

초음파와 극초단파를 이용한 송이버섯의 추출법과 다당체에 관한 연구

유승현 · 정명수 · 김혜자 · 이기남*

원광대학교 한의과대학 예방의학교실

Studies on the Extraction Method and Polysaccharide of Tricholoma matsutake using the Supersonic wave and Microwave

Seung Hyun Yu, Myong Soo Chong, Hae Ja Kim, Ki Nam Lee*

Department of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

In order to optimize the extract condition and improve physiological activity of the extract form Tricholoma matsutake, experiments related to extraction methods, totale yield, content of total soluble polysaccharide, SOD-like activity, total polyphenol amount, and volatile flavor compound and the others were carried out, results were obtained as following: Compare with traditional hydrothermal extraction method (Hot water extraction : HWEW), it illustrates that the low temperature extraction method which combines a supersonic waves and microwave (Supersonic microwave extraction : SMEW) causes of increasing the total yield, total soluble polysaccharide. As to the anti-oxident effect, SMEW method leads to increasing of the SOD-like activity, total polyphenol amount as well. Also, cytotoxic effect and growth inhibitory effect against cancer cell line are much higher in SMEW method than HWEW method, especially SMEW5 extracts treated by supersonic 15 min. and microwave 120W, 3 min. and 2 times. The main volatile flavor compound and infinitesimal volatile flavor compound both increase significantly by SMEW method. It is concluded the main components of the volatile flavor compounds extracted from Tricholoma matsutake are 1-octen-3-ol, Methyl cinnamate, 2-octeno1 et al. alcohol types. Consequently, SMEW5 method is considered as the most effective one for anti-oxidant and is prior to any other methods. And the optimun conditions of this method are : supersonic waves (supersonic, 25KHz, 50W) 15 minutes, microwave spectroscopy (microwave, 2,450MHz, 120W) 3 minutes, and every treatment is performed once followed twice repeats.

Key words : Tricholoma matsutake, polysaccharide, hot water extraction(HWE), supersonic microwave extraction(SME)

서 론

송이버섯(Tricholoma matsutake)은 담자균아문(Basidiomycotina) 주름버섯목(Agaricales) 송이버섯과(Tricomatacea)에 속하며 맛과 향 그리고 약리성분이 탁월한 식용버섯으로 한국, 중국, 일본 등에서 소나무 등 침엽수림에 자생하고 있다¹⁾.

송이의 약리적 효능에 대하여는 송이버섯에 함유된 β -glucan 다당체(Polysaccharide) 성분이 항종양, 면역강화 기능이

있는 것으로 알려져 있고²⁾ <本草綱目>³⁾에서는 맛은 달고 성질은 평하며 독이 없다고 하였고, 益胃腸, 理氣止痛, 化痰, 強身의 효능이 있으며, <菌譜>^{4,5)}에서는 소변혼탁과 失禁을 치료한다고 하였으며, <東醫寶鑑>⁶⁾에서는 性이 평하고 味가甘하며, 無毒하고 매우 향기롭고 솔냄새가 난다고 하였으며, 胃의 기능을 돕고 식욕을 증진시키며 설사를 멎게 하고 氣를 더해준다고 하였다.

송이버섯에는 탄수화물, 섬유질, 비타민 B2와 니아신⁷⁾이 비교적 많이 포함되어 있으며 다른 버섯류와 같이 ergosterol도 많이 포함되어 있다⁷⁾. 특히 송이에 함유되어 있는 약리적 성분인 β -glucan 등 다당류, 1-octen-3-ol, Methyl cinnamate, 2-octeno1, Octyl alcohol 3-methyl-butanol 등 향기 성분⁸⁾, Ergosterol 등 steroid 성분⁹⁾ 등은 수용성이고 열에 민감하며 분자량이 많아 새

* 교신저자 : 이기남, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : kinam1@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6836

· 접수 : 2007/10/17 · 채택 : 2007/11/19

로운 추출법 수립이 요구되고 있다.

본 연구에서는 고온 용매 추출법, 환류냉각추출법, 유기용매 추출법 등 전통적인 추출법이 수율이 낮고 열변성이 있으며 추출용매의 소요량이 많고 비용이 많이 드는 점 등의 단점을 보완하기 위하여 초음파(Supersonic wave)와 마이크로파(Microwave)를 활용하여 새로운 추출법을 연구 실험하였다.

초음파의 세포파쇄 기능¹⁰⁾과 마이크로파 에너지의 물분자 운동 활성화¹¹⁾를 이용하여 유용성분을 저온에서 효과적으로 추출하고 체내 흡수율과 이용률을 높일 수 있으며 추출 수율을 상승시킬 수 있는 최적의 추출조건을 탐색하고 추출액의 총수율 및 β -glucan 등 유용성분의 SOD 활성능을 다당류를 중심으로 실험하였다.

