°C로 나타났다. Fig. 2(A)에서 보는 바와 같이 배양 온도를 20~40°C에서 4일간 배양한 후 균사체량을 측정한 결과, 25°C와 30°C에서 유의적 차이가 없었으며, 균사체량이 가장 많아 전형적인 중온성 균주로 나타났다. 이는 *Phellinus linteus*의 최적배양온도가 30°C라고 한 Hwang 등(2003)과 Lee 등(2004b)의 결과와 *Phellinus* 속 균주의 최적배양온도가 25~30°C에서 최적이라고 보고한 Chi 등(1996)과 Heo 등(2004)의 연구와 유사하였다. 배양액의 최적 pH는 0.1 N HCl 혹은 0.1 N NaOH를 사용하여 pH를 4.5~6.5로 조절한 PDB 배지에서 배양하여 균사체량을 측정한 결과, pH 4.5~5.0에서 가장 많은 균사체가 배양되었다(data not shown). 이는 액체배양 시 pH 5.0이 최적 pH 조건이라고 한 Hwang 등(2003)의 연구와 일치하였고, pH 5.5~6.5에서는 유의적 차이가 없이 배양되었는데, 이는 *Phellinus* 속이 pH 5.0~8.0에서는 큰 차이 없이 비교적 양호한 성장속도를 나타낸 Heo 등(2004)의 보고와도 유사하다. *Phellinus linteus*의 균사생장에 적합한 최적 배양기간은 최적 배양조건인 30°C, pH 5에서 10일간 배양하며 균사체량을 확인한 결과, Fig. 2(B)와 같이 접종 후 8일까지 균사체량이 증가하였으며, 그 이후 더 이상 증가하지는 않았다. 결과적으로 상황버섯 균사체가 가장 많이 배양되는 조건은 pH 5.0의 PDB 배지에서 30°C, 8일간 배양하는 것이다.

2. 천연소재의 생리활성

상황균사체 배양 시 배지의 첨가 소재를 결정하기 위하여

Fig 2. Effect of temperature(A) and culture period(B) on the mycelial growth in liquid culture of *P. linteus*.

갈근(*Puerariae radix*), 감초(*Glycyrrhizae radix*), 결명자(*Cassiae semen*), 대추(*Zizyphi fructus*), 오미자(*Schizandrae fructus*)의 생리활성을 분석한 결과는 Table 1과 같다. β -Glucuronidase 저해 활성은 갈근과 감초는 50% 이상의 저해활성이 나타났는데, 결명자는 95%로 가장 높았으며, 대추는 저해활성이 나타나지 않았다. Rhee 등(1998)과 Shim 등(1999)은 β -glucuronidase를 생산해 내는 *E. coli* HGU-3을 이용하여 β -glucuronidase의

활성을 측정한 결과, 결명자보다 갈근과 감초에서 저해활성이 높았지만, 이는 측정 방법에 따른 차이에 의한 것으로 판단된다. 전자공여능을 측정한 결과, 결명자가 80.9%로 높은 항산화력을 보였고, 감초, 대추, 오미자는 50% 미만의 비교적 낮은 항산화력을 보였다. 이와 같은 결과는 Kim 등(2004a)의 연구에서 갈근 16.8%, 감초 13.3%, 오미자 33.5%의 전자공여능을 확인한 것과 같이 결명자를 제외한 다른 천연 소재에서는 전자공여능이 높지 않았다.

ACE 저해 활성은 감초, 결명자가 각각 97.7 및 96.1%로 우수한 활성을 보였고, 대추는 13.1%로 가장 낮은 활성을 보였다. 혈당강하능은 α -glucosidase의 저해활성으로 측정하며, 이번 연구에서 결명자가 24.2%로 α -glucosidase의 저해활성이 가장 높게 나왔고, 갈근, 감초, 대추, 오미자는 모두 10% 이내로 낮은 활성을 보였다. 상황균사체 배양 시 배지의 첨가소재는 β -glucuronidase 저해활성, 전자공여능, ACE 저해활성, 혈당강하능 활성이 우수한 결명자를 선발하였다.

3. 상황버섯 자실체의 생리활성

상황버섯 자실체의 β -glucuronidase 저해활성은 54.7%로 나타났고, 이와 같은 결과는 Kim 등(1998)의 연구와 유사하였으며, 전자공여능도 81.9%로 높은 결과가 나타났다.

