

흰목이와 흑목이 버섯의 다당추출 및 유리라디칼 소거활성 비교

김현민 · 허원 · 이신영*

강원대학교 생물공학과

Polysaccharide Extraction and Comparison of Free Radical Scavenging Activities from *Tremella fuciformis* and *Auricularia auricula* Fruit Body

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

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University

Abstract

The polysaccharides from fruit body of *Auricularia auricula* and *Tremella fuciformis* were extracted using hot water, and partially purified through ethanol precipitation and dialysis. Free radical scavenging activities of the crude and purified polysaccharides were examined and compared each other. Free radical scavenging activities of the partially purified polysaccharides were higher than those of crude polysaccharides. DPPH free radical, ABTS radical and SOD-like activities of partially purified polysaccharide at 1 mg/mL of concentration from *A. auricula* were 61.7, 9.6 and 38.9%, respectively, while those of *T. fuciformis* were 9.6, 5.7 and 15.3%, respectively. Results of site and non-site specific hydroxyl radical scavenging activities indicated that the partially purified polysaccharide fractions from *A. auricula* and *T. fuciformis* exhibited the hydroxyl radical scavenging effect by hydrogen donating ability and iron ion chelating ability. Also, reducing powers of *A. auricula* and *T. fuciformis* were 77.1 and 14.7% of BHT (0.1%) as standard, respectively. It was suggested that antioxidant activities of *A. auricula* were about 1.4~6.4 times higher than those of *T. fuciformis* due to different levels of polyphenol content.

Key words: *A. auricula*, *T. fuciformis*, crude and purified polysaccharide, free radical scavenging activity

서 론

생명체는 산화과정을 통해서 생물학적 공정의 연료인 에너지를 생산하며, 이러한 산화대사계는 항산화제 방어계, 내재적 및 외부 환경인자를 포함한 몇몇 기작에 의해 활성산소종(Reactive oxygen species; ROS)을 생산하게 된다(Mau et al., 2002).

ROS는 유리라디칼 및 일중항산소(1O_2), superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등 다양한 형태의 활성화된 산소로, 생명체의 항상성 유지기작을 통해 조절된다(Hallowell & Gutteridge 1990; Yazdanparast & Ardestani, 2007). 하지만 노화 및 산화적 스트레스로 조절능이 불안정화되면 ROS의 양이 많아져 막지질의 산화, 세포단백질의 변성, DNA 사슬의 개열 및 세포기능의 파괴를 유발하게 되며, 결국, 노화의 촉진 및 각종 성인병을 발

병시켜 인간의 수명을 단축시키는 것으로 잘 알려져 있다(Aruoma, 1998; Ames et al., 1993; Cerutti, 1985; Moskovitz et al., 2002).

일반적으로 항산화제는 산화과정에서 유리라디칼 및 활성산소종의 발생 그 자체를 억제하는 예방적 항산화 물질(preventive antioxidant)과 발생한 라디칼을 포착하는 연쇄절단형 항산화물질(chain breaking antioxidant)의 2종으로 나뉜다. 전자로서는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase와 같은 효소계의 항산화물질 등이 있으며, 후자의 형으로는 페놀계 항산화물질이나 아민류, thiol 류 등이 있다(Chaudiere & Ferrari-Iliou, 1999; Fridovich, 1999; Jung & Lee, 2007).

따라서 그동안 각종 천연물질 유래의 항산화 관련 연구가 활발히 진행되어 왔는데, 다당류의 경우도 강력한 항산화 활성을 지니며 잠재적인 신규 항산화제로서 탐색될 수 있음이 알려졌다. 그동안 곰팡이, 세균, 조류 및 식물유래의 각종 다당에 대한 항산화활성이 보고되었고, 다당의 각종 항산화활성 기작은 주로 강력한 수소공여능, 금속 킬레이팅능 및 H_2O_2 나 $\cdot OOH$ 의 소거능에 기인하는 것으로 보고되었다(Sun et al., 2004; Kodali & Sen, 2008; Liu et al., 2007; Wang et al., 2008; Kong et al., 2010).

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

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

E-mail: sylee@kangwon.ac.kr

Received September 6, 2010; revised December 30, 2010; accepted December 31, 2010

버섯의 경우도 잎새버섯, 영지, 운지, 치마버섯, 잔나비버섯, 차가버섯, 흰목이 등 각종 버섯의 자실체, 균사체 및 배양액의 다당에 대해 항산화활성의 연구가 진행되었다(Liu et al., 1997; Lee et al., 2003; Tseng et al., 2008; Chen et al., 2010; De Bruijn et al., 2009).

한편, 최근에 와서 다당체를 중심으로 한 버섯의 추출물은 항산화활성은 물론, 피부노화, 보습, 미백 등의 신소재로도 널리 응용되고 있으며, 각종 기능성 화장품으로의 활발한 응용도 전개되고 있고, 이의 산업적 생산체제도 점차 확대되고 있는 실정이다.

특히, 흰목이버섯(*Tremella fuciformis*)의 경우는 수분흡수능이 매우 뛰어난 점을 이용하여 고보습 화장품소재로서는 물론, 항당뇨, 항혈전효과 등으로 건강식품, 의약품소재로도 널리 이용되고 있다(Chen and Cai, 2008). 반면, 흰목이버섯과 유사한 흑목이버섯(*Auricularia auricula* 또는 *Hirneola auricula*)은 예로부터 중국요리에 가장 널리 사용되는 재료로, 한약재로서 각종 약리작용에 의한 민간요법제 및 여름철 음식의 변패방지소재 등의 다양한 용도로 이용되어 왔다(Kim and Kim, 1990; Kim, 1974; Yamanaka, 1968).

하지만 아직까지 흑목이버섯은 상대적으로 흰목이버섯에 비해 생리활성에 대한 연구가 적고 유효성분들에 대하여는 불분명한 점들이 많은 등 여러 측면에서 알려진 바가 미미하다. 특히, 흑목이와 흰목이 버섯의 유리라디칼 소거능이나 연쇄절단형 항산화물질로서의 항산화능을 비교한 보고는 없다.