그리고 NaOCl 등에 의한 다당류의 산화로 인해 mainchain의 화학적 분해가 일어나 분자량이 감소된다는 보고¹²⁾와 SOD 유사활성 물질이 superoxide의 반응성 억제에 관한 김 등¹³⁾의 보고, 비타민 C의 SOD 유사활성에 관한 김 등¹⁴⁾의 보고를 참조하여 송이버섯 추출물의 항산화 효과에 대한 SOD-like activity를 실험하였다. 또한 페놀성 화합물이 항산화 효과가 있다고 한 안 등¹⁵⁾의 보고와 연계하여 송이버섯 추출물의 페놀성 화합물과 단백질의 항산화 기능을 실험하였으며, 송이버섯 추출물의 항산화 성분 및 다당체에 의한 대식세포 활성화에 따른 NO 생성능과 MTT assay에서 HT1080에 대한 암세포 저해율, IC50 값 등 생리활성에 대한 기능성을 실험한 결과 본 연구에 의한 송이버섯 추출물의 항산화 항암 활성 효과에 있어 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용한 송이버섯은 경북 울진에서 채취된 2006년 산 2등급 제품을 냉동상태로 현지에서 구입하여 -20℃에서 냉동보관하여 사용하였다. 시료는 정선, 수세하여 해동시킨 후 2~3 mm 크기로 절단하여 65℃에서 열풍 건조하고 분쇄기(Hanil, Korea, 500 W)를 이용하여 60mesh로 분쇄하여 -20℃에 보관하며 실험하였다.

2. 방법

1) 추출방법

본 연구에 사용된 열수추출기는 대웅(Korea, DWG-11000R) 제품이고, 초음파기는 Branson (USA 3510 EDTH) 제품으로 실험하였다. 그리고 마이크로파 추출장치는 2,450MHz 주파수의 상압추출기(Microdigest unit, Prolabo, France)로 강도(W)와 시간조절이 가능하였다.

초음파와 마이크로파 병행추출물과 비교하기 위하여 열수추출을 동시에 실험하였으며 초음파와 마이크로파 병행추출방법을 SME (Supersonic wave- microwave extraction)라 명명하고, 열수추출방법을 HWE (Hot water extraction)라 명명하였다.

HWE 방법은 1회 추출하였으며 SME 방법은 초음파와 마이

크로파의 실행 조건에 따라 12회 추출하여 최적 추출 조건을 규명하였다. 각각의 추출 조건에 따른 추출물은 여과(120mesh)하여 원심분리기(Sigma, USA)로 7,500 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

이 때 사용한 용매는 추출 유용성분의 특성을 고려하여 증류수만을 사용하여 실험하였다.

2) 추출액 제조

HWE와 SME의 추출 조건에 있어 용매비율은 동일 조건으로 하고 추출온도는 HWE는 전통적인 방법을 참조하여 70℃~100℃로 추출하였고 SME는 40℃~60℃로 추출하였다.

HWE의 제조는 송이버섯 분쇄시료 6 g에 90 ml의 증류수를 가하여 100℃에서 30분간, 그리고 70℃에서 1시간 동안 추출하여 여과(Whatman NO. 2)하고 원심분리(7,500 rpm, 30분)하여 상등액을 취하고 HWEW라 명명하였다.

SME는 HWE와 동일한 조건으로 송이버섯 분쇄시료 6 g에 90 ml의 증류수를 가하여 초음파와 마이크로파 추출을 병행하였다. 초음파와 마이크로파 추출을 위한 실험조건은 15분간 초음파 추출을 한 후 3분간 마이크로파 추출을 병행하여 추출하였으며 이를 1회, 2회, 3회 반복하면서 실험하였다. 이 때 마이크로파 에너지는 60 W와 120 W로 분리하여 실험하였으며, 추출 시간은 18분(1회), 36분(2회), 54분(3회)으로 하였다. 초음파와 마이크로파 병행추출한 각각의 추출액을 여과한 후 원심분리하여 상등액을 취하고 각각의 시료를 SMEW 1~6으로 명명하였다.

HWEW와 SMEW 제조방법을 도식화하여 Fig. 1에 나타내었다.

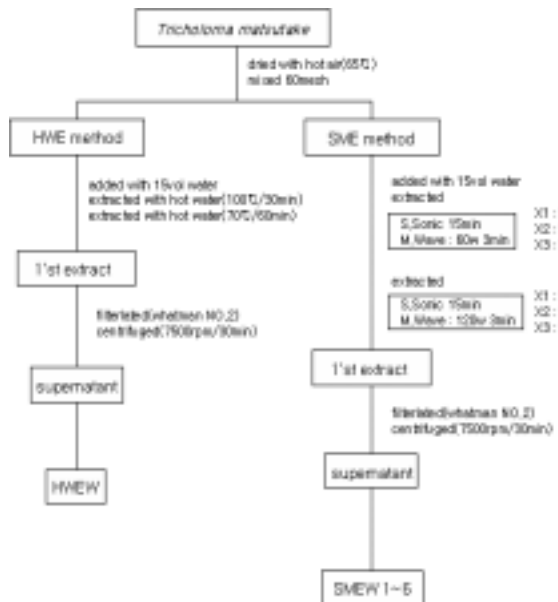


Fig. 1. Extraction Method of the Tricholoma matsutake

3) 추출물

각각의 추출방법에 의한 HWEW와 SMEW 1~6을 rotary vacuum evaporator (Sanyo, Japan)을 사용하여 감압농축시킨 후 동결건조(Eyela, FDU 540, Japan)하여 가용성 고형분 무게를 측정하여 추출액 조제에 사용한 건물량에 대한 수율(%)로 나타내었다.