ACE 저해활성은 30.7%로 측정되었는데, Lee 등(2000)은 상황버섯을 80% ethanol 추출한 결과, ACE 저해도가 95.1%로 가장 우수하다고 보고한 것과 상이하였으며, 이는 상황버섯의 추출 조건의 차이인 것으로 사료된다. Lee 등(2004a)과 Byun & Kim(2002)은 ACE 저해활성을 나타내는 물질이 tripeptide (Gly-Pro-Leu)로 ACE의 활성 부위에 결합하여 저해함을 보고하였으며, 상황버섯에도 이러한 tripeptide 물질이 상당량 존재할 것으로 생각된다. 혈당강하능은 상황버섯에서 20.1%로 높지 않았으며, β -glucan 함량을 분석한 결과, 상황버섯 건조 분말의 β -glucan 함량은 25.6%이고, Pamela & Laura(2000)의 변형된 MCCary 법으로 분석한 β -glucan 함량은 느타리버섯은 0.38%, 새송이버섯은 0.38%, 산느타리 버섯은 0.53%, 표고버섯은 0.22%로 보고한 결과와 비교하면 높은 함량을 가지고 있었

Table 1. Biological activities of herbal food extract^{1,2)}

Herbal food extract	EDA(%)	β -Glucuronidase inhibition (%)	ACE inhibition (%)	α -Glucosidase inhibition (%)
<i>Pueraria thunbergiana</i>	56.0±0.82	51.9±0.91	67.7±2.60	8.8±0.19
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	9.0±0.04	85.25±0.08	97.7±2.40	7.8±2.39
<i>Cassiae semen</i>	80.9±0.25	95.3±1.80	96.1±7.38	24.2±0.00
<i>Zizyphi fructus</i>	13.18±0.97	ND ³⁾	13.1±2.48	4.8±0.15
<i>Schizandra chinensis</i>	20.43±0.21	6.8±1.27	43.8±1.07	7.8±0.45

¹⁾ Each plant extract was measured at 5 mg/mL, ²⁾ All values are mean±S.D. of triple determinations, ³⁾ Not detectable.

Table 2. Biological activities of water extract of *Phellinus linteus*¹⁾

Biological activities	<i>Phellinus linteus</i>
EDA(%)	81.9±0.19
β -Glucuronidase inhibition(%)	54.7±1.05
ACE inhibition(%)	30.0±0.69
α -Glucosidase inhibition(%)	20.1±0.33
β -Glucan contents(%) (w/w) ²⁾	25.6±1.36

¹⁾ All values are mean±S.D. of triple determinations,

²⁾ Samples were analyzed by Megazyme method of "Mushroom and Yeast Beta-Glucan Assay"

다. 결과적으로 상황버섯 자실체의 생리활성은 β -glucuronidase 저해활성 54.7%, 전자공여능 81.9%, ACE 저해활성 30.0%, 혈당강하능 20.1%를 가지고 있음을 확인하였다.

4. 결명자 추출액을 첨가한 배양액의 생리활성

상황균사체 배양액의 생리활성을 강화하기 위하여 다른 천연소재보다 생리활성이 우수한 결명자를 첨가하여 상황버섯 균사체를 배양하였다. 결명자 추출액을 3, 5, 7 및 10%(v/v) 첨가하여 첨가량을 결정하였고, 첨가 시기는 상황균사체 배양 전에 첨가한 것과 배양 후에 첨가한 것을 비교 실험하여 생리활성이 우수한 것으로 결정하였다. 결명자 추출액을 달리하여 배양한 결과, 균사체량은 첨가량이 7%일 때 가장 많이 증가하였으며, 결명자 첨가량과 첨가 시기는 pH에 영향을 주지 않는 것으로 확인하였다(data not shown).

결명자의 첨가량과 첨가시기에 따른 β -glucuronidase 저해활성 변화는 Fig. 3(A)와 같으며, 결명자 첨가량에 따라 증가하였고, 첨가 시기는 배양 전에 첨가한 것이 배양 후에 첨가한 것보다 높은 활성을 보였다. 특히, 결명자 추출액 10% 첨가구에서는 배양 전보다 배양 후에 26.4%의 저해활성이 증가하였다. 이와 같은 결과는 결명자 자체의 생리활성과 함께 액체배양에서 생성된 올리고당 및 다양한 생물전환 물질 등의 영향으로 β -glucuronidase가 저해되는 것으로 판단된다.

