

재배방법(토양, 봉지, 병)에 따른 잎새버섯 추출물의 생리활성 비교

함진관¹ · 장은하¹ · 권혜정² · 이안수³ · 임재길¹ · 박지선^{1,*}

¹강원도농업기술원 농식품연구소, ²강원도농업기술원 원예연구과, ³강원도농업기술원 환경농업연구과

Comparison of the biological activity of Maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms extracts according to cultivation methods

Jin-Kwan Ham¹, Eun-Ha Chang¹, Hye Jeong Kwon², An-Soo Lee³, Jae Gil Lim¹, and Ji-Seon Park^{1,*}

¹Agro-food Research Institute, Gangwondo Agricultural Reserach and Extension Services (ARES)

²Horticulture Research Division, Gangwondo ARES

³Division of Agricultural Environment Research

Abstract This study analyzed the diverse constituents and compared biological activities of Maitake mushrooms cultivated by three methods (outdoor, bag, and bottle cultivation). Crude protein, ash, and fiber content were high; crude lipid content was significantly high; and carbohydrate content was significantly high in the bag, bottle, and outdoor cultivation, respectively. K, Mg, and Cu contents were higher in bottle cultivation than in the other two methods. Additionally, β -glucan content was higher in outdoor cultivation than in the other two methods. There was no significant difference in DPPH radical scavenging ability and total polyphenol contents in the mushrooms cultivated by different methods. The ABTS radical scavenging activity IC_{50} was lower in bottle cultivation than in the other two methods. The anti-inflammatory activity was significantly inhibited in the bottle (86.55%), bag (85.71%), and outdoor cultivation (84.87%) groups compared with in the LPS treatment group.

Keywords: *Grifola frondosa*, new variety, cultivation techniques, Maitake, Mushroom

서론

잎새버섯(*Grifola frondosa*)은 가을에 즐참나무와 물푸레나무에 발생하는 부생균으로 북미와 동아시아에서 분포되어 있다(Yiasmin 등, 2020). 잎새버섯은 면역력을 향상시켜 항암 효과가 뛰어나며(Yuki 등, 2019), 30여 가지의 독특한 향을 가지고 있는 버섯이다. 다른 버섯에 비해 β -glucan 함량이 높아(Cui 등, 2007), 비특이적 면역반응으로 인간의 대식세포, T세포를 활성화시키는 것으로 나타났다(Kodama 등, 2002; Harada 등, 2003). 특히, AIDS의 원인 균인 HIV에 대한 억제작용과 2차 질환을 개선하는 효과가 탁월하며(Nanba 등, 2000), 항종양(Zhuang 등, 1994; Fan 등, 2011), 항당뇨(Kubo 등, 1994), 항고혈압(Kabir 등, 1987), 항고지혈증(Kubo 등, 1997) 및 항바이러스 활성(Dissanayake 등, 2007), 항염증 활성이 뛰어난 것으로 보고되었다(Nanba 등, 2000). 미국과 일본 등에서는 잎새버섯의 항암효과 및 면역증강효과에 관한 연구가 활발히 연구되고 있으며 일본에서는 39종의 품종이 등록되어 있고 표고, 팽이, 만가닥 다음으로 생산량이 많은 버섯으로 알려져 있다. 또한, 외국에서는 특유의 향과 육질의 질감으로 식품 또

는 식품 첨가물로 널리 사용되고 있다(Zhuang 등, 2004). 그러나 국내에서는 최근 들어 잎새버섯에 대해 알려지기 시작하여 수요가 증가하고 있고, 노지에서는 1년에 한번 수확이 가능하기 때문에 한달에 한번 수확하는 봉지재배의 기술로 수확률을 증가시키는 새로운 재배방법이 도입되고 있다.

기존 토양매립재배는 3-4개월 배양 후, 4-6월에 토양에 매립하여, 9-10월에 1번 수확을 한다. 그러나 병재배는 톱밥매지에 40일 배양 후 재배하여 병당 100-140g의 수확이 가능하고 단위 수량이 높은 장점이 있다. 하지만, 병재배를 한 잎새버섯은 저장성이 낮다. 이를 보완한 봉지재배는 톱밥매지에 2개월 이상 배양한 후 재배하여 300-600g의 수확이 가능하고 품질 저장성이 우수하여 농가의 보급이 확대되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 재배별(토양매립, 병, 봉지)로 잎새버섯의 성분과 생리활성을 확인하기 위하여 일반성분 및 무기성분, 총 폴리페놀 함량, 베타글루칸의 함량을 비교하였고, DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능, 항염을 비교 검토하여 농가에서 활용할 수 있도록 기초자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용한 잎새버섯은 강원도원에서 개발한 '태미' 품종을 강원도 춘천시 강원도농업기술원 노지 시험포장에서 토양 매립재배와 실내 배지등에서 봉지재배, 병재배로 구분하여 시료를 채취하였다(Fig. 1). 토양매립재배는 2019년 4월 토양에 접종하여 다 자란 9월에 수확하였고, 봉지재배와 병재배는 9월에 실