4) 수용성 조다당체의 분리

각각의 추출방법에 의한 HWEW와 SMEW 1~6을 에탄올 침전 방법으로 4℃에서 24시간 동안 침전시켜 20분간 원심분리 (Sigma, USA, 7,500 rpm)하여 분리된 침전물에 5%의 증류수를 가하여 용해시킨 후 105℃에서 에탄올을 증류시키고 한외여과막으로 여과하여 동결건조한 후 고형분 무게를 측정하여 수용성 조다당체의 함량으로 환산하였다. 수용성 조다당체의 함량측정 과정을 도식화하여 Fig. 2에 나타내었다.

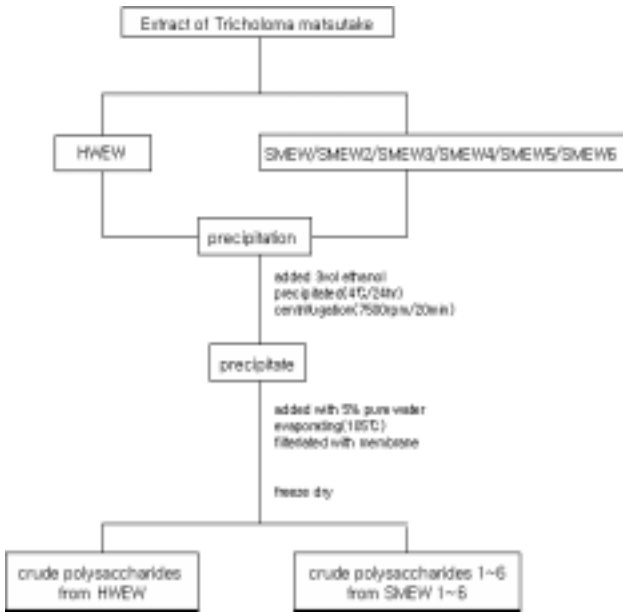


Fig. 2. Extraction of the Crude Polysaccharide from the Extract of the Tricholoma matsutake

5) SOD 유사활성(SOD-like Activity)

HWEW와 SMEW의 SOD 유사활성은 H₂O₂로 전환시키는 반응의 촉매 pyrogallol의 생성량을 측정하여 나타내었다. HWEW와 SMEW6 0.2 ml에 pH8.5로 보정한 tri-HCl buffer (50 mM tri[hydroxymethyl] amino-methane +10 mM EDTA, pH 8.5) 3 ml과 7.2 mM pyrogallol 0.2 mM을 첨가하여 25℃에서 10분 반응시킨 후 1NHCl 1 ml을 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며 SOD 유사활성은 병도의 공식에 의하여 나타내었다.

$$\text{SOD-like activity(\%)} = 100 - (\text{solution without extracts} / \text{solution with extracts} \times 100)$$

6) 총 폴리페놀 함량

HWEW와 SMEW의 총폴리페놀 함량은 각각의 시료 5 ml에 Folin reagent 5 ml을 가하고 3분간 정치시킨 후 5 ml의 10% Na₂CO₃를 가하여 1시간 동안 실온에서 정치한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 증류수를 사용하였으며 (+)catechin을 사용하여 검량곡선으로부터 시료의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

7) 향기 성분의 분석

HWEW와 SMEW의 향기성분은Purge and trap system인

Tekmar LSC 2000(Tekmar, USA)를 사용하여GC/MSD로 분석하였다. HWEW와 SMEW 각각의 시료 10 g을 시료병(55 mm O.D.×120 mm)에 질소로 purging하면서 향기성분을 추출하였고 이 때 mount, bottom value와 line의 온도는 100℃로 하고 stand-by 온도는 30℃ 이하로 하였다.

Purge gas는 질소를 사용하였고 30psi 질소를 분당 100ml 속도로 30분간 실시하여 60~80mesh tenax GC가 충전된 흡착관에 향기성분을 흡착시키고 dry purge를 3분간 실시하여 수분을 제거하였다.