이에 근거하여 본 연구에서는 버섯유래 기능성 제품화 연구의 일환으로, 지금까지 체계적으로 연구된 바 없는 흑목이와 흰목이버섯의 열수추출 및 정제에 의해 조다당 및 정제다당의 시료를 얻었으며, 이들의 항산화활성을 비교하여 시료간의 차이를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구의 재료는 2008년도 중국 길림성 산의 건조한 흑목이 및 흰목이버섯이며, 직접 구입하여 사용하였다. 건조 시료는 분쇄기(HMF-390, Hanil Co., Incheon, Korea)로 분쇄하여 분말(100 mesh)화하였고, desiccator에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

다당의 추출 및 정제

흰목이 및 흑목이버섯의 조다당(crude polysacchride)과 부분정제 다당(partially purified polysacchide)을 Kim et al. (2009)의 방법에 따라 Fig. 1에서와 같이 추출, 정제하여 조제하였다.

분쇄(100 mesh)한 건조자실체 분말(50 g)을 2L 용량의 추출용기에 넣고 증류수 1L를 가하여 하룻밤 방치하였다. 이

들을 95°C로 유지한 항온조에서 4 시간 동안 3 회 환류 추출하였다. 추출물을 실온으로 냉각하고 12,000×g에서 20 분간 원심분리(Super 25K, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Incheon, Korea)하여 추출액과 잔사로 분리하였다. 잔사는 마찬가지로 조작을 3회 반복하였고, 이들의 추출액을 합쳐서 회전진공농축기(N-N Series, Eyela Co., Tokyo, Japan)로 70°C에서 1/3 정도로 농축하였다. 여기에 농축액량의 3 배량 ethanol (순도 95%, Dae Jung Chemical & Metal Co. Ltd, Siheung, Korea)을 가한 다음 침전물 또는 spatular로 휘저어 감기는 gel-like 물질을 얻었으며, 이를 동결건조(0.5 torr, 24 hr, Ilshin Lab. Co. Ltd, Seoul, Korea,)하여 조다당(crude polysaccharide) 시료로 하였다. 한편, 조다당 시료를 증류수로 용해한 다음 2 일간 투석(M.W.C.O. 12,000, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)하였고, 이를 동결건조하여 부분정제 다당(purified polysaccharide)의 시료로 사용하였다. 모든 시료는 desiccator에 보관하면서 실험에 사용하였다.

DPPH radical 소거능의 측정

DPPH radical 소거능은 Blois(1958)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 시료 0.2 mL에 4×10^{-4} M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 용액 0.8 mL를 가하여 10초 동안 진탕하고 상온에서 10 분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 다음 식에서와 같이 계산하여 전자공여능(electron donating activity; EDA)의 백분율로 표시하였다.

$$EDA (\%) = (A - B/A) \times 100$$

여기서 A는 무첨가구의 흡광도이고, B는 시료 첨가구의 흡광도이다.

ABTS radical 소거능의 측정

ABTS radical 소거능은 Brand-Williams et al.(1995)의 방법으로 측정하였다. 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammounium salt (ABTS: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 증류수에 녹여 7 mM의 ABTS 용액을 만들고 potassium persulfate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가(660 µg/mL)한 후 잘 혼합하여 암소에 방치하였다. 24 시간 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.700 ± 0.05 가 되도록 에탄올(Special grade, Carlo Erba Reagenti Co. Ltd., Val de Reuli, France)로 희석하고, 농도별로 준비해 둔 시료 400 µL 당 희석한 ABTS 용액 3.6 mL를 넣고 1 분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음 식에 의해 ABTS radical 소거능을 계산하였다.

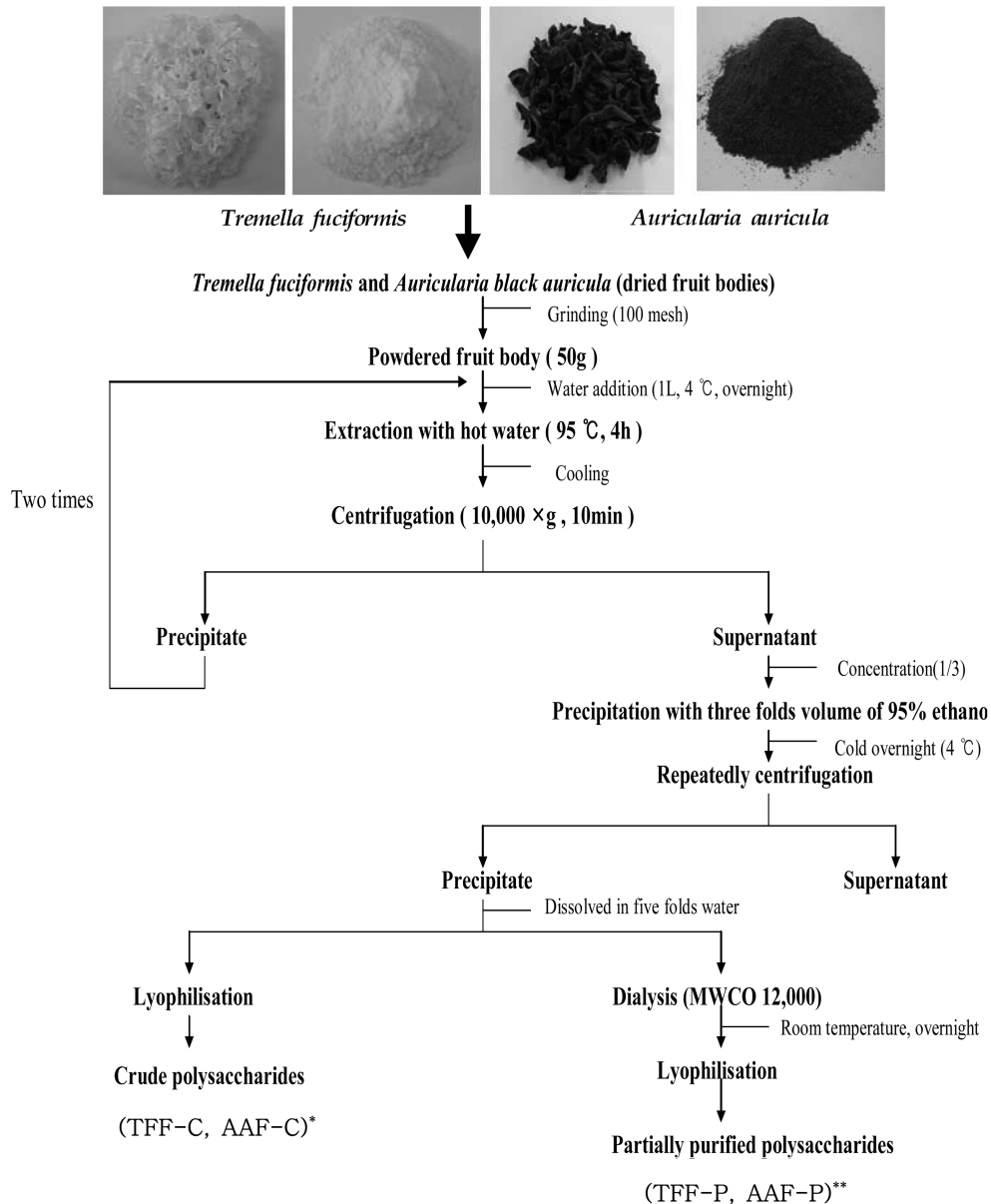


Fig. 1. Flow diagram for extraction of polysaccharides from fruit body of *Auricularia auricula* and *Tremella fuciformis*