전자공여능은 결명자 첨가량이 증가함에 따라 약간 증가하였으며, 첨가 시기는 배양 후에 첨가한 것이 배양 전에 첨가한 것보다 높은 활성을 보였다. 감귤 농축액 첨가 배지에서 상황버섯, 번데기둥충하초, 운지버섯, 꽃송이버섯, 신령버섯, 차가버섯, 표고버섯, 노루궁뎅이버섯, 영지버섯 균주를 배양한 결과, 대부분의 버섯에서 배양액의 전자공여능이 감소한 결과와 유사하였다(Kim 등 2006a). 이는 액체배양에 따른 발효대사산물이 전자공여능 감소에 영향을 준 것으로 보인다.

ACE 저해활성 변화는 결명자를 배양 전에 첨가했을 때 40% 이상의 저해활성을 보였으며, 배양 후에 첨가한 것은 결

Fig. 3. Inhibition effect on β -glucuronidase(A) and angiotensin converting enzyme (B) by the extract of *P. linteus* mycelia cultured with *Cassia semen* extracts. ■; Addition *Cassiae semen* in medium before culture, □; Addition *Cassiae semen* in medium after culture.

명자 7% 첨가구에서 38.8%로 가장 높게 나타났다(Fig. 3(B)). 이는 상황버섯 자실체의 ACE 저해활성보다 높은 수준으로 결명자를 배양 전에 첨가했을 때가 더 효과적인 것을 알 수 있었다. 하지만 혈당강하능에서는 결명자를 배양 후에 첨가한 것이 배양 전에 첨가한 것보다 높은 활성을 나타냈으며, 대부분의 활성이 20% 이하로 높지 않았다.

상황 균사체 배양액의 β -glucan 함량은 세포 내외의 β -glucan 함량을 측정하기 위하여 균사체와 배양액을 분리하지 않고 같이 열수 추출하여 얻은 다당체를 이용하여 측정하였다. 결명자를 배지에 첨가하여 키운 상황 균사체 배양액의 β -glucan 함량을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 결명자 첨가량에 따라 증가하여 무첨가구에서는 4.18 mg/ℓ 이고, 결명자 10% 첨가구는 16.81 mg/ℓ 로 4배의 증가를 보였다. 또한 PDB에서 키운

Fig. 4. Changes of β -glucan content of *P. linteus* mycelia cultured with *Cassiae semen* extracts. ■; Addition *Cassiae semen* in medium before culture.

상황버섯 배양액의 β -glucan 함량은 8.77 mg/l 이고, 결명자를 10% 첨가한 상황버섯 배양액의 β -glucan 함량은 16.81 mg/l 로 β -glucan 함량이 2배 더 높게 나타났다. Reverberi 등(2004)은 olive mill waste water에서 10종의 버섯을 액체배양 한 결과, 표고버섯과 느타리버섯에서의 β -1,3-glucan synthase의 활성이 증가하는 것을 보고하였으며, 이와 마찬가지로 결명자의 첨가가 발효대사과정에 영향을 주어 β -glucan 합성을 증진시켰을 것으로 생각된다. 또한 β -glucan이 β -glucuronidase 활성 저해에 관련된 보고는 없었으나, 식이 섬유 중 하나인 β -glucan은 항암 효과를 가지고 있는 것으로 밝혀져 있고(Kim 등 2006b), 식이 섬유의 섭취로 인한 항암효과와 β -glucuronidase 활성 저해효과에 대한 보고가 있어(Zusman 등 1998; Lampe 등 2002), β -glucan 함량 증가에 따라 β -glucuronidase 저해활성이 증가된 것으로 생각되며, 따라서 향후 β -glucan과 β -glucuronidase 저해활성에 대한 연구가 더 진행되어야 한다. 결과적으로 결명자 추출액은 상황버섯 균사체 배양 전에 첨가해야 하며, 첨가량이 증가할수록 높은 생리활성을 나타냈다.

5. 관능평가

관능평가의 결과는 Table 3과 같이 나타났다. 배양 전, 배양 후 모두 0.05% 유의수준에서 유의차를 보이지 않았고, 배양 전에 첨가한 것은 색, 향, 맛, 전반적인 기호도에서 각 시료별로 차이를 보이지 않았으나, 5% 첨가구에서 전반적인 기호도가 5.27점으로 가장 좋은 점수를 얻었다. 배양 후 첨가한 것에서 색은 유의적 차이가 없었으나, 향과 맛, 전반적인 기호도는 첨가량이 많아질수록 낮아지는 경향을 나타냈다.