흡착관을 50℃로 예비 가열하여 향기성분을 탈착시키고 180℃에서 3분간 가열 탈착을 실시한 후 250℃에서 30분간 작용시켜 비흡착 물질을 제거하였다. 이 때 GC는 HP 5890, column은 DB-5-fused silica capillary column (60x0.32 mm I.D.), 이동상은 헬륨가스로 1.2 mL/min, oven 온도는 50℃에서 3분간 유지시킨 후 분당 2℃씩 230℃까지 올린 후 10분간 유지시켰다. 그리고 GC/MSD는 HP 5973, scan range는 50~500amu, interface/source/quad는 280℃/150℃/65℃로 하였고 다른 조건은 GC와 동일하게 설정하였으며 분석된 chromatogram은 Wiley spectrum과 비교 확인하였다.

8) Nitric Oxide 생성

대식세포주(Raw264.7)를 10% fetal bovine serum(FBS)와 streptomycin 및 penicillin(100 ug/100 unit)을 포함하는 dulbecco's modified eagle medium (DMEM)에서 배양하여 사용하였다.

Nitrite 측정은 griss 반응을 이용하여 cytokine에 의한 Raw264.7 세포가 발생하는 nitrite의 농도를 측정하였다. Raw 264.7 세포를 hemocytometer를 이용하여 5×10⁶ cell/ml, 12well 에 1 ml 씩 분주하여 37℃, 5% CO₂에서 2시간 배양한 후에 비부착성 대식세포를 제거하고 다시 시료(HWEW와 SMEW1~6, 100 ug/ml)를 포함한 배지 1.5ml을 각각 첨가하여 37℃, 5% CO₂에서 24시간 배양하였다. 상등액 100 ul을 취하여 96well에 넣고 griss reagent (1% sulfanilamide/ 0.1% naphthylene diamine dihydrochloride/ 2.5% H₃PO₄) 100 ul을 넣고 15분간 20℃에 방치한 후 540 nm에서 microplate reader(ELISA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Positive control은 lipopolysaccharide(LPS)를 사용하였다.

9) 항암활성 측정

송이버섯 추출물의 항암활성 측정을 위하여 섬유성육종암세포 (HT 1080, fibrosarcoma, human)을 10% fetal bovine serum (FBS)와 100unit/mL penicillin/streptomycin을 함유한 RPMI1640 medium에서 37℃, 5% CO₂에서 배양하여 사용하였다.

시료의 항암활성 효과는 MTT Assay로 수행하였다. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 분석은 세포의 생육 및 분화를 측정하는 방법으로서 이 실험은 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase 가 황색 수용성 물질인 MTT에 의해 dark blue formazan을 생성하는 점을 기초로 한 것이다. 배양한 HT1080세포를 10% fetal bovine serum을 함유한 RPMI 1640 배지(100 unit/mL penicillin/ streptomycin)를 5X10⁴ cell/ml 농도로 각각의 well에

100 ml씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양시킨 후 시료 HWEW와 SMEW 1~6을 1.0 mg/ml의 농도로 100 ul씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 여기에 MTT (5 ug/5 ul) 용액을 20 ul씩 첨가하여 48시간 배양시켜 formazan을 형성시킨 후 aspirator로 상등액을 제거시켰다. 그리고 DMSO(dimethyl sulfoxide) 150 ul를 첨가하여 formazan을 녹인 후 540nm에서 microplate reader (ELISA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Control은 phosphate buffered saline 20ul을 분주하여 사용하였다.

Growth inhibition rate(%) = (Control absorbance- Experimental absorbance/Control absorbance)×100

10) 통계처리

본 연구의 실험 결과들은 SPSS를 이용하여 각 군의 평균과 표준편차를 산출하고 시료간의 차이 검증은 One-way ANOVA를 사용하였고, Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였으며, 모든 값은 mean standard deviation 값으로 표기하였다.

결과 및 고찰

1. HWEW와 SMEW 1~6의 추출물 및 수용성 다당체의 함량

HWEW와 SMEW 1~6의 추출물과 수용성 다당체의 함량을 측정한 결과 Table 1에 나타난 바와 같이 HWEW의 추출물보다 SMEW1~6의 추출물이 대체로 높았고, 특히 SMEW6의 추출물이 각 시료간에 가장 큰 유의적인 차이(P<0.05)를 보였다. 또한 수용성 다당체의 함량에서는 SMEW5가 가장 큰 유의적인 차이를 보였으며, SMEW5의 추출함량 이상 높아지지 않는 것으로 나타났는데 이는 초음파와 마이크로파의 추출방법에 있어서 다당체 등 유용성분은 수용성으로 세포파쇄가 용이하게 진행된다면 60°C~70°C 이하의 온도에서 추출이 완료되는 것으로 판단된다.

