

감귤농축액 첨가배지에서 배양한 버섯균사체 추출물의 항균활성 및 항산화활성 비교

김만철 · 김민주 · ¹김택 · ²박근태 · ³손홍주 · 김기영 · ⁴최우봉 · ⁵오덕철 · †허문수
제주대학교 해양과학부, ¹(주) 대우환경, ²부산대학교 산학협력단, ³밀양대학교 생명공학과
⁴동의대학교 생명공학과/바이오물질제어학과, ⁵제주대학교 생명과학과
(접수 : 2005. 10. 5., 게재승인 : 2006. 2. 25.)

Comparison of Antibacterial and Antioxidant Activities of Mushroom Mycelium Culture Extracts Cultivated in the Citrus Extracts

Man Chul Kim, Min Joo Kim, Taeg Kim¹, Guen Tae Park², Hong Joo Son³, Gi Young Kim,
Woo Bong Choi⁴, Duck Chul Oh⁵, and Moon Soo Heo†

Faculty of marine science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

¹Dae-Woo Environment Co. Bukjeju-Gun, Jeju-Do 695-810, Korea

²The Research-Industry University Liaison, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

³Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-906, Korea

⁴Department of Biotechnology & Bioengineering, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

⁵Department of Life Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

(Received : 2005. 10. 5., Accepted : 2006. 2. 25.)

This study was carried out to investigate the antimicrobial and antioxidative effects of mycelium cultural extract from mushroom. Mushroom mycelium was grown in a defined synthetic liquid medium and citrus extracts, and the culture extracts were examined for antioxidant and antibacterial activity. Myceliums of *Phellinus linteus*, *Cordyceps militaris*, *Coriolus versicolor*, *Sparassia crispa*, *Agaricus blazei*, *Inonotus obliquus*, *Lentinus edodes*, *Hericium erinacium*, *Gonoderma lucidium* in 10% citrus extract supplemented medium and synthesis medium were incubated in a shaking incubator (120 rpm, 24~30°C) for 7~15 days. The antimicrobial activity of the culture fluid of mushroom mycelium grown in submerged liquid culture was tested against 12 microorganisms which were fish pathogens and common bacterial species. The culture extracts showed high activity against *Vibrio* sp. and had poor effect on *Streptococcus* sp., *S. parauberis*, *S. iniae*. The culture extracts obtained from the synthetic medium showed 30~93% of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenger activity, the culture extracts obtained from the citrus extracts medium exhibited antioxidant activity up to 55%.

Key Words : Antimicrobial, antioxidant, citrus extract, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, mycelium

서론

버섯균은 주로 죽은 나무에 기생하여 생육하면서 아주 다양한 extracellular enzyme을 분비하여 자체의 영양분을 조달하는 고등균류로서 자연에는 수많은 식용 가능한 버섯균이 생육하고 있다(1). 버섯은 자연 생태계의 유기물 분

해자로서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 예로부터 인류 생활과는 밀접한 관계를 유지해 오고 있다(2). 전 세계적으로 균류는 50,000여종을 넘고 있으며 이 가운데서 분류학상으로 대부분 담자균에 속하는 버섯은 전 세계적으로 약 20,000여 종이 알려져 있으며 그 중 식용으로 개발 가능한 것은 약 2,000여종으로 알려져 있다. 균류 중에서 버섯들은 포자를 담자기에 4개를 만드는 담자균류와 포자를 자낭에 8개를 만드는 자낭균류로 나눌 수가 있는데 담자균류는 자낭균류에 비하여 큰 것이 대부분이지만 자연계에는 자낭균류가 훨씬 많이 존재한다. 일반적으로 버섯류의 식품적 기능은 영양적 가치에 의한 1차적 기능과 기호성

† Corresponding Author : Faculty of marine science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-756-3493

E-mail : msheo@cheju.ac.kr

에 따른 2차적 기능, 식용 후 인체 내의 다양한 조절기능에 관여하는 3차 기능으로 나눌 수 있는데 최근 이러한 기능을 이용하기 위해 많은 연구가 진행 중에 있다는 보고가 있다(2). 이러한 기능 중에서 3차 기능을 이용하기 위해서 버섯 자실체 (일반적으로 버섯이라고 함)보다 대량으로 생산이 용이한 균사체 및 이들이 분비해 내는 세포외 기능성 물질의 이용에 더 많은 관심을 갖게 되었다(3-5).

이와 같은 버섯균의 생육특성을 이용하여 액체배양을 할 경우, 배지의 조성 및 생육조건에 따라 항균활성 및 항산화력을 갖는 다양한 중간 또는 대사산물을 얻을 수 있다. 즉, 버섯균은 배지에 함유된 성분을 다양한 기능성을 갖는 물질로 생물 전환할 수 있고, 배지에 함유된 특수한 기능을 갖는 2차 대사산물 자체도 배양액으로 유입시킬 수도 있다. 또한 버섯균이 생산하는 여러 가지 기능성 물질 (특히 β -D-glucan 등과 같은 기능성 물질)도 배양액에 부가시킬 것이다. 대부분의 생물에 의한 바이오매스 및 물질 생산은 계절의 제한을 받지만 이와 같은 버섯균 배양물의 생산은 계절에 영향을 받지 않고, 값싸게 대량생산이 가능하여 원료공급이 용이하고, 산업화가 쉽다는 특징을 가지고 있다. 기능성 식품 및 의약품 소재로 크게 주목받고 있는 버섯은 기호성이 높을 뿐만 아니라 심장병, 고지혈증, 뇌졸중 등의 성인병에 대한 예방과 항암효과 및 면역증강 효과가 보고되고 있다(6, 7). 또한 버섯 균사체는 자실체(8, 9)와 유사한 항암작용, 체지방감소, 혈중 콜레스테롤저하 작용 및 면역증강 활성 등이 있는 것으로 알려져 있으나(10, 11), 균사체의 항산화 활성과 식생활에 대한 응용 등의 연구는 미흡한 편이다.