요약 및 결론

상황버섯은 항암, 항종양 및 항균효과 등의 다양한 효능을 가지고 있어 기능성식품 산업에 활용할 수 있으며, 여기에 천연소재를 함유한 상황버섯 균사체 배양액은 다양한 식품 소재에 적용될 수 있을 것이다. 이에 천연소재를 첨가한 상황버섯 균사체 배양액을 식품 소재로 이용하고자 다양한 생리활성 분석과 β -glucan 함량 및 관능평가를 수행하였다. 상황균사체 배양액은 30°C 에서 pH 5.0이 최적이었으며, 배양기간은 8일에서 많은 양의 균사체가 배양되었다. 배양액에 천연소재를 함유하기 위하여 갈근, 감초, 결명자, 대추, 오미자 5종의 생리활성을 측정한 결과, β -glucuronidase 저해활성, 전자공여능, ACE 저해활성, 혈당강하능이 결명자에서 각각 95.3, 80.9, 96.1 및 24.2%로 다른 천연소재보다 우수하여 균사체 배양에 첨가할 식품소재로 결명자를 선정하였다. 상황버섯 자실체의 생리활성 및 β -glucan 함량을 측정한 결과, β -glucuronidase 저해활성은 54.7%이며, 전자공여능 81.9%, ACE 저해활성 30.0%, 혈당강하능 20.1%이었고, β -glucan 함량은 25.6%이었다.

상황 균사체 배양 시 결명자 추출액의 배지 첨가량과 첨가 시기를 결정하기 위해, 결명자 3~10%의 농도로 배양 전과 배양 후에 첨가한 결과, 결명자 첨가량 7%까지 균체량이 증가하였고, β -glucuronidase의 저해 활성은 결명자의 첨가량에 따라 증가하였으며, 배양 전에 첨가한 것이 높았다. 하지만

Table 3. Sensory evaluation of liquid cultured *P. linteus* with *Cassiae semen* extracts

Cassiae semen (%)	A				B			
	Color	Flavor	Taste	Overall	Color	Flavor	Taste	Overall
0	5.00 ^{a1)}	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a
3	5.07 ^a	4.20 ^a	4.87 ^a	4.67 ^a	4.73 ^a	4.13 ^{ab}	3.80 ^c	4.07 ^{ab}
5	5.07 ^a	4.80 ^a	5.27 ^a	5.27 ^a	5.47 ^a	4.40 ^{ab}	4.73 ^{ab}	4.33 ^{ab}
7	5.07 ^a	4.60 ^a	5.00 ^a	5.20 ^a	5.60 ^a	4.73 ^{ab}	4.93 ^{ab}	4.73 ^{ab}
10	4.87 ^a	4.73 ^a	4.67 ^a	4.60 ^a	4.93 ^a	4.07 ^b	4.07 ^{bc}	3.93 ^b
F-value	0.06 ^{NS2)}	0.78 ^{NS}	0.42 ^{NS}	0.72 ^{NS}	1.41 ^{NS}	1.82 ^{NS}	3.20 ^{NS}	1.77 ^{NS}

(A) Addition *Cassiae semen* in medium before culture, (B) Addition *Cassiae semen* in medium after culture,

¹⁾ Means within a column not followed by the same letter are significantly different($p < 0.05$), ²⁾ Not significant.

전자공여능은 배양 후에 첨가한 것이 높게 나타났고, ACE 저해활성은 배양 전 첨가구에서 모두 40% 이상의 활성을 보였으나, 유의적 차이가 없었다. 혈당강하능은 배양 후 첨가구가 약간 높게 나타났지만, 대부분 20% 이내의 낮은 활성을 보였다. β -Glucan 함량은 대조구는 4.18 mg/ℓ, 결명자 10% 첨가구는 16.81 mg/ℓ로 결명자 첨가량에 따라 β -glucan 함량이 증가하였다. 관능평가는 배양 전 첨가구에서는 색, 향, 맛, 전반적인 기호도에서 유의적 차이를 보이지 않았으나, 배양 후 첨가구에서는 첨가량에 따라 기호도가 감소하는 경향을 보였다. 결과적으로 결명자의 첨가시기는 배양 전 첨가가 적당하며, 첨가량이 많아질수록 생리활성은 증가하나, 기호도는 감소하는 경향을 보이므로 결명자를 5~7% 첨가했을 때 상황균사체 배양액이 식품 또는 식품소재로서 응용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

