

흑목이 버섯 자실체의 흑갈색 색소 동정 및 특성

김현민 · 허원 · 이신영*
강원대학교 생물공학과

Isolation and Characterization of Dark Brownish Pigments from Fruit Body of *Auricularia auricula*

Hyeon-Min Kim, Won Hur, and Shin-Young Lee*

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University

Abstract

A dark brownish pigment from fruit body of *Auricularia auricula* was isolated and characterized in this report. The pigment was obtained with a yield of 0.61%(w/w) by alkaline extraction and subsequent purification steps. It showed the positive $FeCl_3$ test which was the indication of phenolic compounds. A synthetic melanin showed a similar spectrometric characteristics to the pigment extract regarding a characteristic UV absorption between 200-250 nm and infrared absorptions profiles in the finger print region including absorption peaks at 1701 and 1624 cm^{-1} . Its element analysis indicated that its atomic composition is close to that of DOPA melanin (eumelanin). With the result of its antioxidant activity in the TNBT (5-thio-2-nitrobenzoic acid) assay, we concluded that the dark brownish pigment from *A. auricula* is a melanin-like compound having a powerful antioxidative activity.

Key words: *Auricularia auricula*, melanin, pigment, antioxidative activity

서 론

버섯을 포함한 미생물이 생성하는 색소는 생존을 위한 방어물질로서 작용하며(Hunt & Fogel, 1983), 특히, 주로 흑곰팡이류에서 생성되는 흑색 색소인 melanin은 2차 대사 산물로서 극한 외부환경으로부터 개체를 보호하는 역할을 함이 잘 밝혀졌다(Mironenko et al., 2000).

이들 melanin은 페놀류(phenolic)와 인돌류(indolic) 성분의 산화적 축합반응으로 생성되는 고분자 색소이다(Liu & Simon, 2003). 동식물의 성장에 필수 성분은 아니지만, 극한 환경에서 외부 화학적 물질에 대한 저항성을 지녀 개체의 생존력을 강화시킨다(Bell & Wheeler, 1986). 특히, 자외선, 방사선 및 산화제에 안정성을 지니며, 중금속을 포착하는 산화환원 완충제(redox buffer)로서도 작용한다(Nosanchuk & Casadevall, 2003). 따라서 생물체 유래의 각종 천연 melanin은 항산화, 면역증진효과는 물론, AIDS 치료제로서의 응용 등 광범위한 연구의 대상이 되고 있다

(Tu et al., 2008; Montefiori & Zhou, 1991).

현재 천연 melanin 소재로는 검은 콩, 검은 깨, 해바라기 씨, 밤나무, 금목서(*Osmanthus fragrans*) 등의 식물이나 버섯과 같은 균류 유래의 것이 이용되고 있다(Nicolaus, 1968; Zhrebina et al., 1982; Xu et al., 2005; Wang et al., 2006). 이 중에서 균류 melanin은 버섯이 생육하면서 생성하는 색소 성분으로 세포벽과 세포막 사이에 위치하여 세포의 구조를 유지해 준다. 균류에 따라 다양한 종류의 melanin을 생성하는데, 자낭균류 및 불완전균류의 경우에는 1,8-dihydroxy naphthalene(DHN) melanin, 그리고 담자균류는 주로 L-dihydroxy phenylalanine(DOPA)이나 glutaminyl 1-3,4 dihydroxy benzene(GDHB) melanin을 합성한다(Elliott 1995; Bell & Wheeler 1986; Henson et al., 1999). 또, 이들 melanin의 종류는 생합성 경로의 차이에 따라 구별되어, DHN melanin은 polyketide 합성 경로를 이용하는 반면, 그 외의 melanin은 tyrosinase, laccase, catecholase 등의 phenoloxidase에 의해 합성된다(Joshua et al., 2003). 균사체 및 자실체는 이와 같이 합성된 melanin에 의해 흑갈색을 띄게 되며, 대표적인 버섯으로는 송로버섯, 느타리버섯, 차가버섯 등이 알려져 있다(Harki et al., 1997; Selvakumar et al., 2008; Babitskaya et al, 2000).

통상, 각종 유기체로부터 얻어지는 이들 색소성분은 그 기능과 사용목적에 따라 식품, 의류 및 화장품 산업의 각

Corresponding author: Shin-Young Lee, Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

Tel: +82-33-250-6273; Fax: +82-33-243-6350

E-mail: sylee@kangwon.ac.kr

Received October 1, 2009; revised November 10, 2009; accepted November 11, 2009

종 소재로서 광범위하게 이용되고 있다. 최근에는 적색 또는 흑색의 anthocyanin 및 tannin계 색소들이 신체 내 조절 효과를 나타내는 것으로 밝혀져 산업적 및 학술적 관심이 더욱 고조되고 있는 실정이다(Hsu & Guo, 2002). 특히, 흑색 색소의 경우는 그동안 상품가치의 하락 등을 이유로 제거되어야 하는 성분이었지만 점차 흑색성분의 강력한 항산화능이 밝혀짐으로써 흑미, 검은 콩, 검은 깨, 흑마늘 등의 식품이용에서 볼 수 있는 바와 같이, 오히려 흑색에 관심을 보이는 소비층이 늘어난 실정이다(Chung & Lee, 2003).