Table 1. Extraction Yield and Total Soluble Polysaccharide of Tricholoma matsutake

Sampe	Extraction Yield (w/w%) ¹⁾	Total Soluble Polysaccharide(w/w%) ²⁾
HWEW ³⁾	2.70 ± 0.02 ^{10d,*}	1.83 ± 0.02 ^c
SMEW1 ⁴⁾	2.64 ± 0.01 ^d	1.17 ± 0.05 ^d
SMEW2 ⁵⁾	3.57 ± 0.07 ^c	1.74 ± 0.10 ^c
SMEW3 ⁶⁾	3.76 ± 0.05 ^c	1.80 ± 0.05 ^c
SMEW4 ⁷⁾	4.13 ± 0.08 ^b	2.16 ± 0.07 ^b
SMEW5 ⁸⁾	4.24 ± 0.03 ^b	2.27 ± 0.02 ^a
SMEW6 ⁹⁾	5.33 ± 0.28 ^a	2.23 ± 0.02 ^{ab}

1) g Soluble solid/100g dry matter, 2) g Soluble crude polysaccharide/100g dry matter, 3) Hot water extraction method 1.5hrs, 4) Supersonic 15min and microwave 60W 3min × 1times, 5) Supersonic 15min and microwave 60W 3min × 2times, 6) Supersonic 15min and microwave 60W 3min × 3times, 7) Supersonic 15min and microwave 120W 3min × 1times, 8) Supersonic 15min and microwave 120W 3min × 2times, 9) Supersonic 15min and microwave 120W 3min × 3times, 10) All data were represented as mean SEM of three independent experiments., * :a~d Different superscripts in the table indicate significant difference at the p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

2. SOD 유사활성

SOD는 Reactive Oxygen Species(ROS, 활성산소)에 대한 저항기작에 관여하는 항산화 효소의 일종으로 강한 독성을 갖는 Superoxide radical anion(O₂⁻)을 Hydrogen peroxide (H₂O₂)와 산소로 바꾸어 주어 세포를 보호하는 물질로 SOD노화, 퇴행성 뇌

질환, 심혈관계 질환 등 각종 질병과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다¹⁶⁾. 이러한 SOD 활성에 대하여 pyrogallol을 이용한 SOD 유사 활성능을 HWEW와 SMEW 1~6에서 측정한 결과를 Table 2에 나타내었다. HWEW와 SMEW 1~6의 모든 추출물에서 SOD 활성 유사능이 있었으며 각 시료간에 유의적인 차이를 보였고, 초음파와 마이크로파 병행추출 시료간에도 처리 조건에 따라 유의적인 차이(P<0.05)가 나타났으며, 특히 SMEW 5,6에서 다른 시료보다 큰 유의적인 차이를 보여 각각 약 19.86%와 19.20%로 높은 활성 유사능을 보였다.

따라서 송이버섯의 초음파와 마이크로파 병행추출물 중에서 SMEW5,6이 SOD 유사 활성능이 뛰어난 것을 확인할 수 있었으며 아울러 항산화 유도 능력도 높을 것으로 판단된다.

Table 2. SOD-like Activity of Extracts from HWEW and SMEW1~6

Sample	Conc(mg/ml)	SOD-like Activity(%)
HWEW	1	11.59 ± 0.07 ^{11*}
SMEW1	1	15.70 ± 0.17 ^e
SMEW2	1	16.02 ± 0.18 ^{de}
SMEW3	1	16.33 ± 0.09 ^d
SMEW4	1	17.66 ± 0.53 ^c
SMEW5	1	19.86 ± 0.56 ^b
SMEW6	1	19.20 ± 0.32 ^b

1) All data were represented as mean SEM of three independent experiments. * :a~f Different superscripts in the table indicate significant difference at the p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

3. 총 폴리페놀 함량

HWEW와 SMEW 1~6의 총 폴리페놀 함량은 Table 3과 같았다. 폴리페놀 함량은 SOD 유사 활성능 실험 결과와 유사한 경향으로 나타나고 있는 데, 이는 SOD 정제시 열안정성이 뛰어나고 SOD와 유사한 활성을 나타내는 물질을 함께 정제하여 이를 SOD와 결합된 페놀류라고 Nice 등¹⁷⁾이 보고한 데서도 알 수 있듯이 폴리페놀이 유사 활성 물질들과 결합하여 있기 때문으로 판단된다.

Table 3. Total Polyphenol Amounts in HWEW and SMEW1~6

Sample	Conc(mg/ml)	Total polyphenol(mg%)
HWEW	1	486.33 ± 4.16 ^{10*}
SMEW1	1	488.67 ± 5.86 ^d
SMEW2	1	479.00 ± 6.56 ^d
SMEW3	1	562.00 ± 10.54 ^c
SMEW4	1	596.67 ± 4.73 ^{ab}
SMEW5	1	607.33 ± 21.55 ^a
SMEW6	1	582.67 ± 9.02 ^b

1) All data were represented as mean SEM of three independent experiments. * :a~d Different superscripts in the table indicate significant difference at the p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

HWEW, SMEW 1,2보다 SMEW 3~6 시료에서 높은 유의적인 차이를 보여 이들 군에서 약 562 mg%에서 607 mg%사이의 함량을 나타냈으며, 그 중에서 SMEW 5의 경우 607.33 mg%로 가장 높은 수치를 보였다.