참고문헌

- Baek KS, Bae JS, Oh KK. 2004. Optimization of culture conditions of *Agaricus blazei* for the raw material of health food. *Food Eng Prog* 8:53-57
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26:1199-1204
- Byun HG, Kim SK. 2002. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from Alaskan pollack skin. *J Biochem Mol Biol* 35:239-243
- Chi JH, Ha TM, Kim YH, Rho YD. 1996. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Korean J Mycol* 24:214-222
- Choi YH, Yan GH, Chai OH, Lim JM, Sung SY, Zhang X, Kim JH, Choi SH, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH. 2006. Inhibition of anaphylaxis-like reaction and mast cell activation by water extract from the fruiting body of *Phellinus linteus*. *Biol Pharm Bull* 29:1360-1365
- Cushman DW, Cheng HS. 1971. Spectrometric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20:1637-1647
- Guo J, Zhu T, Collins L, Xiao ZX, Kim SH, Chen CY. 2007. Modulation of lung cancer growth arrest and apoptosis by *Phellinus linteus*. *Mol Carcinog* 46:144-154
- Han SY, Shon MY, Lee SW. 2003. Physiological activities of mycelial *Flammulina velutipes* cultured in liquid grain media. *Food Ind Nutr* 8:50-56
- Han MJ, Bae EA, Kim DH. 2001. Effect of *Lentinus edodes* water extract on some enzymes of mouse intestinal bacteria. *Korean J Food Sci Technol* 33:142-145
- Heo BS, Lee KS, Park SC, Lee YS. 2004. Cultural conditions for the mycelia growth of *Phellinus* spp.. *Korean J Mycol* 32:134-137
- Herbert A, Joel LS. 1993. Sensory Evaluation Practices. 2nd ed. pp.68-75. Academic Press. USA
- Hur JM, Yang CH, Han SH, Lee SH, You YO, Park JC, Kim KJ. 2004. Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* 75:603-605
- Hwang, HJ, Kim SW, Choi JW, Yun JW. 2003. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. *Enzyme Microb Technol* 33:309-319
- Inagaki N, Shibata T, Itoh T, Suzuki T, Tanaka H, Nakamura T, Akiyama Y, Kawagishi H, Nagai H. 2005. Inhibition of IgE-dependent mouse triphasic cutaneous reaction by a boiling water fraction separated from mycelium of *Phellinus linteus*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2:369-374
- Ju HK, Hwang BY, Kang SJ, Chang SY, Won DH, Ro JS, Lee KS. 2001. Isolation and quantitative analysis of auranthio-obtusin from *Cassia semen*. *Kor J Pharmacogn* 32:157-162
- Kang EJ, Lee SS, Yang CB, Shin HK. 1998. Effects of dietary fiber on the bacterial enzymes and putrefactive metabolite in aged rats. *Korean J Food Nutr* 11:488-492
- Kim DH, Choi HJ, Bae EA, Han MJ, Park SY. 1998. Effect of artificially cultured *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacterial enzymes and rat intestinal α -glucosidases. *J Fd Hyg Safety* 13:20-23
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004a. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36:333-338
- Kim GY, Choi GS, Lee SH, Park YM. 2004b. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from peritoneal macrophages. *J Ethnopharmacol* 95:69-76
- Kim GY, Roh SI, Park SK, Ahn SC, Oh YH, Lee JD, Park YM. 2003. Alleviation of experimental septic shock in mice by acidic polysaccharide isolated from the medicinal mushroom *Phellinus linteus*. *Biol Pharm Bull* 26:1418-1423
- Kim MC, Kim MJ, Kim T, Park GT, Son HJ, Kim GY, Choi WB, Oh DC, Heo MS. 2006a. Comparison of antibacterial and antioxidant activities of mushroom mycelium culture extracts cultivated in the citrus extracts. *Korean J Biotechnol Bioeng* 21:72-78
- Kim SY, Song HJ, Lee YY, Cho KH, Roh YK. 2006b. Biomedical