이와 관련하여 흑목이 버섯의 자실체는 흑갈색을 띠며, 오랫동안 식품소재로 널리 사용되어 왔지만 색소에 대한 연구는 별로 보고된 바가 없다.

따라서 흑색소 성분에 대한 관심의 고조 및 소비욕구의 증폭 등 향후 이 버섯의 산업적 이용의 확대나 용도를 개발하기 위해서는 이들 흑목이 버섯의 색소성분을 분리하여 색소성분의 규명과 더불어 그 효능 및 역할을 입증할 필요가 있는 것으로 생각되었다.

저자 등은 그동안 흑목이 버섯 자실체의 다당 추출, 정제과정에서 흑갈색 색소의 활성탄에 의한 흡착 및 용출특성을 연구하였으며, 이로부터 이 색소가 melanin-like 물질일 가능성이 유추되었다.

본 연구에서는 이러한 점에 착안하여 흑목이 버섯 자실체로부터 흑갈색 색소를 분리, 정제하고, 이 색소의 물리화학적 성질을 조사하여 동정하였으며, 아울러, 이의 항산화능을 TNB(5-thio-2-nitrobenzoic acid)법에 의해 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구의 재료는 건조된 흑목이 버섯이며, 중국 길림성 산의 것을 직접 구입한 것을 (주)화인코로부터 제공받아 사용하였다. 건조 시료는 분쇄기(Hanil Co., HMF-390, Incheon, Korea)로 분쇄하여 분말(100 mesh)화하여 desiccator에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

흑갈색 색소의 추출 및 정제

일반적으로 균류에서 생산되는 멜라닌 색소의 추출 및 정제 방법(Sava et al., 2001)을 다소 변형하여 Fig. 1과 같이 흑갈색 색소를 분리하였다. 즉, 건조 분말(100 mesh) 시료 50 g을 1 M KOH 용액 1 L 가 담긴 추출용기에 넣고, autoclave에서 100°C로 2시간 동안 추출하였다. 추출액을 10,000×g에서 10분 간 원심분리(Hanil Co., Super 25K, Incheon, Korea)하였으며, 상등액에 약 2배량의 2 N HCl (Dae Jung Chemical & Metal Co. Ltd., Seoul, Korea, 순도 35%) 용액을 가하여 pH 1.0-1.5가 되도록 하고, 침전된

용액을 원심 분리하여 산 침전물을 얻었다. 여기에 6 N HCl 용액 100 mL을 첨가한 후, autoclave에서 100°C로 2 시간 동안 처리하여 탄수화물 및 단백질을 제거하였다. 다시 에탄올(Dae Jung Chemical & Metal Co. Ltd, Seoul, Korea, 순도 95%) 및 클로로포름(Junsei Chemical Co. Ltd, Tokyo, Japan, 순도 99%)으로 지방 성분을 제거하였고, 2 N HCl 용액으로 재침전 시켰다. 침전물을 증류수를 가해 세척한 후, 동결 건조하여 흑갈색 색소(melanin-like pigment) 시료를 얻었다. 시료는 desiccator에 보관하면서 실험에 사용하였다.

화학적 정성 실험

Tomas(1955), Elinov et al.(1976) 및 Lyakh(1981)가 제시한 melanin의 여러 가지 화학적 특징에 대해 melanin-like pigment 와 synthetic dopa melanin으로 비교 실험하였다. 먼저, 용해성은 증류수, 3종의 유기용매(에탄올, 메탄올, 아세톤) 및 알칼리 용매에 시료를 1 mg/mL 농도로 첨가한 다음, 1시간 동안 녹였을 때 용액에 용해된 색소의 양을 분광광도계로 230 nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다.

H₂O₂ 산화제에 의한 산화반응은 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0)에 0.1%로 시료를 녹인 후, 10% H₂O₂를 첨가하여 24시간 동안 상온에서 방치한 후 탈색여부를 육안 관찰하였다. 또, K₂CrO₄ 산화제에 의한 산화반응은 0.1 N NaOH 용액에 0.01%로 시료를 녹인 후, 11 mmol/g K₂CrO₄를 첨가하여 상온에서 방치하였고, 역시 탈색여부를 육안 관찰하였다. 한편, 폴리페놀에 대한 침전반응은 앞에서와 동일한 조건에서 K₂CrO₄ 대신 0.5% FeCl₃를 첨가하여 침전여부를 육안 관찰하였다.

UV 스펙트럼 분석

얻어진 시료와 합성멜라닌(synthetic dopa melanin, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 0.1 M phosphate buffer(pH 8.0)에 녹인 후 분광광도계(UV-Vis spectrophotometer, Varian Cary1E, Sydney, Australia)로 200-600 nm에서 주사(scanning)하여 UV 흡수스펙트럼을 얻었다.