* AAF-C and TFF-C : crude polysaccharides from fruits body of *A. auricula* and *T. fuciformis*, respectively.

** AAF-P and TFF-P: partially purified polysaccharides from fruits body of *A. auricula* and *T. fuciformis*, respectively.

$$\text{ABTS radical 소거능 (\%)} = (A - B/A) \times 100$$

SOD (Superoxide dismutase) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund & Marklund(1974)의 방법에 따라 과산화수소(H_2O_2)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzene)의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 일정 농도의 시료 10 μL 에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer (50 mM tris + 10 mM EDTA) 130 μL 과 7.2 mM pyrogallol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 10 μL 를 첨가하여 25°C에서 10 분간 반응 후, 1 N HCl 10 μL 를 가하여 반응을 정지시켰다. 반

응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성능 (\%)} = (A - B/A) \times 100$$

Non-site specific 및 site hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) 소거능의 측정

각 시료용액의 non-site specific hydroxyl radical($\text{OH}\cdot$)의 소거능은 Halliwell et al.(1987)의 방법을 변형하여 측정하였다. 여러 농도의 시료에 최종부피가 1 mL이 되도록 28 mM

deoxyribose, 14 mM hydrogen peroxide, 200 μM FeCl₃, 1 mM EDTA, 10 mM ascorbic acid, potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하였다. 혼합액을 섞고 37°C에서 1 시간 반응시킨 다음, 10%(w/w) TCA(trichloroacetic acid) 용액 1 mL을 가하여 반응을 중지시켰다. 여기에 1%(w/w)의 TBA(2-thiobarbituric acid) 용액을 첨가하여 100°C에서 15 분간 가열한 후 급냉하고, 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity(\%)} = (A - B/A) \times 100$$

여기서 A는 대조군의 흡광도, B는 시료 첨가군의 흡광도이다.

한편, site-specific OH· 소거능의 측정은 EDTA 대신에 동량의 potassium phosphate buffer를 넣어 준 다음, non-site specific 방법과 마찬가지로 방법으로 측정하였다.

환원력(reducing power)의 측정

시료의 환원력은 Oyaizu의 방법(1986)에 따라 반응물 내에 Fe³⁺/ferricyanide 복합체의 환원형인 ferrous 이온을 비색 정량 하였다.

각기 다른 농도의 시료용액 2.5 mL에 1% potassium ferricyanide 용액 2.5 mL을 넣고 0.2 M 인산완충액(pH 6.6)을 넣어 용량을 7.5 mL로 조정 한 후, 50°C에서 20 분간 반응시켰다. 10% trichloroacetic acid로 반응을 정지시키고 원심분리 후 상정액 5 mL을 취하여 탈이온수 5 mL을 혼합하였다. 이 혼합물에 0.1% ferric chloride 1 mL을 첨가하여 발색시키고 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

폴리페놀 및 다당 함량의 측정

폴리페놀에 대한 0.5% FeCl₃ 침전반응을 육안관찰 후 시료의 총페놀 함량(total phenolics content)을 Slinkard & Singleton(1977)의 방법에 따라 측정하였다. 10 mg/mL 농도로 시료 용액을 제조한 후, 시료용액 50 μL에 7.5% Na₂CO₃ 1.5 mL을 가하여 충분히 혼합하고 10% Folin-Ciocalteu 시약(Wako Chemical Co., Osaka, Japan) 1.5 mL을 가하여 상온에서 30분 동안 방치하고 분광광도계(Genesys 5, Milton Roy, NY, USA)로 765 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 총페놀 함량은 gallic acid (Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan)에 의한 표준곡선을 이용하여 polyphenol 함량을 산출하였다. 한편, 다당의 함량은 Ebarandu et al.(2005)의 비색법에 따라 glucomannan의 함량을 측정하였다. 즉, 400 μL의 시료를 1 회용 유리배양관에 옮기고, 각 관에 4 mL Congo red(sodium 4,4'-diphenyl- 2,2'-diazo-bis-1-naphthalamino-4-sulfonate(Showa Chemicals Inc., Tokyo, Japan) 시약을 첨가한 후 vortexing하여 혼합하였다. 이 혼합물을 실온에서 20 분간 방치한 후, 이의 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 이때, glucomannan의 함량은 동결건조하여 얻은 알로에 표준다당(aloe standard polysaccharide)을 사용한 표준곡

선으로부터 구하였다.

통계처리

본 실험의 모든 실험결과는 평균값과 표준편차로 나타내었고, 통계적 유의성은 1원 배치 ANOVA 실시 후, Duncan's multiple range test에 따라 p < 0.05 수준에서 유의차를 검증하였다. 모든 통계처리는 SAS 프로그램(SAS Institute, Cary, NC, USA)을 사용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

다당의 추출, 정제 및 시료 특성

분쇄한 건조 자실체의 열수 추출물을 에탄올로 재추출하여 얻은 조다당분획을 증류수에 용해한 후 다시 투석(MWCO = 12,000-14,000 Da)하고, 동결건조하여 부분 정제 다당을 얻었다(Fig. 1).

흰목이와 흑목이 조다당의 수율은 각각 약 40.7±1.1 및 38.6±0.9%이었고, 부분정제 다당은 각각 36.5±0.6 및 34.8±0.7%로 비슷한 수율을 보였다. 흰목이 다당은 백색인 반면, 흑목이 다당은 흑갈색이었으나 모두 수용성이었으며, 매우 높은 점성을 나타내었다. 또 흑목이 정제다당의 흑갈색 색택 강도는 조다당 분획보다 더 짙어지는 특징을 보였다. 이는 흑갈색의 색소성분이 투석내액에 잔존하기 때문이며 따라서 색소는 사용된 투석막의 배제분자량인 12,000 Da 이상의 분자량을 갖거나 다당 또는 단백질과 복합체를 형성하는 것으로 생각되었다(Kim et al., 2009).