한편, 제주지역을 중심으로 대량 생산되고 있는 온주 밭감은 매년 생산량이 급증하고 있으나, 재배여건에 따른 지역적 제한 때문에 감귤에 대한 연구가 다른 분야에 비해 매우 미흡한 실정이다. 이로 인해 감귤을 원료로 하는 가공제품의 생산에 관심을 기울이고 있고, 용도개발을 통한 고부가 가치 제품을 생산하려는 노력을 하고 있다(12-14).

또한 제주도는 지역적인 특성상 어류 양식 산업이 높은 비중을 차지하고 있으며, 이에 따른 어류 질병에 많이 노출됨에 따라 항생제 사용 빈도 증가로 인한 내성균주의 증가, 생산비의 증가, 제품 이미지 하락 등으로 인하여 어민들의 경제적인 부담이 증가하고 있으므로 친환경적이고 값싸며 경제적인 항생제 및 면역증강제의 개발이 절실한 상황이다.

본 연구는 어류 양식 산업에서 사료첨가제로서의 가능성을 확인하기 위하여 9종류의 버섯 균사체를 감귤농축액이 첨가된 배지와 일반 합성배지에서 각각 배양한 후, 그 배양액의 추출액이 병원성세균 및 어류질병세균에 대한 항균활성과 자유라디칼을 산화시키는 system에서 항산화 효과를 비교 연구하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 총 9 종류로 상황버섯

(*Phellinus linteus*), 번데기동충하초 (*Cordyceps militaris*), 운지버섯 (*Coriolus versicolor*), 꽃송이버섯 (*Sparassia crispa*), 신평버섯 (*Agaricus blazei*), 차가버섯 (*Inonotus obliquus*), 표고버섯 (*Lentinus edodes*), 노루궁뎅이버섯 (*Hericium erinacium*), 그리고 영지버섯 (*Ganoderma lucidium*)균은 (주)대우환경산업에서 보관 중인 균주를 사용하였다(Table 1). 균주보관은 4℃ 냉장실에 20 ml 시험관에 Potato Dextrose Agar (PDA; Difco. Co. USA), YM (Dextrose 1%, Peptone 0.5%, Malt extract 0.3%, Yeast extract 0.3%, Agar 1.8%) slant로 보관하면서 필요할 때마다 같은 배지의 8.5 mm 평판배양기에 이식하여 확대 배양을 하였다. 그리고 균사체 직경이 5 cm 이상 자랐을 때 균사체 가장자리에서 Cork borer (5 mm)로 떼어서 접종하였다. 본 실험에서는 기본 배지로 PDA, YM를 사용하였고, 천연배지로는 감귤농축액을 구입하여 증류수에 10% (v/v) 정도를 첨가한 후, 각각 배양하여 항균활성, 항산화 등의 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 감귤 농축액은 제주도 남제주군 한남리 소재 제주도 지방개발공사에서 생산하여 시판 중인 제주 감귤 희석액 (62 brix)을 구입하여 살균 증류수로 12% 되게 희석하여 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 희석감귤 농축액의 pH는 3.7이었다. 본 항균활성 실험에 사용된 균주는 일반 병원성 균주 *Vibrio harvey* KCTC 2717, *Vibrio mimicus* KCTC 2732, *Vibrio alginolyticus* KCTC 2472, *Vibrio vulnificus* KCTC 2959, *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2471과 어류에서 가장 많은 질병을 일으키는 세균인 그람 음성균인 *Vibrio anguillarum* KCTC 2711, *Edwardsiella tarda* KCTC 12267과 *Vibrio pelagius* KCTC 2732, 그리고 어류 비병원성 세균인 *Vibrio campbelli* KCTC 2716, 질병에 걸린 양식식민치로 분리된 그람 양성균인 *Streptococcus* sp.와 분리 동정된 *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*를 사용하였다. 균 생육배지는 Marine Agar (Difco. Co. USA)와 Nutrient Agar (Difco. Co. USA), 항균활성측정을 위한 배지로는 Mueller Hinton Agar (Difco. Co. USA)를 사용하였다.