FT-IR 스펙트럼 분석

FT-IR(Fourier transformed infra red) spectra는 melanin-like pigment 와 synthetic dopa melanin을 각각 2 mg 함유한 KBr disc를 조제하고 3 cm⁻¹의 해상도로 Bio-Rad Model Excaliber Series(Bio Rad, Cambridge, USA) 기기를 사용하여 4,000-500 cm⁻¹ 범위로 실시하였다.

원소 분석(elemental analysis)

원소분석은 시료 및 합성멜라닌의 원소 함량(C, H, N, S 및 O)을 elemental analyzer(Fisons EA 1108, Milan, Italy)

를 사용하여 분석하였다.

항산화 활성의 측정(TNB method)

시료와 합성멜라닌(synthetic dopa melanin, Sigma Co., St Louis, MO, USA)의 항산화 활성은 Ching et al.(1994)이 보고한 비교적 간단하고 신속한 TNB 방법에 따라 측정하였다. 이 방법은 산화제(H_2O_2) 존재 하에서 TNB(5-thio-2-nitrobenzoic acid)의 산화를 억제시키는 scavenger의 억제능을 측정하는 것으로, TNB는 5 mM EDTA를 함유한 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.6)를 이용하여 1 mM DTNB (Sigma Co., St Louis, MO, USA) 용액을 만든 다음, 여기에 20 mM sodim borohydride를 첨가하고 37°C에서 30분 동안 방치하여 제조하였다. 합성된 TNB의 농도는 412 nm에서의 흡광도 값으로 계산하였으며, 농도계산에 사용된 흡광도 계수 ϵ 값은 13,600 mol/L·cm를 사용하였다(Wu et al., 2008).

산화제인 100 μ M H_2O_2 에 농도별(20-100 μ g/mL)로 준비된 시료와 합성멜라닌을 넣은 후 최종 부피가 1 mL이 되도록 30 μ M TNB를 넣어주었다. 이를 충분히 혼합한 후, 실온에서 15분 동안 반응시켰으며, 반응 후 남아있는 TNB의 양을 분광광도계로 412 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 또, TNB 산화의 억제효과에 대한 경시변화는 10, 15, 20 및 30분 반응 후의 잔존 TNB 함량을 측정하여 결정하였으며, 흰목이 및 흑목이 버섯의 부분정제 다당을 대조구로 사용하여 시료첨가 농도에 따른 잔존 TNB 함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

흑갈색 색소의 분리와 정제

흑목이의 자실체로부터 흑갈색 색소물질을 분리하기 위해 흑목이 버섯의 건조 자실체(100 mesh)에 3종의 유기 용매(아세톤, 에탄올, 메탄올) 및 4종의 알칼리 용매(수산화나트륨, 수산화칼륨, 탄산나트륨, 탄산칼륨)로 상온에서 1시간 동안 추출, 분리하였다. 자료화하지는 않았으나, 사용된 모든 유기용매에서는 색소의 추출이 없었으며, 강알칼리 용매(KOH, NaOH)에서는 흑갈색 성분의 추출이 육안으로 관찰되었다.

따라서 색소성분의 추출 용매로 강알칼리 용매인 1 M KOH를 선정하였으며, 100°C에서 2시간 동안 추출, 분리하였다. 또, 멜라닌은 산 용액에 불용성이므로 산 침전 및 산 가수분해하는 분리 및 정제 공정을 거친다(Harki et al., 1997). 따라서 2배량의 1, 2, 3, 4 및 5 N HCl를 이용하여 추출한 색소 추출액을 산에 의해 침전시켰으며, 그 결과, 역시 자료화하지는 않았으나 2 N HCl 용액에서 최대의 침전량을 보였다. 이때, 산 첨가 후 용액의 pH는 1.0-1.5 범위이었다. Sava et al.(2001)의 보고에 따라 최종적으로 단백질 및 지방을 제거하였다. 이와 같이 얻어진 시료를 정제색소로 하였고, 이들 과정의 개략도를 Fig. 1에 종합하여 나타내었다.

Fig. 1의 공정도에 따라 얻어진 정제된 색소물질의 수율은 약 0.61%이었으며, 이 값은 검은 깨로부터의 pure melanin 수율(0.34%)보다는 높았으나(Wang et al., 2006),