한편, 흑목이 및 흰목이버섯의 추출다당은 모두 알로에다당과 유사한 glucomannan이며, GPC로 측정 한 두 다당의 분자량은 각각 약 439 및 455 kDa으로 비슷하였다(Kim et al., 2009). 두 버섯으로부터 추출한 조다당 및 부분정제 다당분획의 1%(w/v) 용액 중의 glucomannan 함량을 측정 한 결과, 흰목이의 경우 각각 417±17 및 1037±33 mg/L이었다. 반면, 흑목이의 경우는 각각 687±20 및 1070±36 mg/L로 두 버섯의 부분정제다당의 glucomannan 함량은 차이를 보이지 않았다.

DPPH 라디칼 및 ABTS radical 소거능

전자공여능은 지질과산화 반응의 연쇄반응에 관여하는 산화성 free radical에 전자를 제공하여 연쇄반응을 정지시키는 능력이다(Kim et al., 2002). 산화성 free radical은 인체 내에서 지질, 단백질 등과 결합하여 각종 질병 및 노화를 일으키는 척도가 되므로 free radical을 제거할 수 있는 항산화제를 찾으려는 연구가 이루어졌었다(Aruoma, 1998). 특히, DPPH 법은 항산화 물질의 전자공여능에 의해 방향족 화합물 및 방향족아민류에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는 정도를 나타내는 지표로, 항산화능을 나타내는 척도가 되므로, Fig. 2에 각 농도별(0.25-1.5 mg/mL)로 시료의 DPPH 라

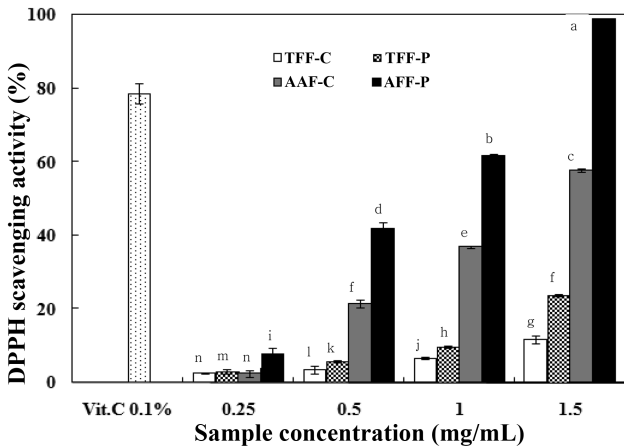


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activity of *T. fuciformis*, *A. auricula* polysaccharide and ascorbic acid (Vitamin C 0.1%) as the standard. (Each value was expressed as mean±standard deviation (n=3). Data with different letters are significantly different at $p < 0.05$. For symbol, refer to Fig. 1.)

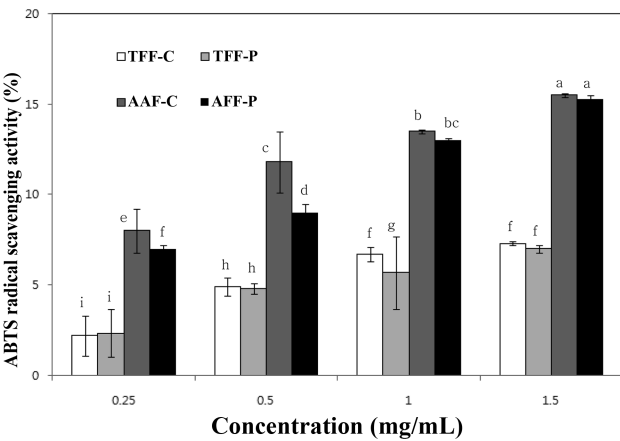


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of *T. fuciformis* and *A. auricula* polysaccharide. (Each value was expressed as mean±standard deviation (n=3). Data with different letters are significantly different at $p < 0.05$. For symbol, refer to Fig. 1.)

디칼 소거능을 나타내었다.

각 시료는 실험농도 범위에서 모두 농도증가에 따라 급격히 활성이 증가하여 농도의존성을 나타내었다. 대조군인 vitamin C(0.1%)의 DPPH radical 소거능은 78%이었으며, *T. fuciformis*의 소거능은 최대활성값을 보인 1.5 mg/mL 농도에서도 조다당 및 부분정제 다당 둘 다 대조군의 12~30% 수준이었다. 반면, *A. auricula*의 경우는 1.0 mg/mL 농도에서 조다당의 경우는 37%, 정제 다당의 경우는 62%이었으나, 1.5 mg/mL에서는 각각 약 58 및 99%로 정제다당에서 매우 높은 DPPH radical 소거능을 보였다. 모든 시료는 조다당보다는 정제된 상태일 때의 활성이 더 높았으며, 모든 농도구간에서 *T. fuciformis*보다 *A. auricula*의 활성이 더 높았다. 정제다당의 1.0 mg/mL 농도에서 비교하면 *T. fuciformis*와 *A.*

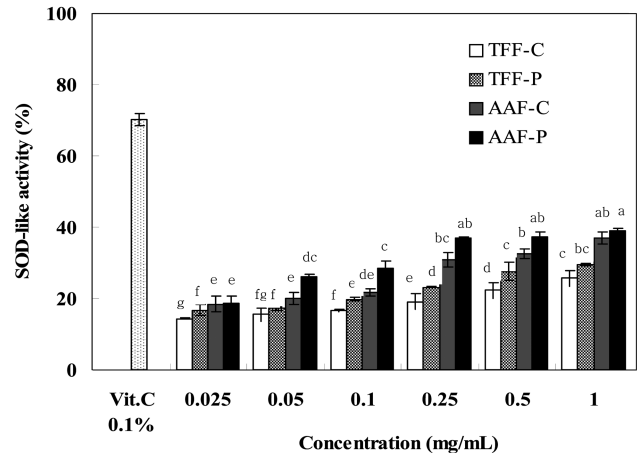


Fig. 4. SOD-like activity of *T. fuciformis*, *A. auricula* polysaccharide and ascorbic acid (Vitamin C, 0.1%) as the standard. (Each value was expressed as mean±standard deviation (n=3). Data with different letters are significantly different at $p < 0.05$. For symbol, refer to Fig. 1.)