Table 1. The mushroom mycelium used for the tests of antibacterial and antioxidant activities

| Name of mushroom | | Part used |
|------------------|-------------------------------|-----------|
| Korean name | Scientific name | |
| Sanghwang | <i>Phellinus linteus</i> | Mycelium |
| Eunji | <i>Coriolus versicolor</i> | Mycelium |
| Dongchunghacho | <i>Cordyceps militaris</i> | Mycelium |
| Sinlyung | <i>Agaricus blazei Murill</i> | Mycelium |
| Chaga | <i>Inonotus obliquus</i> | Mycelium |
| Norugundengi | <i>Hericium erinacium</i> | Mycelium |
| Youngji | <i>Ganoderma lucidium</i> | Mycelium |
| Pyogo | <i>Lentinus edodes</i> | Mycelium |
| Kkotsong i | <i>Sparassia crispa</i> | Mycelium |

플라스크배양 및 Carboy 배양

기본 실험배지는 Potato Dextrose Broth (Difco. Co. USA)와 YM 배지를 사용하였다. 배지는 300 ml 삼각 flask에 100 ml씩 분주하여 121℃, 20분 동안 고압 멸균하였다. 공시균주 접종원을 Cork borer (5 mm)로 5개씩 떼어서 접종하

였다. 배양은 120 rpm의 회전수에 온도는 24~30℃ 사이에서 회전전탕 배양기에서 균에 따라 7일에서 15일까지 배양하였다. 본 배양의 영양원으로 복합배지 (PD broth, YM: Agar 제거)와 감귤농축액 첨가 배지를 사용하였는데 대량 배양에 흔히 사용되는 방법인 carboy 배양방법을 이용하였으며, 감귤농축액배지 (10%)는 2 L의 병에 증류수를 첨가한 후, 감귤농축액의 농도 10% (v/v)로 배지를 조제하여 121℃에서 30분간 가압 살균하여 배지를 조제하였으며, 접종원은 균질기로 균질화한 후 2% 접종비로 무균적으로 접종하였다. 25 ± 1℃의 항온시설에서 통기량 0.2 vvm (volume of air added to liquid volume per minute)으로 7~10 일간 통기 배양하였다.

추출물의 조제

배양이 완료된 배양물을 121℃에서 60분간 고압추출한 후 4000 ×g에서 10분간 원심분리 (union 32R Plus, Hanil)한 후, filter paper (whatman NO. 2)로 여과하였다. 배양 균사체를 제거한 후 여액에 ethanol를 3배 첨가하고, 강력하게 교반한 후 4℃의 저온에서 24시간 방치한 후 4000 ×g에서 30분간 원심 분리하여 상등액과 침전물로 분리한 후, 상등액을 회전감압농축기로 농축 및 동결건조한 후, -70℃의 deep freezer에 보관하면서 각 실험에 사용하였다(Fig. 1).

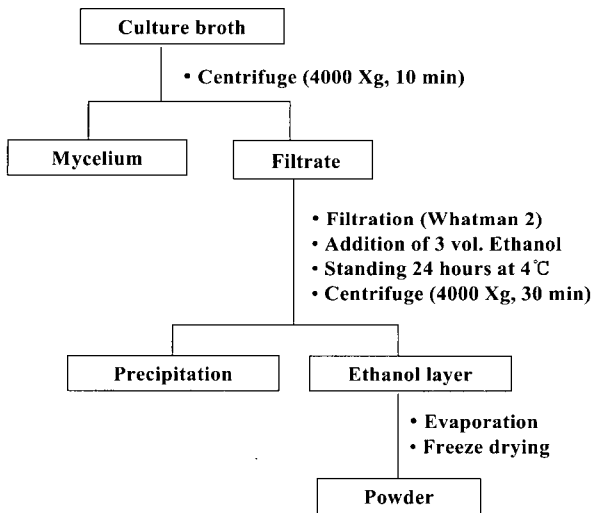


Figure 1. Extraction procedure from culture broth of mushroom mycelium.

버섯균사체의 항균활성측정

항균력 실험을 위한 disc 제작을 위해 버섯균사체 추출분말 10 mg을 멸균증류수 1 ml에 용해한 후, membrane filter (0.45 μm)로 여과한 것을 항생 물질 검정용 paper disc (ADVANTEC F0424695, 6 mm)에 각각 100 μl씩 흡습시킨 후 40℃로 조절된 건조기에서 30분 동안 충분히 건조시킨 다음 항균력 실험에 사용하였다. disc당 추출물의 함유량은 1,000 μg이었다.

항균활성 실험에 사용된 균주는 표준균주를 포함하여 그람 음성균 9균주, 그람 양성균 3균주였다. 이들 균들은 각각의 최적 배지와 생장 최적 조건에서 전 배양한 후,

MacFaland No. 0.5인 균 현탁액을 다시 생리식염수에 10배 희석하여 미리 만들어진 Muller Hinton Agar plate에 100 μl를 골고루 도말한 후, 제작한 버섯균사체 추출물이 함유된 disc를 올려놓고, 각각의 균주 배양 온도에 맞추어서 24시간 배양한 다음 버니어캘리퍼스로 저지대를 측정하였다. 또한 시험 추출분말의 항균력 비교를 위하여 총 7 종류의 항생제 (Penicillin, Erythromycin, Neomycin, Kanamycin, Chloramphenicol, Nalidixic acid, Tetracycline) disc를 비교 약재로 사용하였다.

DPPH에 대한 수소공여능에 의한 항산화 활성 측정

9 종류의 버섯균사체의 복합배지 배양여액과 10% 감귤농축액 첨가배지 배양여액 총 18종과 10% 감귤농축액의 동결건조물을 가지고 항산화 활성을 측정하였다. 항산화 활성은 가장 기초적인 단계의 실험인 DPPH법(15)에 의하여 실시하였다. DPPH는 항산화성 물질로부터 전자, 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하므로, 전자공여능 (electron donating ability)으로부터 항산화 활성을 추정할 수 있다(16). 전자공여능은 150 μM DPPH 용액 2 ml와 균사체 추출용액 1 ml를 혼합한 후, 상온에서 30분간 반응시킨 후, 525 nm의 흡광도차로 측정하였다. 대조구로 사용한 BHA (butylated hydroxyanisole)와 BHT (butylated hydroxytoluene) 등의 합성 항산화제도 같은 방법에 의하여 실험하였다.