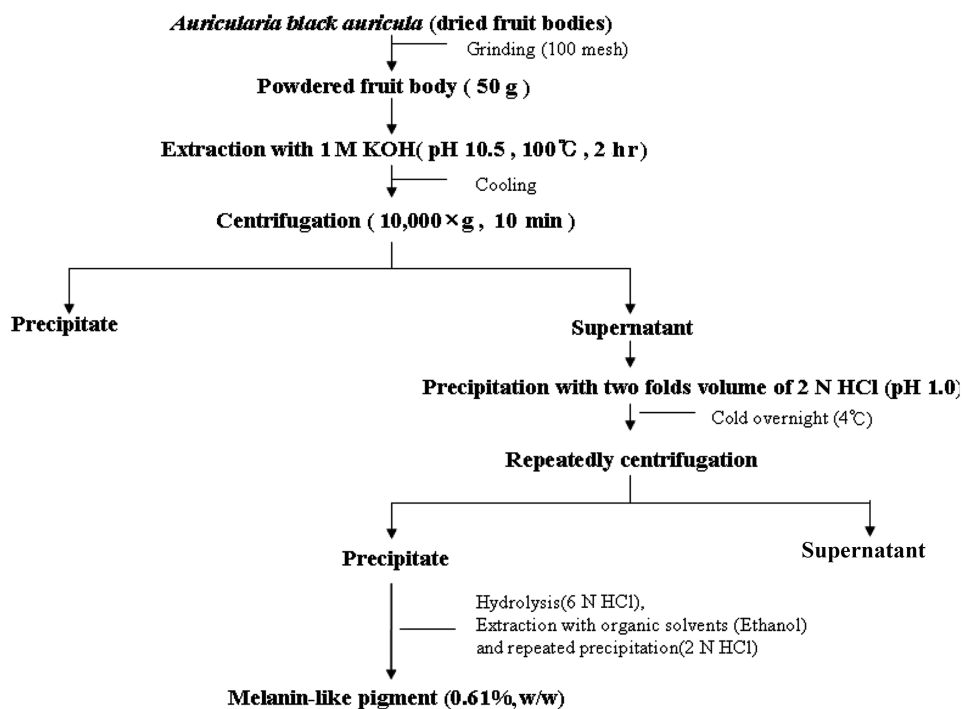


Fig. 1. Flow diagram for extracting the melanin-like pigment from fruit body of *Auricularia auricula*

Table 1. Diagnostic tests for *Auricularia auricula* and synthetic melanin

Tests	Melanin of <i>Auricularia auricula</i>	Synthetic DOPA melanin
Solubility in H ₂ O at 25°C	-	-
Solubility in organic solvents (ethanol, methanol, acetone, chloroform)	-	-
Solubility in 1 M KOH at 100°C	+	+
Reaction to oxidizing test		
- 10% H ₂ O ₂ (24 hr)	+	+
- K ₂ CrO ₄ 11 mmol/g	+	+
Precipitation by 2 N HCl	+ at pH 2.0	+ at pH 2.0
Reaction for polyphenols with FeCl ₃	+	+

+Positive response.
-Negative response.

차(tea)로부터 melanic pigment 수율(1.2-1.36%) 보다는 낮은 값 범위이었다(Sava et al., 2001). 지금까지 보고된 식물 및 미생물을 통해 얻어낸 melanin의 수율은 보통 0.34-2.97% 범위이다(Wang et al., 2006; Xu et al., 2005).

화학적 특성

Tomas(1955), Elinov et al.(1976), Lyakh(1981) 및 Casadevall et al.(2000)의 보고 사실을 토대로 화학적 표준 반응을 통해 용출된 색소 성분을 건조하고 얻어진 시료의 화학적 특성을 조사하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다.

시료는 증류수 및 유기용매에는 불용성이었으나, 1 M KOH(100°C) 용액에서는 용해되었다. 또, H₂O₂ 및 K₂CrO₄ 등의 산화제에 의해 탈색되어, 시료 용액 고유의 흑색은 무색 또는 녹색으로 변화됨을 관찰할 수 있었다. 또, 2 N HCl 용액을 첨가하여 pH 2.0 이하가 되면 시료용액으로부터 색소물질이 빠르게 침전됨이 확인되었다. 특히, FeCl₃의 반응에서는 적자색의 침전물이 관찰됨으로써 본 색소가 페놀 구조를 지니고 있는 것으로 판단되었으며, 실제로 폴리페놀 함량을 측정된 결과, 236.0±6.30 mg/g의 높은 폴리페놀 함량을 보였다. 이상의 결과로부터 시료는 페놀 구조를 지닌 멜라닌 유사 물질인 것으로 판단하였다(Casadevall et al., 2000).

UV 흡수 스펙트럼 분석

멜라닌은 고유한 UV 흡수 스펙트럼을 지니므로 시료의 멜라닌 유사물질여부를 보다 더 명확히 살펴보기 위해 합성 멜라닌을 비교구로 분광광도계를 이용하여 200-600 nm에서 주사하였고, 그 결과는 Fig. 2와 같다.

시료의 UV 흡수 스펙트럼은 파장이 증가할수록 흡광도 값이 거의 직선형(linear)으로 감소하였으며, UV 범위(200-250 nm)에서 강한 흡수를 보여 전형적인 균류 멜라닌과 잘 일치하였으며(Bell and Wheeler, 1986), 대조구인 합성멜라닌과도 매우 유사하였다.

한편, Daniel(1938)은 멜라닌의 특징으로 UV 스펙트럼 분석 시, 파장 vs. 흡광도 로그값(log absorbance) 그래프가

직선을 그리며, 기울기 값이 -0.0015와 -0.0030 범위의 음의 기울기 값을 지닌다 하였다(Chet et al., 1967; Ravishankar et al. 1995; Bartnicki-Garcia and Reyes, 1964).