*auricula*의 DPPH radical 소거능은 각각 12 및 62%로 5배 정도의 차이를 보였다.

Kim et al.(2008)은 국내 식용 및 약용버섯(총 10 종)의 항산화활성 연구에서 1%(w/v)에서 식용버섯의 경우 15-61%(1 분 반응) 및 5-78%(30 분 반응), 약용버섯의 경우 7.11-70%(1 분 반응) 및 5.5-74%(30 분 반응)의 DPPH 라디칼 소거능을 보인다고 하였다. 따라서 10 분 반응에 의해 얻어진 본 실험의 흑목이버섯 부분정제다당 1 및 1.5 mg/mL 농도하의 62 및 99%의 DPPH 라디칼 소거능은 타 버섯에 비해 매우 높은 소거활성인 것으로 생각되었다.

한편, 친수성 및 lipophilic 물질의 항산화력 측정을 하는데 널리 사용하는 ABTS radical 소거능을 측정할 결과는 Fig. 3과 같다.

농도의존적으로 활성이 증가했으며, DPPH에서와는 달리 정제보다는 조제된 시료에서 다소 높은 활성을 보였으나 그 차이는 미미하였다. 또한 모든 농도구간에서 *A. auricula*가 *T. fuciformis*보다 월등히 높은 활성을 보였으나 최종농도 1.5 mg/mL에서도 각각 약 15.5 및 7.3%로 매우 낮아서 동일농도에서 ABTS radical 소거활성은 DPPH free radical 소거활성의 1/5 수준이었다. 이와 같이 서로 다른 라디칼에 대한 상대적인 라디칼 소거능의 차이는 Yu et al.(2002)의 보고에서 보는 바와 같이 라디칼-항산화제에 포함된 서로 다른 기작에 의해 설명되는 것으로 생각된다. Wang et al.(1998)은 본 결과와는 반대로 ABTS 라디칼 소거능을 갖는 몇몇 화합물은 DPPH 활성을 갖는다고 보고하였는데, 일반적으로 라디칼의 입체선택도나 시료의 용해도와 같은 인자들이 서로 다른 라디칼에의 반응이나 소거에 영향을 준다.

SOD (Superoxide dismutase) 유사활성 측정

SOD 유사활성의 측정법은 반응에서 pyrogallol이 물에 존재하는 superoxide radical에 의해 자동산화가 일어나 갈색 물질을 형성하므로 이를 분광광도계로 분석하고, pyrogallol의 산화속도가 저하되는 원리를 이용하여 superoxide 포착 활성을 간접적으로 측정하는 방법이다(Cho et al., 2007; Bae and Lee, 1990). 이 방법으로 시료의 농도(0.025-1 mg/mL)에 따른 SOD 유사활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다.

SOD 유사활성은 농도 의존적으로 증가하다가 0.25 mg/mL 이상에서 거의 일정해지는 양상을 보였다. 모든 농도 구간에서 *A. auricula*가 *T. fuciformis*보다 다소 높았으며, 최종 1 mg/mL 농도에서 정제된 경우 각각 38.95% 및 29.43%를 나타내었다. 대조구인 0.1% vitamin C (70.17%)에 비해 낮은 값이지만, Hong et al.(1998)의 과실, 과채류의 착즙액의 SOD 유사활성에서 사과착즙액의 경우 14.6%, 케일농축액의 경우 26.7%, 키위착즙액의 경우 27.6%, 무착즙액의 경우 24.1%의 활성에 비하여 비교적 높은 SOD 유사활성이었다.

Superoxide radical은 산화제 중에서 비교적 약한 물질이나, 산화적손상에 의해 발생하는 hydrogne peroxide, hydroxyl radical 및 singlet oxygen과 같은 ROS의 전구물질로 작용한다고 알려져 있다(Aruoma, 1998). 따라서 시료는 농도 의존적으로 이러한 superoxide radical에 대한 소거활성을 지니는 것으로 나타났다.

·OH유리 라디칼 소거능

일반적으로 폴리페놀은 hydroxyl radical를 직접 소거하거나 철이온의 킬레이팅 작용에 의해서 ·OH의 생성계를 저해하고 항산화활성을 나타내는 것으로 잘 알려져 있다(Lopes et al., 1999).

따라서 추출다당이 금속이온을 킬레이팅하여 ·OH의 생성을 감소시키는지 혹은 직접적으로 ·OH를 소거하는지를 결

정하기 위해 Fe³⁺에 의한 hydroxyl radical 생성에 따른 deoxyribose 분해 정도를 TBA법으로 측정하여 조사하였다.

즉, hydroxyl radical을 생성하는 Fe³⁺/H₂O₂/ascorbic acid의 Fenton계에 EDTA를 첨가한 non site specific 반응과 EDTA를 첨가하지 않은 site specific 반응으로 생성된 ·OH의 소거능을 비교하였으며, 그 결과는 Fig. 5와 같다.

두 추출물은 non-site specific 및 site specific 반응에서 모두 deoxyribose의 분해 저해활성을 나타내었다. Non-site specific 반응에서는 두 시료 모두 농도 의존적으로 deoxyribose 분해의 저해활성을 나타내었으며, 조제된 상태보다는 정제된 상태가 두 시료 모두에서 더 좋은 활성을 보였다. 부분정제된 *T. fuciformis* 및 *A. auricula*의 다당은 최종 실험농도인 3.25 mg/mL 농도에서 각각 29.89 및 61.21%의 저해활성을 보였다.

Site specific 반응에서도 동일하게 농도 의존적으로 deoxyribose 분해의 저해활성을 나타내었다. *T. fuciformis*의 경우, 두 반응에서 모두 일정농도 이상에서 일정한 활성이 나타났는데, 조제된 경우는 1.25 mg/mL(19.19%)일 때, 그리고 정제된 경우는 2.5 mg/mL(35.36%)이었다. 반면, *A. auricula*는 주어진 농도 범위(0.25-3.25 mg/mL)에서 지속적으로 증가양상을 보여 고농도에서의 높은 효능을 나타내었다.