Superoxide radical (O₂⁻) scavenging ability

Superoxide radical 소거활성능은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund와 Marklund의 방법에 따라 측정하였다(17, 18). 본 실험에서 사용된 시료는 동결 건조된 추출물을 증류수에 10 mg/ml의 농도로 희석된 것을 사용하였으며, 측정방법은 50 mM phosphate buffer 2.61 ml, 3 mM pyrogallol 90 μl를 첨가하여 30초 간격으로 3분간 spectrophotometer (Hanson OPRON-3000, Korea)에서 standard (control)를 측정한 후, 추출물들의 시료들은 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 2.61 ml와 시료 50 μl, 3 mM pyrogallol 90 μl를 첨가하여 325 nm에서 30초 간격으로 6분간 측정하였으며, superoxide radical 소거활성 값은 다음과 같은 식에 의해서 나타내었다(19).

$$\text{Superoxide radical scavenging activity (\%)} = (a-b)/a \times 100$$

a = standard의 반응 전과 반응 후의 흡광도 차이

b = sample의 반응 전과 반응 후의 흡광도 차이

결과 및 고찰

버섯균사체 배양 추출물의 항균활성

일반합성배지 및 감귤농축액 첨가배지로부터 추출된 버섯균사체 배양액을 사용하여 병원성세균 및 여류질병세균에 대한 항균활성을 조사한 결과, Table 2, 3과 같이 대부분의 시료에서 항균활성이 있는 것으로 나타났다. Table 2

에서와 같이 일반합성배지 균사체 배양 추출물에서의 항균활성은 *Sparassia crispa* > *Coriolus versicolor* > *Phellinus linteus* > *Agaricus blazei* > *Hericicum erinacium* 순으로 높은 활성을 나타내었으며, *Vibrio* 균주에 대한 항균활성은 *Sparassia crispa*, *Coriolus versicolor* 배양추출물에서 높은 활성을 보였으며, 특히 어류 질병을 일으키는 대표적인 균주인 *V. pelagius*와 *E. tarda*에 대한 감수성은 *Sparassia crispa*와 *Coriolus versicolor*에서 가장 높은 활성이 관찰되었다. 또한 그람양성세균에 대한 항균활성 실험에서는 *Sparassia crispa*, *Coriolus versicolor*, *Phellinus linteus* 균사체 배양추출물에서 다른 실험구와 비교해 보았을 때 비교적 높은 감수성을 보였다.

반면 감귤농축액 첨가배지에서의 버섯균사체 배양 추출물의 항균활성은 Table 3에 나타내었다. 일반 합성배지에서와 거의 유사한 결과를 얻을 수 있었는데, 전체적인 항균활

성을 비교해 보았을 때, 항균활성이 조금 증가한 양상의 결과를 얻을 수 있었다. 희석 감귤농축액 배지의 경우, 감귤의 유리된 유기산 및 유리당, 무기질 등이 다량으로 함유됨으로 인하여 균사체 대수증식기에 영향을 주어 항균활성을 나타내는 물질이 다량 생성되는 것으로 사료된다.

이러한 결과를 종합해 볼 때 *Sparassia crispa*, *Coriolus versicolor* 균사체 배양 추출물은 어류질병세균 및 병원성세균에 대한 항균활성이 가장 높게 나타난 것을 볼 수 있었다(Table 2). 이는 약제 disk 처리구와 거의 비슷한 수준의 항균 활성능(Table 4)을 보여 주는 것으로서 이러한 결과는 기존 항생제를 대체하여 어류 양식장에서 사료 첨가제로 사용할 수 있는 가능성이 있고, 특히 *Sparassia crispa* 균사체 배양 추출물인 경우 그 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다. 또한 천연배지로 사용된 감귤농축액 첨가배지 또한 버섯균사체의 대량 배양에 있어서 값비싼 합성배

Table 2. Antibacterial activities of the liquid culture extracts of mushroom mycelium from the synthetic liquid media