본 시료의 경우도 Fig. 3에서 볼 수 있는 바와 같이 파장에 따라 흡광도의 대수 값을 도시하였을 때, 직선관계를 확인할 수 있었다. 또, 직선의 기울기 값은 합성멜라닌과

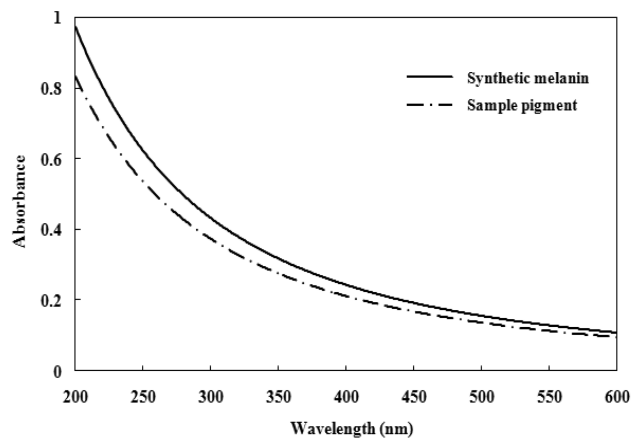


Fig. 2. UV spectra of sample pigment and synthetic melanin

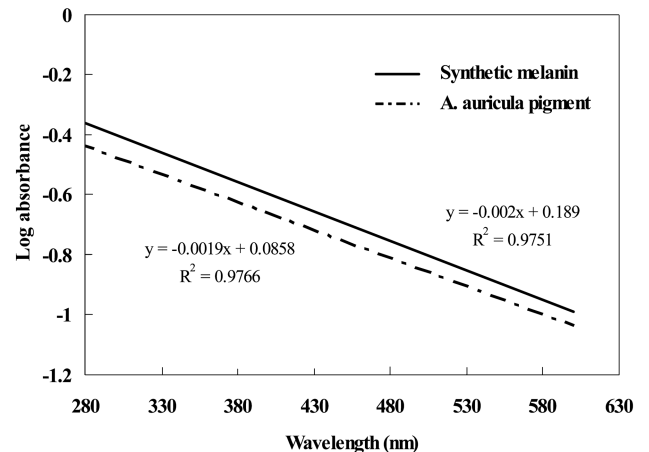


Fig. 3. A plot of log optical density against wavelength

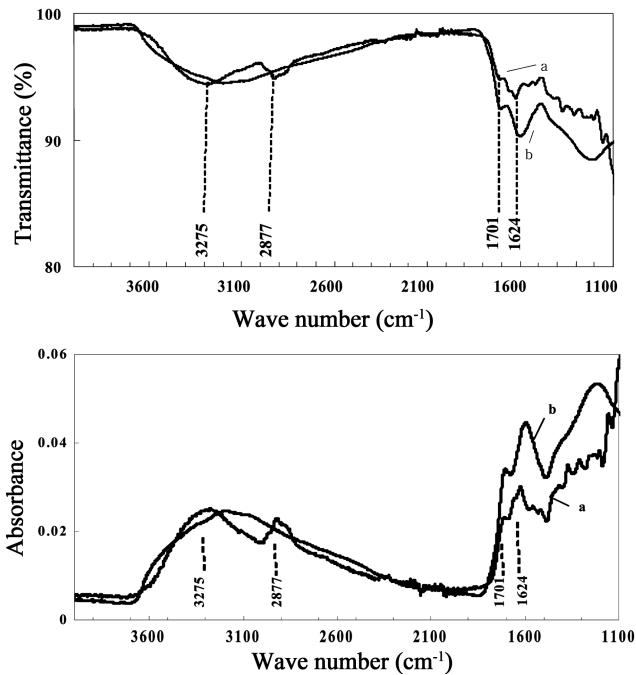


Fig. 4. Intra-red spectrum (transmittance and absorbance) of brownish black pigment from *Auricularia auricula* (a) and synthetic melanin (b)

시료에서 각각 -0.002 및 -0.0019로 거의 동일한 음의 기울기 값을 나타내었다. Ellis & Griffiths (1974)의 보고에 따르면, *Epicoccum nigrum*의 호분포자의 멜라닌은 -0.001의 기울기 값을 나타내며, Harki et al.(1997)는 *Tuber melanosporum*의 균사체에서 추출한 멜라닌이 -0.002의 기울기 값을 지닌다고 하였다.

본 시료의 기울기 값은 이들과 거의 일치하여 흑목이 버섯의 흑갈색 색소성분은 멜라닌 유사 색소임을 확인하였다.

FT-IR 흡수 스펙트럼 분석

멜라닌 유사물질로 유추되는 분리·정제된 색소에 대한 구조적 특성을 규명하기 위해 FT-IR 스펙트럼을 조사하였으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

그림에서 보는 바와 같이, -OH 기와 -NH₂ 기의 stretching 흡수피크가 수소결합에 의해 이동되어 나타나는 멜라닌의 특이적인 3,200-3,400 cm⁻¹에서의 강한 흡수(Bilinska, 1996)와 C-H stretching 진동이 일어나는 2900 cm⁻¹ 부근에서의 흡수가 관찰되었다. 또, aromatic C=C, C=O 및 COO- 그룹을 포함하는 1620-1650 cm⁻¹ 부

근에서 강한 흡수를 보였고, 그 외 C=O 신축진동으로 고려되는 1700 cm⁻¹ 부근의 흡수가 관찰되었다(Filip et al., 1974; Schnitzer and Neyroud, 1975; Paim et al., 1990; Russell et al., 1983). 시료(a)와 대조구인 합성멜라닌(b)을 비교하였을 때, 합성멜라닌의 경우에는 C-H stretching 진동이 일어나지 않는 것을 제외하고는 유사한 peak 값을 보였다. 본 시료의 이러한 IR 흡수 특성은 전형적인 균류 멜라닌의 보고된 특성과 잘 일치한다(Bilinska, 1996).