두 반응을 비교해보면 *A. auricula*의 경우(3.25 mg/mL)에는 EDTA 첨가의 non-site-specific 반응에서의 deoxyribose 분해의 저해활성(61.21%)은 EDTA 무첨가시의 site-specific 반응(57.61%)에서 보다 상대적으로 다소 높은 항산화 활성이 얻어졌는데, 이는 전자의 경우 항산화제와 ·OH와의 반응을 나타내는 반면, 후자는 철 이온을 킬레이트화하고 ·OH·생성과 경합하는 능력을 나타내므로 추출물이 금속이온을 킬레이팅 하기보다는 직접적으로 hydroxy radical (·OH)을 소거하는 활성이 다소 높은 것으로 나타났다. 그러나 흰목이 버섯의 경우는 반대의 결과로, 정제된 *T. fuciformis* 다당은 3.25 mg/mL에서 non-site(29.89%)보다 site specific hydroxyl radical 소거능(35.68%)이 다소 높았다.

하지만 두 다당 모두 non-site, site 반응에의 차이가 크지 않았다. 이는 추출물이 전이금속의 킬레이트화와 함께 수소 및 전자공여능에 의해 직접적으로 라디칼을 소거함에 따라 chain breaking antioxidant로서의 역할을 할 수 있음을 보여주는 결과로 생각되었다.

실제로 다당의 항산화작용은 ·OH 생성 억제 및 생성 ·OH의 제거이며, 전자는 전이금속이온과 관계되는데, 다당이 Fe와 결합하는 능력을 갖는 것으로 보고되었다(Kong et al., 2010). 유산화 다당의 경우는 이 두 가지를 모두 포함하는 것으로 보고되었다(Wang et al., 2008).

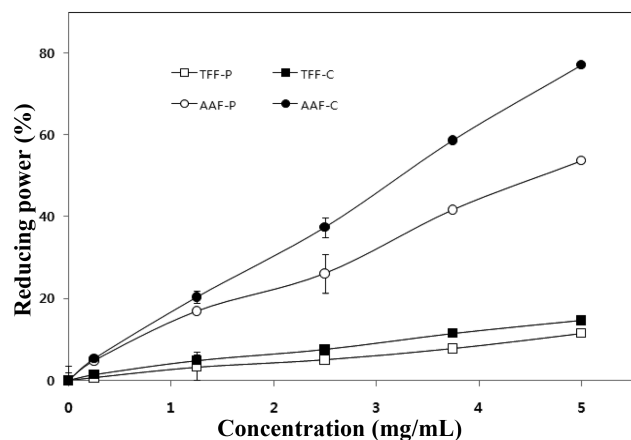


Fig. 5. Reducing power of *T. fuciformis*, *A. auricula* polysaccharide and BHT as the standard. (Each value was expressed as mean±standard deviation (n=3). For symbol, refer to Fig. 1.)

환원능

일반적으로 유리 라디칼 소거나 지질과산화의 저해와 같은 비효소적 항산화활성은 대부분 산화, 환원반응에 의해

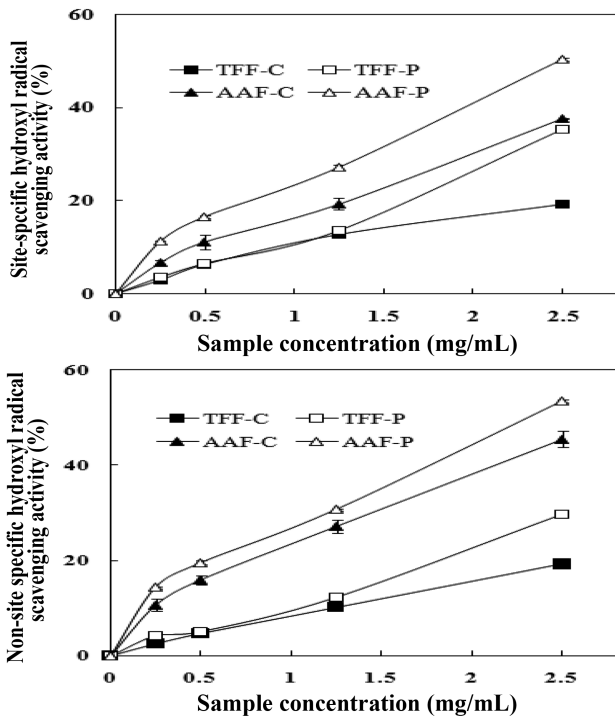


Fig. 6. Non-site specific and site specific hydroxyl radical scavenging activity for *T. fuciformis* and *A. auricula* polysaccharide. (Each value was expressed as mean±standard deviation (n=3). For symbol, refer to Fig. 1.)

매개되므로(Zhu et al., 2002) 항산화활성 조사의 한 방법으로 다른 물질을 환원시킬 수 있는 능력인 환원력을 널리 사용한다.

따라서 *T.fuciformis*와 *A.auricula*의 자실체 다당의 농도에 따른 (0.25-5 mg/mL) 환원력을 조사하였으며, 0.1% BHT 표준시료와 비교하여 % 환원력으로 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다.

자료로 나타내지는 않았으나 대조군인 BHT의 환원력(흡광도값)은 농도증가에 따라 급격히 상승한 후 2.5 mg/mL 농도에서 일정한 최대의 흡광도값(2.11)에 도달하였다. 이 값을 100%로 하여 산출한 *T. fuciformis* 및 *A. auricula* 자실체 다당의 환원력(%)은 농도증가에 따라 선형적인 증가를 보여 최종 실험농도인 5 mg/mL 농도에서 시료에 따라 표준시료의 11.5-77.1%를 나타내었다. 조제된 상태보다는 정제된 상태에서 높은 환원력을 나타냈고, *T. fuciformis* (14.7%)보다는 *A. auricula*의 값(77.1%)이 약 5.2 배 높은 것으로 나타났다. 특히, *A. auricula*의 77.1% 환원력을 흡광도 값으로 보면 1.48로 이 값은 ~30 mg/mL 및 ~6 mg/mL 농도에서 각각 Mau et al.(2002) 및 Ramkumar et al.(2010)이 각종 버섯추출물에 대해 보고한 결과에 비하면 대응하는 농도에서 월등히 높은 값이다.