| Strain | <i>Phellinus linteus</i> | | <i>Coriolus versicolor</i> | | <i>Cordyceps militaris</i> | | <i>Agaricus blazei</i> | | <i>Inonotus obliquus</i> | | <i>Hericicum erinacium</i> | | <i>Ganoderma lucicum</i> | | <i>Lentinus edodes</i> | | <i>Sparassia crispa</i> | |
|----------------------------|--------------------------|----|----------------------------|----|----------------------------|----|------------------------|----|--------------------------|----|----------------------------|----|--------------------------|----|------------------------|----|-------------------------|----|
| | Inhibition zone (mm) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Concentration (mg/ml) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 |
| <i>V. harvey</i> | 9 | 10 | 18 | 20 | 10 | 15 | 17 | 22 | - | 9 | 10 | 13 | 10 | 12 | 8 | 11 | 19 | 22 |
| <i>V. mimicus</i> | 9 | 11 | 12 | 15 | - | 10 | 11 | 13 | 8 | 12 | 8 | 12 | 8 | 11 | 7 | 11 | 22 | 24 |
| <i>V. alginolyticus</i> | 10 | 13 | 11 | 12 | - | 9 | 8 | 11 | - | - | 10 | 13 | 8 | 10 | 9 | 11 | 16 | 20 |
| <i>V. vulnificus</i> | 11 | 13 | 15 | 18 | 9 | 10 | 12 | 15 | 9 | 11 | 9 | 13 | - | 9 | 8 | 10 | 17 | 20 |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 14 | 18 | 15 | 22 | 9 | 10 | 10 | 15 | 9 | 10 | 9 | 10 | 12 | 19 | - | 8 | 19 | 21 |
| <i>V. campbelli</i> | 8 | 8 | 9 | 12 | 8 | 9 | - | - | 7 | 8 | 8 | 10 | 10 | 10 | - | 8 | 20 | 22 |
| <i>V. anguillarum</i> | 10 | 13 | 13 | 18 | 9 | 11 | 10 | 11 | 9 | 12 | 8 | 10 | 8 | 10 | 8 | 12 | 21 | 23 |
| <i>V. pelagius</i> | 0 | 0 | 9 | 10 | - | - | - | - | - | - | 8 | 9 | - | - | - | 7 | 20 | 22 |
| <i>E. tarda</i> | 9 | 10 | 10 | 12 | 9 | 10 | 10 | 11 | 8 | 11 | - | - | - | - | - | - | 16 | 18 |
| <i>Streptococcus sp.</i> | 9 | 14 | 9 | 13 | 8 | 10 | 8 | 12 | 8 | 8 | 9 | 12 | - | - | 9 | 12 | 20 | 25 |
| <i>S. iniae</i> | - | 8 | - | 12 | 7 | 7 | - | - | 8 | 9 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>S. parauberis</i> | - | 8 | 7 | 7 | 7 | 7 | 0 | 0 | 9 | 15 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

Cells were grown on MHA plate for 24h at 26, 37°C after 10 mg, 20 mg each of mushroom liquid cultures was absorbed into paper disc (6 mm in diameter) and then the diameter (mm) of the growth inhibition zone was measured. Each value represents the average of three independent experiments. -: No inhibition zone, ND : No data

Table 3. Antibacterial activities of the liquid culture extracts of mushroom mycelium from the citrus extract media

| Strain | <i>Phellinus linteus</i> | | <i>Coriolus versicolor</i> | | <i>Cordyceps militaris</i> | | <i>Agaricus blazei</i> | | <i>Inonotus obliquus</i> | | <i>Hericicum erinacium</i> | | <i>Ganoderma lucicum</i> | | <i>Lentinus edodes</i> | | <i>Sparassia crispa</i> | |
|----------------------------|--------------------------|----|----------------------------|----|----------------------------|----|------------------------|----|--------------------------|----|----------------------------|----|--------------------------|----|------------------------|----|-------------------------|----|
| | Inhibition zone (mm) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Concentration (mg/ml) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 |
| <i>V. harvey</i> | 12 | 15 | 12 | 17 | 10 | 17 | 10 | 13 | 10 | 13 | 10 | 15 | 10 | 14 | 8 | 12 | 15 | 22 |
| <i>V. mimicus</i> | 12 | 13 | 11 | 13 | 7 | 8 | 8 | 10 | 8 | 10 | 8 | 15 | 8 | 12 | 10 | 12 | 12 | 20 |
| <i>V. alginolyticus</i> | 10 | 13 | 10 | 13 | 8 | 9 | 9 | 11 | 9 | 10 | 11 | 17 | 10 | 13 | 10 | 14 | 13 | 16 |
| <i>V. vulnificus</i> | 10 | 13 | 11 | 14 | - | 10 | 8 | 8 | 9 | 13 | 10 | 17 | 10 | 15 | 11 | 15 | 12 | 18 |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 13 | 17 | 13 | 17 | - | - | 9 | 10 | 8 | 12 | 9 | 15 | 8 | 11 | 9 | 15 | 15 | 20 |
| <i>V. campbelli</i> | 9 | 10 | 10 | 10 | 8 | 8 | - | - | - | 10 | 10 | 14 | 8 | 11 | 10 | 15 | 15 | 22 |
| <i>V. anguillarum</i> | 13 | 16 | 10 | 15 | 8 | 10 | 10 | 13 | 9 | 13 | 10 | 15 | 8 | 13 | 10 | 13 | 15 | 22 |
| <i>V. pelagius</i> | - | 8 | 8 | 8 | - | - | - | - | - | - | 8 | 9 | - | - | 8 | 9 | 12 | 15 |
| <i>E. tarda</i> | 8 | 9 | 7 | 8 | 7 | 8 | 8 | 9 | 9 | 10 | - | 10 | - | 8 | 8 | 9 | 12 | 15 |
| <i>Streptococcus sp.</i> | 13 | 16 | 10 | 12 | 8 | 10 | 8 | 10 | 7 | 10 | 10 | 15 | 9 | 12 | 10 | 12 | 15 | 20 |
| <i>S. iniae</i> | - | 7 | - | 12 | 7 | 7 | - | - | 8 | 10 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>S. parauberis</i> | 8 | 10 | 8 | 11 | 8 | 8 | 7 | 8 | 8 | 10 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

Cells were grown on MHA plate for 24h at 26, 37°C after 10 mg, 20 mg each of mushroom liquid cultures was absorbed into paper disc (6 mm in diameter) and then the diameter (mm) of the growth inhibition zone was measured. Each value represents the average of three independent experiments. -: No inhibition zone. ND : No data

지보다 항산화능이 높게 나타나고 있으므로, 합성배지를 대체할 수 있을 것으로 사료된다.