*Corresponding author: Ji-Seon Park, Agro-food Research Institute, Gangwondo Agricultural Research and Extension Services, Chuncheon, Gangwon 24203, Korea
Tel: +82-33-248-6525
Fax: +82-33-248-6555
E-mail: jisun2346@korea.kr
Received October 3, 2022; revised December 1, 2022;
accepted January 2, 2023



Fig. 1. Maitake mushrooms (*Grifola frondosa*) appearances of cultivated by three different methods

내 18°C에서 각각 배지에 접종하여 다 자란 20일 후에 수확하였다. 봉지재배는 내열성 PE 비닐을 사용하였고, 병재배는 1,100 mL의 내열성 플라스틱을 사용하였다. 채취한 시료는 동결건조기(PVTFD20R, Ilshin Lab. Co., Seoul, Korea)를 사용하여 건조시켜 200 mesh로 분말하여 -70°C에 보관하면서 사용하였다. 동결건조한 분말 상태의 잎새버섯의 열수 추출물은 건조된 잔사에 10배량의 증류수를 가하여 90°C에서 6시간씩 3회 반복 추출하여 취하였다. 상층액은 여과지로 여과한 후 rotary evaporator (N-1000, Eyela Co., Tokyo, Japan)로 60°C에서 농축하고 37°C에서 건조하였다. 건조된 시료는 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

일반성분 및 무기성분, β-glucan 분석

일반성분 분석은 AOAC법에 따라 수분은 상압건조법(105°C)을 이용하였고, 조지방은 Soxhlet법으로 조지방분석기(Soxtec™8000, Foss, Hoganas, Sweden)를 사용하였으며, 조단백질은 킬달법으로 자동 단백질분석기(kjeltec™8400, Foss)을 이용하였고, 질소 환산 계수는 6.25를 사용하였다. 조회분은 직접회화법(600°C)으로 정량하고 탄수화물 함량은 100-(수분+조회분+조지방+조단백)으로 계산하였다. 조섬유는 조섬유분석기(Fibertec™, Foss)를 이용하여 분석하였다. 무기성분 분석은 Park 등(2011) 습식분해법을 기준으로 70% HClO₄ 10 mL와 HNO₃ 10 mL를 첨가하여 무색이 될 때까지 가열하고 나서 증류수를 활용하여 증발접시에서 건조 후, 염화수소 회석액(2배) 10 mL로 정용한 후 Ca (calcium), K (potassium), Mg (magnesium), Na (sodium), Fe (iron), Mn (Manganese), Cu (copper), P (phosphorus)를 ICP (Integra XL, GBC Scientific, Melbourne, Australia)로 분석하였다. β-glucan 분석은 β-glucan Assay Kit (Megazyme, Wicklow, Ireland)를 사용하여 측정하였다. 먼저, 100 mg의 시료를 삼각플라스크에 넣고, 증류수 10 mL를 가한 후, 여기에 아밀라아제(20,000-60,000 U/mL) 0.1 mL를 정용하였다. 0.1 N 수산화나트륨용액을 이용하여 pH 6.9로 맞추고 다음 20°C 항온수조에서 2시간 동안 진탕하여 효소분해 시킨 후, 0.1 N 염산용액으로 pH 5.0으로 맞추고 셀룰라아제(1,600 U/mL)를 0.1 mL 넣어 37°C 항온수조에서 2시간 동안 진탕하였다. 프로테아제(600-1,300 U/mL) 약 0.1 mL를 넣고 0.1 N 수산화나트륨용액으로 pH 7.5로 한 후 37°C 항온수조에서 2시간 동안 진탕하여 효소분해시켰다. 이후, 아밀로글루코시다제(10,000 U/mL) 약 0.1 mL

을 넣고 0.1 N 염산용액으로 pH 4.8로 맞추고 후 60°C 항온수조에서 2시간 동안 진탕하였다. 효소분해물에 95% 에탄올 40 mL를 가하여 4°C에서 12시간 이상 침전 시킨 후, 원심분리(3,000 g, 20 분)하여 시료의 침전물을 취하였다. 시료의 침전물에 80% 에탄올 50 mL를 가하여 4°C에서 1시간 동안 침전시킨 후 위의 용액을 원심분리(3,000 g, 20분)하여 침전물에 증류수 10 mL를 가한 후 침전물을 혼합하였다. 균질화시켜 증류수로 50 mL가 되도록 한 후, 이를 적정농도가 되도록 희석하여 시험관에 농도별 표준용액과 시험용액(공시험포함)으로 구분하여 각각 5% 페놀용액 1 mL를 넣고, 위의 시험관에 농도별 표준용액을 1 mL씩 가하였다. 시험용액은 시험용액 0.1 mL과 증류수 0.9 mL를 가하였고, 공시험은 증류수 1 mL을 가한 뒤 시험관에 각각 황산 5 mL을 넣은 후, 실온에서 20분간 반응시켜 파장 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{베타글루칸함량(mg/g)} = C \times (a \times b) / S \times 10 \times 1 / 1,000 \times 0.9$$