이상에서 나타난 바와 같이 송이버섯 추출물 HWEW, SMEW 1~6의 폴리페놀 함량은 일반적으로 알려져 있는 팽이버섯 등의 폴리페놀 함량 3~4 mg%에 비해 상대적으로 월등히 높은 것으로 나타났으며¹⁸⁾ 아울러 항산화 효과도 클 것으로 판단되

며, SOD 유사 활성능에서와 마찬가지로 송이버섯을 최적조건의 초음파 및 마이크로파로 병행추출을 할 경우 항산화 효과는 더욱 더 높아질 것으로 보인다.

4. 휘발성 화합물의 향기성분 분석

HWEW와 SMEW1~6 시료군의 송이버섯 향기성분을 분석한 결과 Table 4와 같이 14종류의 성분이 분리, 동정되었으며, 동정된 휘발성 향기 성분은 1-octen-3-ol, Methyl cinnamate, 2-octeno1, Octyl alcohol 등이 주요 향기성분으로 분석되었다. 이러한 결과는 안 등¹⁹⁾이 보고한 향기성분의 분석과 유사한 경향을 보였다. 송이추출물인 HWEW와 SMEW1~6의 주요 향기성분은 alcohol류와 carbonyl 화합물이 주종인 것으로 판단되며, 저온추출 방법인 SMEW5, 6에서 1-octen-3-01의 함량이 높게 나타나고 있다. 특히 동정되지 않은 미량의 향기 성분은 SMEW5에서 높은 함량을 나타내고 있어 SMEW5의 경우가 최적 조건의 추출방법으로 판단되며 송이버섯 향기성분의 약리성분도 미량의 향기성분과 관련이 있을 것으로 사료되어 향후 이 부분에 대한 보완 실험이 필요할 것으로 판단된다.

Table 4. Volatile Flavor Compounds Identified in HWEW, SMEW1~6

Compounds(%)	HWEW	SMEW1	SMEW2	SMEW3	SMEW4	SMEW5	SMEW6
1-octen-3-ol	60.57	60.72	61.24	63.22	62.14	68.72	64.16
Methyl cinnamate	23.65	23.47	22.95	20.97	21.24	15.21	20.21
2-octeno1	8.52	8.82	8.80	8.72	9.15	8.24	8.72
Octyl alcohol	4.23	4.11	4.13	4.21	3.84	3.25	3.61
Benzen	0.12	-	0.21	-	0.24	-	0.22
Propyleneglycol	-	0.21	0.22	0.23	0.31	0.42	0.24
Ethyleneglycol	-	-	0.14	0.15	0.15	0.24	0.14
Linalool Oxide	0.24	0.22	-	0.21	0.23	0.22	0.26
1-octen-3-one	0.14	0.15	0.12	0.13	0.14	0.14	0.12
3-octano1	0.10	0.11	0.11	0.17	0.15	0.19	0.12
2-propanol	0.43	0.41	-	0.45	0.43	0.42	0.43
n-hexanal	0.14	0.15	0.17	0.14	0.18	0.14	0.15
3-octanone	0.22	0.23	0.24	0.22	0.25	0.23	0.24
Methyl hexanote	0.17	0.14	0.12	0.15	0.11	0.17	0.14
the others	1.47	1.26	1.55	1.03	1.44	2.41	1.24
Total	100	100	100	100	100	100	100

5. Nitric Oxide(NO) 생성

대식세포(Macrophage)는 골수에서 생성되어 혈관내에서는 백혈구의 일종인 단핵세포(단구) 형태로, 조직내에서는 대식세포로 존재하며, 항상성 유지와 세균에 대한 방어기능을 하는 것으로 알려져 있다. 그리고 대식세포는 T-cell에서 생성되는 Lymphokine에 의해 활성화 되어 Superoxide(O²⁻), Hydrogen peroxide(H₂O₂) 등의 반응산소 중간물질이나 NO와 같은 반응질소 중간물질을 생성하여 이물질을 분해시키고 Interlukin, Tumor necrosis fater 등의 Cytokin을 생산하여 종양세포구에 대한 세포특성을 나타내는 것으로 알려져 있다²⁰⁾.

NO는 Free radical 중의 하나로 산소에 의해 NO₂, N₂O₃, Nitrite(NO₂) 등의 Nitrogen oxide로 전환된다. 그리고 NO는 대식세포에 의한 식균작용 후에 Interferon 등에 의해 NOS(nitric oxide synthetase)가 산소와 반응하여 L-arginine을 산화시켜 생성되는 것으로 보고되고 있다²⁰⁾.

마우스 대식세포주인 Raw264.7에서 나타난 NO 생성능은 Table 5와 같다. Table 5에 나타난 바와 같이 NO 생성능에 있어서 SMEW5와 SMEW6은 각각 32.20 uM과 29.91 uM로 상대적으로 HWEW와 SMEW1~4에 비해 100 ug/ml의 농도에서 높은 수치를 보이고 있어 대식세포의 식균기능이나 세포수의 증가 등 생리활성 기능이 높을 것으로 판단되었다.