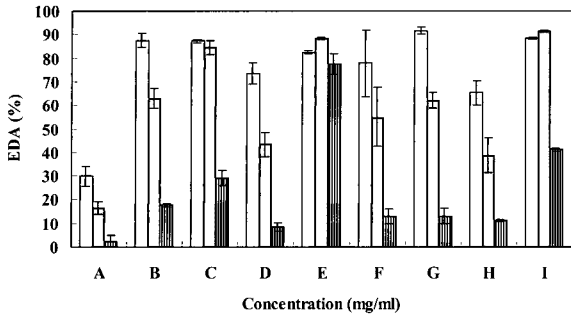


Figure 2. Electron donating activities of extracts from mushroom mycelia culture (A: *Ganoderma lucidum*, B: *Hericum erinacium*, C: *Lentinus edodes* D: *Inonotus obliquus*, E: *Sparassic crispa*, F: *Agaricus blazei*, G: *Cordyceps militaris*, H: *Coriolus versicolor*, I: *Phellinus linteus*. □: 10mg/ml, ▨: 5mg/ml, ▩: 1mg/ml. Each value represents the average of three independent experiments).

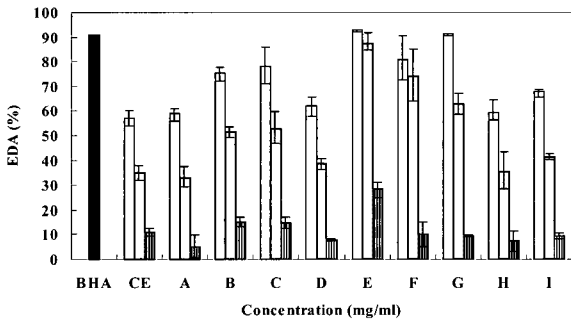


Figure 3. Electron donating activities of extracts from mushroom mycelia cultured with citrus (10%) extracts (A: *Ganoderma lucidum*, B: *Hericum erinacium*, C: *Lentinus edodes* D: *Inonotus obliquus*, E: *Sparassic crispa*, F: *Agaricus blazei*, G: *Cordyceps militaris*, H: *Coriolus versicolor*, I: *Phellinus linteus*. □: 10 mg/ml, ▨: 5 mg/ml, ▩: 1 mg/ml, ■: BHA (butylated hydroxyanisole), CE: Citrus extract (Negative control), Each value represents the average of three independent experiments).

버섯균사체 배양 추출물의 전자공여능

항산화물질의 가장 특징적인 역할은 oxidative free radical 과 반응하여 산화력을 억제시키는데 있다. DPPH법은 tocopherol, ascorbate, flavonoid 화합물, 방향족 아민류, maillard형 갈변 생성물질, peptide 등의 항산화 활성을 나타내는 생리활성 물질에 의해 환원됨으로서 짙은 자색이

탈색되는 정도에 따라 항산화 효과를 전자공여능으로 측정하는 방법으로 항산화제 탐색에 일반적으로 이용되는 방법으로 알려져 있다. 감귤농축액 첨가배지에서 배양한 버섯균사체 배양추출물과 일반 합성배지에서 배양한 버섯균사체 배양추출물에 의한 항산화 효과를 DPPH에 의한 전자공여능 소거작용을 측정하여 Fig. 2, 3에 나타내었다. 모든 시험 처리구에서 농도가 높아질수록 항산화력이 증가하였으며, 특히 *Sparassic crispa* 균사체 배양 추출물인 경우에 1 mg/ml의 낮은 농도에서도 80%에 가까운 radical 소거 활성을 보였으며, 이러한 결과는 일반 합성항산화제와 비교해보아도 거의 비슷한 결과를 나타내는 것으로서 천연항산화제의 사용가능성을 있을 것으로 사료된다. 거의 모든 실험구에서 5 mg/ml 이상의 농도에서는 40% 이상의 라디칼 소거활성능이 관찰되었으며, 감귤농축액 첨가배지에서 *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps militaris* 균사체 배양추출물의 라디칼 소거활성능이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 다른 균사체 배양 추출물에서는 감소하는 양상을 나타내었다(Fig. 2, 3). 이러한 결과는 현재 문제가 되고 있는 합성항산화제의 안전성, 가격, 항산화 활성에 대한 천연 항산화제의 개발 가능성이 있으며, 이와 밀접하게 관련되어 있는 질환의 발병을 예방 또는 치료할 수 있는 생리활성 물질로서 작용할 가능성이 높다.

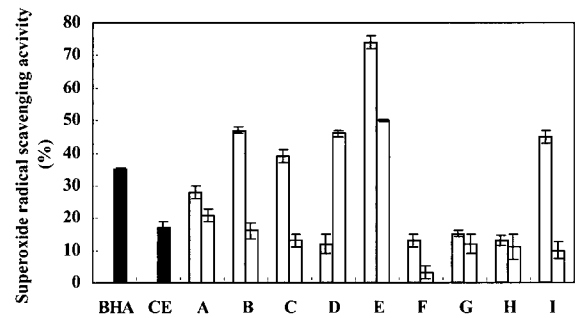


Figure 4. SOD-like activity of the liquid culture extracts of mushroom mycelium from the synthetic liquid and the citrus extract media (A: *Ganoderma lucidum*, B: *Hericum erinacium*, C: *Lentinus edodes* D: *Inonotus obliquus*, E: *Sparassic crispa*, F: *Agaricus blazei*, G: *Cordyceps militaris*, H: *Coriolus versicolor*, I: *Phellinus linteus*. ▨: liquid culture extracts of the synthetic media, □: liquid culture extracts of the citrus media, BHA (butylated hydroxyanisole), CE: Citrus extract (Negative control), Each value represents the average of three independent experiments).