원소분석(elemental analysis)의 특성

분리·정제된 색소 시료에 대한 동정을 위해 원소 분석하였으며, 그 결과를 합성 멜라닌과 비교하여 Table 2에 나타내었다.

시료의 C, H, N 및 O는 각각 55.52, 5.72, 5.92 및 30.04%인 반면, 합성멜라닌의 C, H, N 및 O는 각각 49.61, 2.98, 6.59 및 38.28%로 시료간의 큰 차이를 보이지 않았다. 본 시료의 원소조성은 송로버섯(*Tuber melanosporum* Vitt)의 멜라닌(C: H: N: O=2.10: 4.20: 6.16: 28.31%)과 매우 유사하였지만(Harki et al., 1997) 양송이 버섯의 포자로 부터 분리해 낸 멜라닌(C: H: N: O=57.9: 3.8: 8.8: 0%)과는 차이를 보였다(Rast et al., 1981). 이들 송로버섯 및 양송이 포자의 멜라닌은 각각 DOPA 및 GHB melanin으로 알려져 있다(Harki et al., 1997; Rast et al. 1981). 따라서 시료는 DOPA 멜라닌인 것으로 볼 수 있었는데, 이는 두 시료 모두 S 원소를 함유하고 있지 않은 것과도 잘 일치한다. 일반적으로 멜라닌은 크게 pheomelanin과 eumelanin(DOPA melanin)으로 구분하는데, 전자는 높은 S 함량을 지니는 반면, 후자는 S 원소를 함유하지 않는 것으로 알려져 있다(Tu et al., 2008).

한편, 시료 색소의 각 원소의 비(C/H, C/N 및 O/C ratio)는 각각 0.81, 10.94 및 0.41인 반면, 합성 멜라닌의 경우는 1.39, 8.78 및 0.58로 시료간의 차이를 보였다. 특히, C/H ratio의 차이가 컸는데, 이는 Kukuljanskaya et al.(2002)에 의하면 천연색소에서 aromatic ring 구조의 함량이 높음을 의미한다. 따라서 시료 색소는 합성 멜라닌과 마찬가지로 eumelanin(DOPA melanin)이지만 aromatic ring 구조가 서로 다른 것으로 생각되었다.

TNB 법에 의한 항산화 활성

멜라닌은 ortho-이중수소화 구조의 방향족 중합체를 이루며, 환경적 스트레스에 의해 발생하는 유해 산소종을 제거

Table 2. Elemental composition analytical data of melanin

Samples	Mass (%)					Atomic ratio		
	C	H	N	O	S	C/H	C/N	O/C
Auricularia auricula pigment	55.52	5.72	5.92	30.04	0	0.81	10.94	0.41
Synthetic DOPA melanin	49.61	2.98	6.59	38.28	0	1.39	8.78	0.58

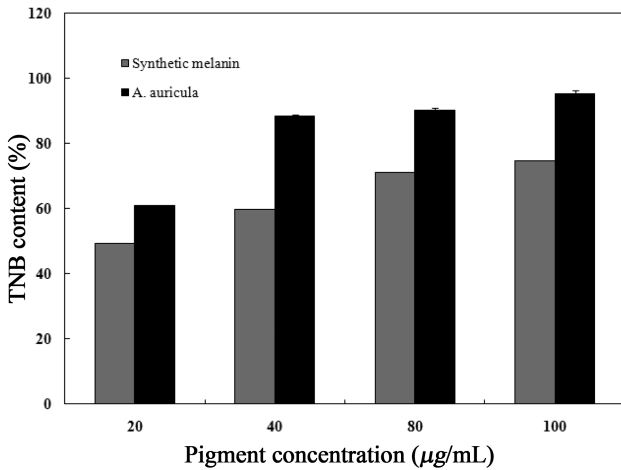


Fig. 5. Antioxidant activity of *A. auricula* pigment and synthetic dopa melanin at concentrations of 20, 40, 80, and 100 µg/mL in the presence of H₂O₂

하는 redox buffer로서의 역할을 수행한다(Bell & Wheeler, 1986). 따라서 유해 산소 종에 대한 생존율이 매우 높는데, 예로서 melanized *Cryptococcus neoformans* 세포의 경우 nonmelanized 세포에 비해서 산소와 질소의 자유 라디칼 존재 하에서 대략 10배의 생존율을 갖는 것으로 보고되었다(Nosanchuk & Casadevall, 2003).

따라서, ROS 라디칼에 민감한 TNB를 이용하여 항산화 활성을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 5과 같다. 이 결과는 TNB 용액을 기질로 하여 산화제인 H₂O₂에 대한 시료의 항산화능을 잔존 TNB 함량(%)으로 나타낸 것으로 비교대조구로는 합성멜라닌을 사용하였다.