- issues of dietary fiber beta-glucan. *J Korean Med Sci* 21:781-789
- Lampe JW, Li SS, Potter JD, King IB. 2002. Serum beta-glucuronidase activity is inversely associated with plant-food intakes in humans. *J Nutr* 132:1341-1344
- Lee DH, Kim JH, Park JS, Choi YJ, Lee JS. 2004a. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 25:621-627
- Lee JH, Lee SJ, Choi YH, Chung KT, Jeong YK, Choi BT. 2006a. Effects of mycelial culture of *Phellinus linteus* on ethanol- induced gastric ulcer in rats. *Phytother Res* 20: 396-402
- Lee JW, Bek SJ, Bang KW, Kang SW, Kang SM, Kim BY, Ha IS. 2000. Biological activities of polysaccharide extracted from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. *Korean J Food Sci Technol* 32:726-735
- Lee KH, Kwon HJ, Chun SS, Kim JH, Cho YJ, Cha WS. 2006b. Biological activities of extracts from *Phellinus linteus*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49:298-303
- Lee WH, Kim SY, Park YJ, Kim TW, Kim HK, Sung JM. 2004b. Favorable conditions for mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Korean J Mycol* 32:95-100
- Lim BO, Jeon TI, Hwang SG, Moon JH, Park DK. 2005. *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice suppresses IgE production by the modulation of Th1/Th2 balance in murine mesenteric lymph node lymphocytes. *Biotechnol Lett* 27:613-617
- McCleary BV, Glennie-Holmes M. 1985. Enzymatic quantification of (1-3)(1-4)- β -D-glucan in barley and malt. *J Inst Brew* 91:285-295
- Mun HC, Lee HS, Park JH, Kim DH, Lee SY, Seong NS, Bang JK, Jung HG, Lee HY. 2004. Enhancement of immune activities of *Ganoderma lucidum* mycelium cultured with garlic enriched medium. *Korean J Med Crop Sci* 12:24-30
- Nakamura T, Matsugo S, Uzuka Y, Matsuo S, Kawagishi H. 2004. Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phellinus linteus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:868-872
- Nanno M, Morotomi M, Takayama H, Kuroshima T, Tanaka R, Mutai M. 1986. Mutagenic activation of biliary metabolites of benzo(a)pyrene by beta-glucuronidase-positive bacteria in human faeces. *J Med Microbiol* 22:351-355
- Oh SI, Lee MS. 2010. Functional activities of ethanol extracts from *Flammulina velutipes*. *Korean J Food Nutr* 23:15-22
- Pamela M, Laura P. 2000. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chem* 68:315-318
- Park IH, Chung SK, Lee KB, Yoo YC, Kim SK, Kim GS, Song KS. 2004. An antioxidant hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. *Arch Pharm Res* 27:615-618
- Park SK, Kim GY, Lim JY, Kwak JY, Bae YS, Lee JD, Oh YH, Ahn SC, Park YM. 2003. Acidic polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* induce phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 312:449-458
- Reverberi M, Di Mario F, Tomati U. 2004. beta-Glucan synthase induction in mushrooms grown on olive mill wastewaters. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:217-225
- Rhee YK, Kim DH, Han MJ. 1998. Inhibitory effect of *Zizyphi fructus* on β -glucuronidase and tryptophanase of human intestinal bacteria. *Korean J Food Sci Technol* 30:199-205
- Shim SB, Park JS, Kim NJ, Kim DH. 1999. β -Glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of herbal medicines. *Kor J Pharmacogn* 30:111-114
- Shon YH, Nam KS. 2001. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by *Basidiomycetes*. *J Ethnopharmacol* 77:103-109
- Song CH, Ra KS, Yang BK, Jeon YJ. 1998. Immuno-stimulating activity of *Phellinus linteus*. *Korean J Mycol* 26:86-90
- Song YS, Kim SH, Sa JH, Jin C, Lim CJ, Park EH. 2003. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *J Ethnopharmacol* 88:113-116
- Wenling D, Tina J, Mikael S, Michael RS. 1996. Evaluation of isofagomine and its derivatives as potent glycosidase inhibitors. *Biochemistry* 35:2788-2795
- Ye SF, Hou ZQ, Zhang QQ. 2007. Protective effects of *Phellinus linteus* extract against Iron overload-mediated oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Phytother Res* 21:948-953
- Zhu T, Guo J, Collins L, Kelly J, Xiao ZJ, Kim SH, Chen CY. 2007. *Phellinus linteus* activates different pathways to induce apoptosis in prostate cancer cells. *Br J Cancer* 96:583-590
- Zusman I. 1998. Comparative anticancer effects of vaccination and dietary factors on experimentally-induced cancers. *In Vivo* 12:675-689

접 수 : 2012년 7월 31일
 최종수정 : 2012년 8월 31일
 채 택 : 2012년 9월 6일