Table 5. Response Relationship for HWEW, SMEW1~6 on the Nitric Oxide Formation in Raw264.7 Cell Line

Sample	conc(ug/ml)	Nitric Oxide(uM)
HWEW	100	21.46 ± 0.75 ^{1)e*}
SMEW1	100	23.18 ± 0.48 ^d
SMEW2	100	23.84 ± 0.34 ^d
SMEW3	100	27.23 ± 0.88 ^c
SMEW4	100	28.06 ± 0.57 ^c
SMEW5	100	32.20 ± 0.31 ^a
SMEW6	100	29.91 ± 0.59 ^b

1) All data were represented as mean SEM of three independent experiments. * :a~eDifferent superscripts in the table indicate significant difference at the p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

6. 암세포 성장억제

송이버섯에는 β-glucan 등 기능성 다당체(polysaccharide)가 함유되어 있으며 특히 송이버섯의 단백질다당체(polysaccharide protein complex)는 각종 종양에 항암 활성이 높은 것으로 보고되고 있다. Ikekawa 등²¹⁾에 의해 버섯류의 항암효과는 말굽버섯(Polyporaceae)을 비롯한 식용버섯에 자체 추출물이 sarcoma180 등 동물이식 암에 항종양 활성이 있는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 암세포에 대한 세포독성을 실험하기 위해 HT1080(fibro sarcoma, human)을 이용하여 송이버섯 추출물 HWEW와 SMEW1~6에 대한 MTT assay를 실시하였다.

그 결과는 Table 6에 나타난 바와 같이 송이버섯 추출물 HWEW와 SMEW1~6에서 50.76%~64.84%의 암세포 성장 억제율을 나타내고 있으며 특히 SMEW5에서 64.19% ~ 65.72%의 강한 항암활성을 보이고 있다. 또한 HWEW와 SMEW1~6의 IC50 값을 측정한 결과는 Table 6과 같으며, 특히 SMEW5의 IC50 값은 310.26 ug/ml~311.14 ug/ml의 낮은 수치를 나타내고 있어 다른 실험군에 비해 상대적으로 P<0.05 수준에서 유의적인 차이로 항암활성이 높은 것으로 나타났다.

이상의 결과로 볼 때 SMEW5의 항암 활성율은 매우 높은 것으로 판단되었다.

Table 6. MTT Assay of the Extract for HWEW, SMEW1~6 against HT1080 Cell Line and IC50 Value

Sample	Growth Inhibition rate(%) (conc 1 mg/ml)	IC50(ug/mL)
HWEW	50.76± 1.38 ^{1)e*}	429.49 ± 1.38 ^{1)a*}
SMEW1	54.21± 1.01 ^d	425.18 ± 1.01 ^b
SMEW2	54.61± 0.90 ^d	412.23 ± 0.90 ^b
SMEW3	57.35± 1.43 ^c	409.64 ± 1.43 ^{bc}
SMEW4	57.83± 1.44 ^c	388.87 ± 1.44 ^c
SMEW5	64.84± 0.45 ^a	310.62 ± 0.45 ^e
SMEW6	60.84± 2.01 ^b	331.95 ± 2.01 ^d

1) All data were represented as mean SEM of three independent experiments. * :a~eDifferent superscripts in the table indicate significant difference at the p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

결 론

송이버섯 추출물의 추출방법의 최적 조건과 추출물의 생리활성을 확인하기 위하여 추출방법, 총수율, 수용성 다당체의 함량, SOD 활성능, 총 폴리페놀 함량, 향기성분 등을 분석 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