그림에서 보는 바와 같이, 시료 첨가구의 항산화능은 20-100 µg/mL에서 농도의존적으로 증가하여, 20 µg/mL에서는 62%이었으나 40 µg/mL에서는 88%, 100 µg/mL에서는 95%로 증가하였다. 또, 시료 색소는 합성멜라닌에 비해 실험한 모든 농도 구간에서 항산화능의 더 높은 수준을 보였다. 특히, 시료 농도 100 µg/mL에서의 항산화능(95%)은 대응하는 농도의 *Aspergillus nidulans*로부터 추출한 멜라닌의 항산화능(35.3%)보다 매우 높은 값이며, *Hypoxyton archeri*로부터 동정된 멜라닌의 항산화능(80.95%)보다도 높은 값으로(Goncalves & Pombeiro-Sponchiado, 2005; Wu et al., 2008), 매우 우수한 항산화능을 갖는 특징을 보였다.

또한, 시간 경과에 따른 항산화능의 변화는 Fig. 6과 같다. 시료를 넣지 않고 증류수를 넣은 대조군에서는 10분만에 3.0221 mmol/L·min 속도로 빠르게 TNB 함량이 급격히 감소하여 거의 0에 도달하였다. 하지만, 시료를 첨가한 군에서는 10분까지 0.0882 mmol/L·min 속도로 거의 TNB 함량이 유지되다가 10-20분 사이에 0.6324 mmol/L·min의 속도로 감소되었다. 다시 20-30분 사이에 완만한 감소(0.2426 mmol/L·min)가 일어나 30분 이후에는 일정한 TNB 함량을 나타내었으며, 이때의 항산화능은 66.67%이었다. 반

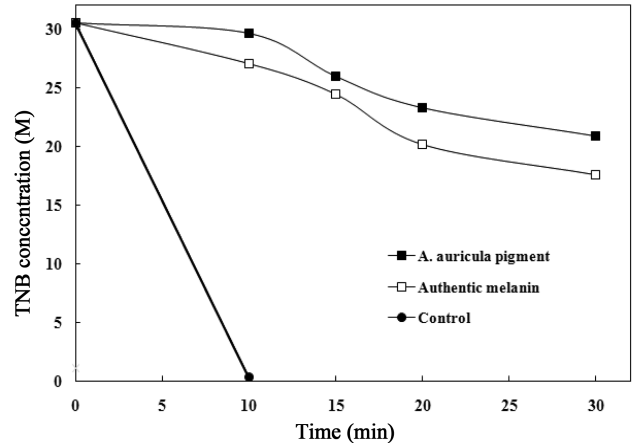


Fig. 6. Dynamic curves of TNB consumption in the presence of 100 µg/mL *A. auricula* pigment and synthetic dopa melanin in H₂O₂

면, 합성멜라닌의 경우에는 TNB 함량이 10분 까지 0.3456 mmol/L·min 속도로 완만히 감소되다가 10-20분 사이에 시료와 비슷한 속도(0.6912 mmol/L·min)로 감소하여 20-30분 사이에 다시 0.2574 mmol/L·min 속도로 완만해져 30분 이후 일정한 값을 유지하며 56.67%의 항산화능을 나타내었다. 따라서 본 시료는 TNB에 대해 장시간의 항산화능을 나타내는 높은 안정성을 지니는 것으로 생각되었다.