따라서 *A. auricula*가 더 높은 환원력을 지니는 것으로

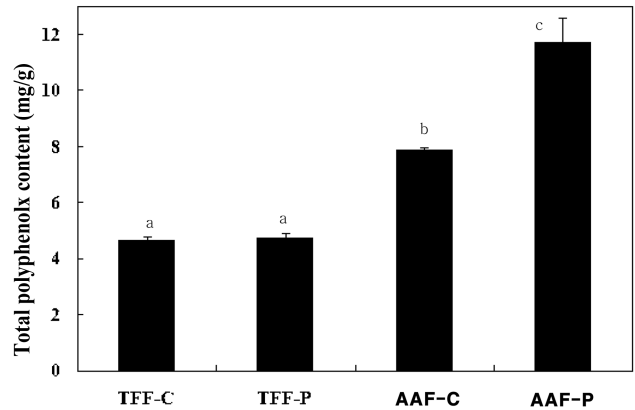


Fig. 7. The contents of total polyphenols in *T. fuciformis* and *A. auricula* polysaccharide. (Each value was expressed as mean±standard deviation (n=3). Data with different letters are significantly different at p<0.05. For symbol, refer to Fig. 1.)

생각되며, 이러한 환원력은 수소를 공여함으로써 라디칼사슬을 붕괴시켜 연쇄반응을 방지하거나 과산화물의 전구체와 반응하여 과산화물의 형성을 방지하는 것으로 생각되었다.

총폴리페놀 함량

이상에서 살펴본 바와 같이, 두 버섯시료 모두 정제다당의 항산화활성 및 환원력은 조제다당보다 높아서 이들 활성이 다당과 관련되는 것으로 생각되었다. 하지만 *A. auricula*와 *T. fuciformis*의 정제다당은 다당함량이 비슷함에도 불구하고 *A. auricula*의 항산화 활성이 *T. fuciformis*보다 약 1.4-6.4 배나 높아서 이들의 차이가 흑갈색 색소와 관련되는 것으로도 생각되었다.

이들 흑갈색의 색소분석은 별도로 자료화하지는 않았으나 FeCl₃ 반응에 의한 적자색 침전물의 양성반응이 관찰되어 폴리페놀 구조를 갖는 것으로 예측되었으며, 따라서 이들의 조제 및 정제된 시료의 폴리페놀함량을 측정하여 Fig. 7에 나타내었다.

정제된 *A. auricula*의 폴리페놀함량이 11.70±0.91 mg/g으로 가장 높았으며, 조제된 경우, 7.85±0.14 mg/g이었다. *T. fuciformis*의 폴리페놀 함량은 조제 및 정제 시 각각 4.62±0.23, 4.73±0.18 mg/g으로 유사한 값을 나타내어 *A. auricula*가 약 1.5-2.5 배나 폴리페놀함량이 높은 것으로 나타났다.

이러한 *A. auricula*의 폴리페놀함량은 Lee & Lee(1994)가 보고한 국내산 45종의 식물성식품 및 비상용식품에 대한 페놀성물질의 함량분석 값(0.1-5.8%)과 비교할 때, 다른 식물종들보다는 함량이 낮지만, 버섯종의 폴리페놀함량과 비교하면 노루궁뎅이버섯 및 잎새버섯(12.05-12.31 mg/g)의 함량과 비슷한 값으로 비교적 높은 값 범위이었다(Mau et al., 2002).

한편, 이들 시료간의 항산화활성(DPPH)과 폴리페놀함량 사이의 상관관계를 구한 결과, 이들 사이의 상관관계가 매

우 높았다(> r=0.94). 반면, 다당은 r=0.64로 보통의 상관 관계를 보였다. 따라서 흑목이와 흰목이버섯 정제다당 분획의 항산화활성의 차이는 흑갈색 색소로서의 폴리페놀함량 차이에 기인하는 것으로 판단되었다.

Rice-Evans et al.(1996)은 폴리페놀이 활성산소종을 중화시키는 redox로써 작용하여 항산화 활성을 지닌다 하였다. Elmastas et al.(2007) 및 Cheung et al.(2003)도 폴리페놀화합물이 모든 버섯종 항산화활성의 주성분이라 하였다. 반면, Chen et al.(2010)은 차가버섯의 경우 이의 다당(IOPS)이 항산화활성의 주 활성성분의 하나라 하였다. 또 Mau et al. (2002)는 버섯류의 높은 항산화활성이 폴리페놀과 함께 부가적인 다른 활성물질이 복합적으로 관여한다고 하였다. 따라서 서로 비슷한 다당함량에도 불구하고 매우 현저한 항산화활성의 차이를 나타낸 흰목이와 흑목이버섯 부분정제다당 시료간의 차이는 Mau et al.(2002)의 보고와 같이 폴리페놀 성분과 함께 다당이 복합적으로 작용한다고 생각되었다.

결 론

흰목이 및 흑목이버섯의 항산화활성에 대한 비교검토의 일환으로, 이들의 열수추출 조다당 및 부분정제 다당을 조제하였고, 이들 시료의 DPPH 및 ABTS radical 소거활성, SOD 유사활성, hydroxyl radical 소거활성 및 환원력을 비교하여 다음의 결론을 얻었다.

본 연구의 모든 실험에서 정제다당은 조다당보다 더 높은 라디칼소거활성을 나타내었다. 부분정제 다당의 DPPH free radical 소거활성은 *A. auricula*의 경우 1 mg/mL농도에서 61.7%로 *T. fuciformis* (9.6%)보다 6.4배의 매우 높은 활성을 나타내었다. 반면, ABTS radical 소거능은 *T. fuciformis* 및 *A. auricula*의 부분정제다당에서 각각 5.7% 및 15.3%로 DPPH radical 소거활성에 비해 상당히 낮은 값 범위이었다. Non-site와 site specific hydroxyl radical 소거활성은 실험농도 범위에서 *T. fuciformis*(~29.7 및 ~35.4%)와 *A. auricula* (~53.5 및 ~50.3%)가 각각 유사한 값을 보여 시료의 활성이 전이금속의 킬레이트화와 함께 수소 및 전자공여능에 의해 직접적으로 라디칼을 소거하는 것으로 나타났다. 또, SOD 유사활성은 *T. fuciformis* 및 *A. auricula*(1 mg/mL)에서 각각 29.4% 및 38.9%이었으며, *A. auricula*와 *T. fuciformis*는 환원력은 각각 표준시료인 0.1% BHT의 77.1 및 14.7%이었다. 대체로 *A. auricula*가 *T. fuciformis*보다 약 1.4-6.4 배나 높은 항산화 활성을 지니는 것으로 나타났으며, 두 시료간의 차이는 *T. fuciformis* 및 *A. auricula*의 폴리페놀함량(각각 4.73±0.18 및 11.70±0.91 mg/g)과 관련되는 것으로 추론되었다.