Table 4. Antibiotics resistance of *Vibrio* sp. and fishes disease bacteria

| | Penicillin | Erythromycin | Neomycin | Kanamycin | chloamphenicol | Nalidixic acid | Tetracycline |
|----------------------------|----------------------|--------------|----------|-----------|----------------|----------------|--------------|
| | Inhibition zone (mm) | | | | | | |
| <i>Streptococcus</i> sp. | 25 | 23 | 25 | 21 | 27 | 30 | 22 |
| <i>E. tarda</i> | 18 | 30 | 23 | 18 | 22 | 30 | 20 |
| <i>V. pelagius</i> | 20 | 30 | 24 | 19 | 20 | 30 | 35 |
| <i>V. campbelli</i> | 25 | 25 | 25 | 22 | 25 | 28 | 35 |
| <i>V. alginolyticus</i> | 25 | 21 | 20 | 19 | 24 | 30 | 20 |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 30 | 20 | 19 | 19 | 25 | 28 | 18 |
| <i>V. mimicus</i> | 32 | 22 | 24 | 20 | 25 | 31 | 20 |
| <i>V. anguillarum</i> | 30 | 22 | 20 | 21 | 28 | 30 | 15 |
| <i>V. harvey</i> | 32 | 24 | 21 | 20 | 30 | 27 | 20 |
| <i>V. vulnificus</i> | 24 | 20 | 20 | 16 | 26 | 26 | 18 |

Superoxide radical (O₂⁻) scavenging ability

Pyrogallol은 수용액에서 자동산화가 빠르게 일어나는데 여기에는 superoxide가 관여한다고 알려져 있다. 그러므로 SOD (superoxide dismutase)나 SOD 유사활성물질이 존재하는 경우 이의 자동산화가 억제될 수 있고, 이 억제되는 정도를 비교하여 실험대상의 물질의 효능을 비교한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 항균활성, 라디칼 소거활성의 결과와 마찬가지로 superoxide radical 소거능 역시 *Sparassic crispa* 균사 배양 추출물에서 70% 이상의 높은 효소활성을 보였다. 또한 *Hericicum erinacium*, *Lentinus edodes*, *Inonotus obliquus*, *Sparassic crispa*, *Phellinus linteus* 배양 추출물은 합성항산화제인 BHA보다도 높은 효소활성이 관찰되었으며, 대부분이 합성배지 배양 추출물에서 높은 활성을 보였으며, 감귤농축액 첨가 배지에서는 *Inonotus obliquus* 배양 추출물에서 높은 효소활성이 관찰되었다.

Superoxide radical은 호기적 대사기관에서 여러 가지 생화학적 반응으로 생성되며, 주로 세포막 지질의 불포화 지방산과 반응하여 지질 과산화물을 생성하므로 세포손상을 초래한다고 알려져 있다. 생체는 이러한 지질 과산화에 대한 반응체로서 SOD에 의하여 superoxide radical을 H₂O₂로 바꾸며, 다시 H₂O₂는 catalase와 glutathion peroxidase의 작용에 의해 H₂O로 환원되므로 이들 효소계의 반응에 의해서 자유 라디칼로부터 생체를 보호할 수 있다(20). 실제로 일본의 Niwa 등(21)은 새로운 산화 방지제를 발굴하고 임상실험을 통하여 효능을 평가하고 식품을 개발하여 상품화하였고, 이들의 활성산소의 시발물질이라고 할 수 있는 superoxide anion을 scavenging 함으로써 생체에 실질적으로 상해를 유발하는 hydroxyl radical과 과산화수소의 생성을 억제하여 유용한 생리활성을 나타낸다고 보고하였다. 이는 산화 방지제의 일종으로 SOD와 작용 기작은 다르지만 인체 내에서의 역할이 유사하여 통상적으로 SOD 유사활성 물질이라고 불린다.

요 약

9종류의 버섯 균사체를 희석 감귤농축액과 일반 합성배지에서 각각 배양한 배양물을 에탄올 추출하고 여과하여 동결건조 후, 얻어진 버섯균사체 배양 추출물에 대한 항균활성과 항산화 활성을 조사하였다. 일반합성배지 균사체 배양 추출물에서의 항균활성은 *Sparassic crispa* > *Coriolus versicolor* > *Phellinus linteus* > *Agaricus blazei* > *Hericicum erinacium* 순으로 높은 활성이 관찰되었으며, 반면 감귤농축액 첨가배지에서의 버섯균사체 배양 추출물의 항균활성은 일반 합성배지에서의 거의 유사한 결과를 얻을 수 있었는데, 전체적인 항균활성을 비교해 보았을 때, 항균활성이 조금 증가한 양상의 결과를 얻을 수 있었다. DPPH 전자공여능을 이용한 항산화 활성 실험에서는 전 실험 처리구에서 농도가 높아질수록 항산화력이 증가하였으며, 특히 *Sparassic crispa* 균사체 배양 추출물인 경우에 1 mg/ml의 낮은 농도에서도 80%에 가까운 radical 소거 활성을 보였으며, 모든 실험구에서 5 mg/ml 이상의 농도에서는 40% 이상의 라디칼 소거활성능이 관찰되었