송이버섯의 추출방법은 전통적인 열수추출방법(HWEW)보다 초음파와 마이크로파를 이용한 저온 추출 방법(SMEW)에서 총수율은 2.72 mg/g에서 최대 5.65 mg/g로 증가되었으며, 다당체 함량도 1.85 w/w%에서 최대 2.25 w/w%로 증가된 것으로 나타나 본 연구의 초음파와 마이크로파를 이용한 병행 추출 방법이 효과가 우수함을 확인하였다. 송이버섯의 항산화 효과를 알아보기 위하여 수행한 SOD 활성능과 총 페놀성 화합물에 대한 실험결과를 보면, 전통의 열수추출방법보다 초음파와 마이크로파를 이용한 저온추출방법의 SOD 활성능은 11.52%에서 최대 20.12%로 높게 나타났으며, 총 페놀성 화합물은 491 mg%에서 최대 615 mg%로 증가하는 것을 확인할 수 있어서 송이버섯 추출물의 항산화 효과는 다른 버섯류(3~4 mg%)에 비해 우수한 것으로 나타났으며, 특히 초음파와 마이크로파를 이용한 저온추출방법이 더 우수함이 확인되었고 이 중 SMEW5(초음파 15분, 마이크로파 120W, 3분, 2회)에서 가장 항산화 효과가 클 것으로 판단된다. 송이버섯 추출물의 향기성분을 분석해 본 결과 송이버섯 향기의 주요성분은 1-octen-3-ol, Methyl cinnamate, 2-octenol 등의 alcohol류 이었으며, 극미량의 동정되지 않는 향기성분이 있음을 알 수 있었고, 특히 초음파와 마이크로파를 이용한 저온추출에서는 주요 향기성분과 극미량의 향기성분도 열수추출보다 유의하게 증가되는 것을 확인하였다. 송이버섯 추출물 중 SMEW5(초음파 15분, 마이크로파 120W, 3분, 2회)의 NO 생성능이 32.2±0.31 uM로 높게 나타나 각종 암세포에 대한 독성능이 강하고 대식세포의 식균작용을 활성화 시키는 것으로 판단되었다. 송이버섯 추출물의 단백질다당체에 의한 암세포 성장 저해율이 SMEW5(초음파 15분, 마이크로파 120W, 3분, 2회)에서 64.84±0.45%(HT10800 cell)로 가장 높고, IC50 값이 310.62±0.45 ug/ml로 상대적으로 낮은 값을 나타내고 있어 각종 항암활성 및 생리활성 기능이 강한 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. 강선철, 김민정. 식물류를 이용한 송이버섯의 저장성 향상. 생명과학연구 1(3):287-294, 2003.
2. 안장수, 이규환. 한국산 식용버섯의 무기성분 함량에 관한 연구. 한국식품위생안전성학회지 1(2):177-179, 1986.
3. 이시진. 본초강목. 북경, 화학출판사, p 1152, 1153, 1998.
4. 박완희, 이호득. 한국약용버섯도감. 서울, 교학사, p 240, 241, 1999.

5. 전통의학연구소. 동양의학대사전. 서울, 정보사, p 1200, 2000.
6. 허준. 동의보감. 서울, 남산당, p 719, 1987.
7. Ogawa, M. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake*(S. Ito et Imai) Sing. and its allied species. VII. *Tricholoma fulvocastaneum* Hongo in *Castanopsis cuspidata* forests. Trans Mycol Soc Japan, 19: 37-46, 1978.
8. 구경형, 조명희, 박완수. 송이버섯과 냉동송이버섯의 품질 및 향기 성분 특성. 한국식품과학회지 134(4):625-630, 2002.
9. 이위영, 안진권, 가강현, 권영진. 공기 부양식 생물반응기의 송이균사의 성장 특성 비교. 한국균학회지 3(2):89-93, 2003.
10. 정현식, 윤광섭. 전처리 방법에 따른 영지버섯 추출액의 품질 특성 변화. 한국식품저장유통학회지 12(2):130-134, 2005.
11. 권종호, 김경은. 상압조건의 마이크로파 공정과 현행방법에 의한 인삼근 유용 성분의 추출효율 비교 연구. 한국식품영양과학회지 28(3):586-592, 1999.
12. Ohno, N., Minura, T., Miura, N.N., Adachi, Y., Yadomae, T. Structure and biological activities of hypochlorite oxidized zymosan. Carbohydr, Polym., 44: 339-349, 2001.
13. 김현구, 한호석, 이기동, 김공환. 새송이버섯 추출물의 생리활성 효과. 한국식품영양과학회지 34(4):439-445, 2005.
14. Kim, S., Han, D., Park, M.H., Rhee, S. Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidant. Bio. Sci. Biotech. Biochem, 59: 822-826, 1995.
15. 안명수, 김현정, 서미숙. 새송이버섯(*Pleurotes eryngii*) 부위별 추출물의 이화학적 특성. 한국식생활문화학회지 21(3):297-302, 2006.
16. 이승은, 성낙술, 방진기, 박준근, 송진, 성경숙, 방경환. 한약재의 항산화 효과. 한국약용작물학회지(학술대회지) pp 203-204, 2001.
17. Nice, D., Robinson, D.S., Holden, M.A. Characterisation of a heat stable antioxidant co-purified with the superoxide dismutase activity from dried peas. Food Chem., 52: 393-397, 1995.
18. 양희천, 홍재식, 이태규, 손희숙. 송이버섯의 polyphenol oxidase에 관하여. 한국농화학회지 26(1):41-46, 1983.
19. 안장수, 이규환. 한국산 식용버섯의 향기성분에 관한 연구(1) -송이버섯의 향기 성분. 한국식품영양과학회지 15(3):253-257, 1986.
20. Bendtzen, K. Interleukin1, Interleukin6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. Immunol. letters 19: 183-192, 1988.
21. Ikekawa, T., Nakamishi, M., Uehara, N., Chihara, C., Fukuoka, F. Antitumor action of some basidiomycetes especially *phellinus*. Linteus Gann. 59: 155-157, 1968.