참고문헌

Ames SN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidant, antioxidant and degenerative disease of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 7915-7922.

Aruoma OI. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. J. Am. Oil Chem. Soc. 75: 199-212.

Bae RN, Lee SK. 1990. Factors affecting browning and its control methods in chopped garlic. J. Korean Soc. Hort. Sci. 31: 213-218.

Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 26: 1199-1200.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method of evaluate antioxidant activity. Lebensm-Wiss Techol. 28: 25-30.

Cerutti PA. 1985. Prooxidant states and tumor promotion. Science 227: 379-381.

Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanism. Food Chem. Toxicol. 37: 949-962.

Chen FF, Cai DL. 2008. Research advances in primary biological effects of *Tremella* polysaccharides. J. Chin. Integr. Med. 6: 862-866.

Chen H, Lu X, Qu Z, Wang Z, Zhang L. 2010. Glycosidase inhibitory activity and antioxidant properties of a polysaccharide from the mushroom *Inonotus obliquus*. J. Food Chem. 34: 178-191.

Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. Food Chem. 81: 249-255.

Cho MJ, Park MJ, Lee HS. 2007. Nitrite scavenging ability and SOD-like activity of a sterol glucoside from *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum*. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 77-82.

De Vrujijn J, Loyola C, Aqueveque P, Canumir J, Cortez M, France A. 2009. Antioxidant properties of extracts obtained from *Grifola gargal* mushrooms. Micol. Apl. Int. 21(1): 11-18.

Ebrandu AR, Luta G, Edwards JA, McAnalley BH, Davis B. 2005. Quantitative colorimetric analysis of aloe polysaccharides as a measure of *Aloe vera* quality in commercial products. J. AOAC Int. 88: 684-691.

Elmastas M, Isildak O, Turkecul I, Temur N. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. J. Food Compos. Anal. 20: 337-345.

Fridovich I. 1999. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? Ann. N Y Acad. Sci. 893: 13-18.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Aruoma OI. 1987. The deoxyribose method: a simple assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. Anal. Biochem. 165: 215-219.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. Method. Enzymol. 186: 81-85.

Hong HD, Kang NK, Kim SS. 1998. Superoxide dismutase-like

- activity of apple juice mixed with some fruits and vegetables. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 1484-1487.
- Jung JH, Lee SY. 2007. AChE inhibitory effect and antioxidative activity of submerged cultured products from *Hericium erinaceum*. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 22: 30-36.
- Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity(VCEAC) of phenolic phytochemicals. J. Agric. Food Chem. 50: 3713-3717.
- Kim HM, Hur W, Lee SY. 2009. Composition and structural characteristics of polysaccharide from hot water extraction of *Auricularia auricula*. Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J. 24: 584-590.
- Kim MY, Seguin P, Ahn JK, Kim JJ, Chun SC, Kim EH, Seo SH, Kang EY, Kim SL, Park YJ, Ro HM, Chung IM. 2008. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. J. Agric. Food Chem. 56: 7265-7270.
- Kim SS, Kim YS. 1990. Korean Mushrooms (in Korean). Yupoong Publishing Co., Seoul, Korea, p. 321.
- Kim YJ. 1974. Botany of Drug Resources (in Korean). Dongyong Co., Seoul, Korea, p. 69.
- Kodali VP, Sen R. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium. Biotechnol. J. 3: 245-251.
- Kong F, Zhang M, Liao S, Yu S, Chi J, Wei Z. 2010. Antioxidant activity of polysaccharide-enriched fractions extracted from pulp tissue of *Litchi chinensis* Sonn. Molecules 15: 2152-2165.
- Lee BC, Bae JT, Pyo HB, Choe TB, Kim SW, Hwang HJ, Yun JW. 2003. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. Enzyme Microb. Technol. 32: 574-581.
- Lee JH, Lee SR. 1994. Analysis of phenolic substances content in Korean plant foods. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 310-316.
- Liu F, Liu J, Zhang L, Shen W, Guo T, Liu C, He P. 2007. *Ex vivo* anti-oxidation activity of polysaccharides from red alga *Porphyra yezoensis*. Res. J. Pharmacol. 1(3): 61-66.
- Liu F, Ooi VEC, Chang ST. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. Life Sci. 60(10): 763-771.
- Lopes GKB, Schulman HM, Marcelo HL. 1999. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. Biochem. Biophys. Acta. 1472: 142-152.
- Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 47: 469-474.
- Mau JL, Lin HC, Song SF. 2002. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. Food Res. Int. 35: 519-526.
- Moskovitz J, Yim KA, Choke PB. 2002. Free radicals and disease. Arch. Biochem. Biophys. 397: 354-359.
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine. Jpn. J. Nutr. 44: 307-315.
- Ramkumar L, Ramanathan T, Thirunvukkarasu P, Arivuselvan N. 2010. Antioxidant and radical scavenging activity of nine edible mushroom extract. Int. J. Pharmacol. 6(6): 950-953.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Bio. Med. 20: 933-956.
- Slinkard K, Singleton VL. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual method. Am. J. Enol. Vitic. 28: 49-55.
- Sun C, Wang JW, Fang L, Gao XD, Tan RX. 2004. Free radical scavenging and antioxidant activities of EPS2, an exopolysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Keisslerella* sp. YS 4108. Life Sci. 75: 1063-1073.
- Tseng YH, Yang JH, Mau JL. 2008. Antioxidant properties of polysaccharides from *Granoderma tsugae*. Food Chem. 107: 732-738.
- Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, LaVoie EJ, Huang TC, Ho CT. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Savia officinalis*). J. Agric. Food Chem. 46: 4869-4873.
- Wang J, Zhang Q., Zhang Z, Li Z. 2008. Int. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. Int. J. Biol. Macromol. 42: 127-132.
- Yamanaka T. 1968. Preliminary notes on the development of the *Gyrophora esculenta* community. J. Jap. Bot. 43: 363.
- Yazdanparast R, Ardestani A. 2007. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Cyperus rotundus*. J. Med. Food 10: 667-674.
- Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M. 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. J. Agric. Food Chem. 50: 1619-1624.
- Zhu QY, Hackman RM, Ensunsa JL, Holt RR, Keen CL. 2002. Antioxidative activities of oolong tea. J. Agr. Food Chem. 50: 6929-6934.