다. Superoxide radical 소거능 역시 *Sparassic crispa* 균사 배양 추출물에서 70% 이상의 높은 효소활성을 보였다. 또한 *Hericicum erinacium*, *Lentinus edodes*, *Inonotus obliquus*, *Sparassic crispa*, *Phellinus linteus* 배양 추출물은 합성항산화제인 BHA보다도 높은 효소활성이 관찰되었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 기존 항생제와 합성항산화제를 대체할 수 있는 천연항산화제의 개발가능성을 확인할 수 있었다. 또한 천연배지로 사용된 감귤농축액을 이용하여 세균의 배양에 충분히 이용될 수 있음을 확인하였으며, 값비싼 일반 합성배지를 대체 할 천연물질로의 가능성을 확인하였다.

감 사

본 연구는 2005년도 산업자원부의 지역산업기술개발사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim, S. J., D. K. Lim, C. W. Park, R. M. Cerbo, S. W. Hyung, K. K. Lee, J. O. Kim, and Y. L. Ha (2004), Inhibition of free radical-induced lipid oxidation by the extract from submerged-liquid culture of mushrooms in the medium containing mulberry tree powders, *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* **33**(2), 255-261.
- Lee, H. W., D. W. Lee, H. C. Ha, I. C. Jung, and J. S. Lee (2002), Antioxidant activities of the mycelium and culture broth of *Phellinus igniarius* and *Agrocybe cylindracea*, *The Korean J. Mycology* **30**, 37-43.
- Kim, D. H., B. K. Yang, S. C. Jeong, J. B. Park, S. P. Cho, S. Das, J. W. Yun, and C. H. Song (2001), Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnol. Lett.* **23**, 513-517.
- Muraoka, S. and T. Shinozawa (2000), Effective production of amanitins by two-step cultivation of the basidiomycete, *Galerina fasciculata* GF-060, *J. Biosci. Bioeng.* **89**(1), 73-76.
- Ng, T. B. (1998), A review for research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor*, *General Pharmacology* **30**, 1-4.
- Ota, S. S. (1984), *Lentinus edodes*, *New Food Industry* **26**, 49-54.
- Yanmaguchi, M. and Yearul K. A. (1987), Effect of shitake and maitake mushroom on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats, *J. Nutr Sci Vitaminol.* **33**, 341-345.
- Kim, S. W. (1998), Studies of anti-microbial and anti-cancer functions of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*, *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* **27**, 1183-1188.
- Park, M. H., K. Y. Oh, and B. W. Lee (1998), Anti-cancer activity of *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*, *Kor. J. Food. Sci. Tech.* **30**, 702-708.
- Kim, G. J., H. S. Kim, and S. Y. Chung (1992), Effect of varied mushroom on lipid compositions in dietary hypercholesterolemic rats, *J. Korean. Soc. Food. Nutr.* **21**, 131-135.
- Lee, J. W. and K. W. Bang (2001), Biological activity of *Phellinus spp.*, *Food Industry and Nutrition* **6**, 25-33.
- Koh, J. S. and S. H. Kim (1995), Physicochemical properties and chemical compositions of Citrus Fruits Produced in Cheju, *Agric. Chem. Biotechnol.* **38**, 541-545.
- Lee, S. J., S. H. Moon, T. Kim, J. Y. Kim, J. S. Seo, D. S. Kim, J. Kim, Y. J. Kim, and Y. I. Park (2003), Anticancer and

- antioxidant activities of *Coriolus versicolor* culture extracts cultivated in the citrus extracts, *Kor. J. Microbial. Biotechnol.* **31(4)**, 362-367.
14. Song, E. Y., Y. H. Choi, K. H. Kang, and J. S. Koh (1998), Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of Cheju Citrus Fruits according to harvest date, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**, 306-312.
 15. Bios, M. S. (1958), Antioxidant determination by the used of a stable free radical, *Nature* **26**, 1199-1200.
 16. Chung, Y. C., C. T. Chang, W. W. Chao, and S. T. Chou (2002), Antioxidative activity and safety of the 50% ethanol extract from red bean fermented *Bacillus subtilis* IMR-NK 1, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2454-2458.
 17. Eugene F., Roth, Jr., and Harriet S. Gilbert (1983), The pyrogallol assay for superoxide dismutase: absence in glutathione artifact, *Anal Biochem.* **137**, 50-53.
 18. Stefan Marklund and Gudrun Marklund (1974), Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.
 19. Kim, A. K. and J. H. Kim (2001), Alterations of antioxidant enzymes in response to oxidative stress and antioxidants, *J. Applied pharmacology* **9**, 249-257.
 20. Kim, S. W., S. O. Lee, and T. H. Lee (1991), Purification and characterization of superoxide dismutase from *Aerobacter aerogenes*, *Agric. Biol. Chem.* **55**, 101-108.
 21. Masayuki, N., H. Koichi, K. Yutaka, K. Masako, and H. Masao (2004), p38 Mapk associated with stereoselective priming by grepafloxacin on O_2^- production in neutrophils, *Free radical Biology Medicine* **36**, 1259-1269.