결론

흑목이 버섯의 자실체로부터 1 M KOH의 알칼리 용액의 추출 및 2 N HCl 용액의 침전을 통해 색소물질을 얻었다. 이때의 수율은 0.61%이었다. 색소물질은 산화제(H₂O₂)에 의한 색 변화(흑색→무색), 산에 의한 침전반응, 유기용매에 대한 불용성 및 알칼리용매에 대한 용해성 등으로 melanin과 동일한 화학특성을 지녔으며, FeCl₃에 대한 적자색 침전반응에 의거 페놀구조를 갖는 것으로 나타났다. 또, 시료의 UV 흡수 스펙트럼은 UV 영역(200-250 nm)에서 강한 흡수를 보이며, wavelength vs. log absorbance 그래프의 기울기 값이 음의 값인 -0.0019를 나타내어 전형적인 melanin의 UV 흡수 스펙트럼 특성을 보였다. 아울러, IR 스펙트럼에서는 -OH 및 -NH₂의 3,275 cm⁻¹ peak 및 aromatic C=C, C=O 및 COO- 그룹을 포함하는 1620-1650 cm⁻¹ 부근에서 강한 흡수를 보여 균류 melanin과 동일한 특성을 보였다. 원소분석 결과, C, H, O 및 N이 각각 55.52, 5.72, 30.04 및 5.92%로 나타났고, S의 함량이 나타나지 않아 시료색소는 eumelanin인 것으로 확인되었다. 한편, 시료의 TNB를 이용한 항산화 실험결과, 시료 농도 100 µg/mL에서 95%의 매우 높은 항산화능을 보였으며, 비교적 장시간 동안 항산화능이 유지되어 30분 경과 후에도 66.67%의 항산화능을 보이는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술재단에서 시행한 지역혁신인력양성사업(2007~2010)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Babitskaya VG, Shcherba VV, Ikonnikova NV. 2000. Melanin complex of the fungus *Inonotus obliquus*. Appl. Biochem. Microbiol. 36: 322-381.
- Bell AA, Wheeler MH. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. Annu. Rev. Phytopath. 24: 411-451.
- Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Curr. Opin. Microbiol. 3: 354-358.
- Ching TL, Jong J, Bast A. 1994. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid application to anti-asthmatic drugs. Anal. Biochem. 218: 377-381.
- Chung YA, Lee JK. 2003. Antioxidative properties of phenolic compounds extracted from black rice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 948-951.
- Daniel J. 1938. Studies on multiple allelomorphous series in the house mouse. A spectrophotometric study of mouse melanin. J. Genet. 36: 139-143.
- Elinov NP, Yurlova NA. 1976. Melanin pigment in *Aureobasidium pullulans* Arnaud. Chem. Natur. Compounds 13: 216-221.
- Elliott ML. 1995. Effect of melanin biosynthesis inhibiting compounds on *Gaeumannomyces* species. Mycologia 87: 370-374.
- Filip Z, Haider K, Beutelspacher H, Martin JP. 1974. Comparison of IR spectra from melanins of microscopic soil fungi, humic acids and model phenol polymers. Geoderma. 11: 37-52.
- Goncalves RC, Pombeiro-Sponchiado SR. 2005. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. Biol. Pharm. Bull. 28: 1129-1131.
- Harki E, Talou T, Dargent R. 1997. Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt. Food Chem. 58: 69-73.
- Henson JM, Butler MJ, Day AW. 1999. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 37: 447-471.
- Hsu Y, Guo L. 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. Toxicology 180: 33-44.
- Hunt G, Fogel R. 1983. Fungal hyphal dynamics in a western oregon douglas-fir stand. Soil Biol Biochem. 15: 641-649.
- Kim HM, Hur W, Lim KB, Lee SY. 2009. Adsorption characteristic of dark brownish coloured compounds from the hot water extract of *Auricularia auricula* fruit body. Food Eng. Prog. 13:138-146.
- Liu Y, Simon JD. 2003. Isolation and biophysical studies of natural eumelanins: applications of imaging technologies and ultrafast spectroscopy. Pigment Cell Res. 16: 606-618.
- Lyakh SP. 1981. Microbial melaninogenesis and its function. Moscow, Science. Pub p. 274.
- Mironenko NV, Alekhina IA, Zhdanova NN, Bulat SA. 2000. Intraspecific variation in gamma-radiation resistance and genomic structure in the filamentous fungus *Alternaria alternata*: a case study of strains inhabiting Chernobyl reactor, 4. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45: 177-187.
- Montefiori DC and Zhou JY. 1991. Selective antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopa melanin against human immunodeficiency virus *in vitro*. Antiviral Res. 15: 11-25.
- Nicolaus R. 1968. Melanins. In: Chemistry of Natural Products, Series. Lederer E(ed.). Hermann Press, Paris, France, pp.1-305.
- Nosanchuk JD and Casadevall A. 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cellular Microbiol. 5: 203-223.
- Paim S, Linhares LF, Magrich AS, Martin JP. 1990. Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy. Biol. Fertil. Soils 10: 72-76.
- Russell JD, Vaughan D, Jones D, Fraser AR. 1983. An IR spectroscopic study of soil humic and its relationship to other soil humic substances and fungal pigments. Geoderma. 29: 1-12.
- Sava VM, Galkin BN, Hong MY, Yang PC, Huang GS. 2001. A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immuno-stimulating activity. Food Res. Int. 34: 337-343.
- Schnitzer M, Neyroud JA. 1975. Further investigations on the chemistry of fungal 'humic acids'. Soil. Biol. Biochem. 7: 365-371.
- Selvakumar P, Rajasekar S, Periasamy K, Raaman N. 2008. Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus*. World J. Microbiol. Biotech. 24: 2125-2131.
- Tomas M. 1955. Melanins. Modern Methods of Plant Analysis. 661. Paech K, Tracey MV, Eds. Springer. Berlin, Germany.
- Tu YG, Sun YZ, Tian YG, Xie MY, Chen J. 2008. Physicochemical characterisation and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe Black-bone silky fowl. Food Chem. 111: 745-749.
- Wang H, Pan Y, Tang X, Huang Z. 2006. Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans* seeds. LWT 39: 496-502.
- Wu Y, Shan L, Yang S, Ma A. 2008. Identification and antioxidant activity of melanin isolated from *Hypoxylon archeri*, a companion fungus of *Tremella fuciformis*. J. Basic Microbiol. 48: 217-221.
- Xu J, Chen S, Hu Q. 2005. Antioxidant activity of brown pigment and extracts from black sesame seed. Food Chem. 91: 79-83.
- Zherebin YL, Makan SY, Sava VM, Bogatsky AV. 1982. Process producing of water-soluble melanin. SU Patent 939446.