C: 시험용액중의 글루코오스 농도(μg/mL)

a: 시험용액의 전량(mL)

b: 희석배수

S: 시료 채취량(g)

10: 발색과정의 희석배수

1/1,000: 단위 환산 계수

0.9: 베타글루칸 전환계수(162/180)

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Singleton 등(1999)의 방법으로 증류수 1.8 mL와 추출물 0.2 mL에 0.2 mL Folin-Ciocalteu's phenol 시약을 넣고 반응시킨 후 0.4 mL Na₂CO₃ 포화용액을 넣어 1.4 mL 증류수를 첨가한 후, 어두운 곳에서 반응시킨 다음 분광광도계(DU-730, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)로 720 nm에서 측정하였다. 이때 표준물질은 tannic acid이었다. 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(1999)의 방법으로 증류수 4 mL와 시료 1 mL와 5% NaNO₂ 0.3 mL를 넣고 5분 동안 실온에서 방치시킨 후 10% AlCl₃ 0.3 mL를 넣은 후 증류수 2.4 mL와 1M NaOH 2 mL를 첨가하여 분광광도계 510 nm에서 측정하였으며, 이때 표준물질로 루틴을 사용하였다.

DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 추출물 0.2 mL에 0.2 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 용액 0.8 mL를 혼합하여 30분간 어두운 곳에서 반응시킨 후, microplate reader (UVM-340, ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 아스코르브산을 이용하였고, Liang 등(2010)이 보고한 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Experiment}}}{A_{\text{Control}}}\right) \times 100$$

ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical 소거능은 Custódio 등(2012)의 방법을 변형하여 측정하였다. 2.6 mM 과황산칼륨과 7.4 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) 용액을 혼합하여 15시간 반응시켜 ABTS 양이온을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 되도록 무수탄올을 이용하여 조절하였다. 시료 20 µL에 300 µL의 희석된 ABTS 용액을 넣고 20분간 반응시킨 후, microplate reader의 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거능은 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Experiment}}}{A_{\text{Control}}}\right) \times 100$$

Nitric oxide (NO) 생성량 및 세포생존율

NO 측정에 사용된 Raw 264.7은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받았다. 세포주를 96 well plate에 1×10⁵ cells/well의 농도로 분주하여 5% CO₂ 인큐베이터에서 온도 37°C로 24시간 동안 배양하였다. 추출물은 최종 농도 100 µg/mL로 희석한 후, 추출용매별 추출물 20 µL와 100 ng/mL의 lipopolysaccharide 2 µL를 세포배양 well에 첨가하여 5% CO₂ 인큐베이터에서 온도 37°C로 하루를 배양하였다. 배양 후 상등액 100 µL와 동량의 Griess reagent로 10분간 상온에서 반응시킨 후 microplate reader (UVM-340, ASYS Hitech GmbH)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 10 µg/mL 농도의 lipopolysaccharide만을 20 µL 처리하여 활성화된 세포를 사용하였고, 세포가 생산한 NO는 sodium nitrate를 농도별로 희석하여 분석에 이용하였으며, 측정된 흡광도 값을 표준곡선에 대입하여 생성된 NO의 양을 정량하였다(Park 등, 2011). 세포독성 측정은 96 well plate에 세포주(RAW 264.7)를 1×10⁵ cells/well로 분주하여 배양하고, 잎새버섯 추출물을 최종 농도가 100 µg/mL가 되도록 처리한 후, 37°C에서 하루(24 h)를 배양하였다. 24시간 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) 용액을 첨가하여 동일한 조건에서 5시간 동안 배양하여, 생성된 formazan 결정을 DMSO (dimethyl sulfoxide)

에 녹여서 microplate reader (UVM-340, ASYS Hitech GmbH)를 이용하여 570 nm 흡광도 범위에서 측정하였다. 세포의 생존율은 무처리 시료를 대조구에 대비한 시료 처리구의 흡광도로 표시하였다.

통계분석

본 연구의 모든 통계처리는 SPSS Statistics (ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 의해 Duncan's multiple range test 방법과 ANOVA 검정을 이용하여 세번 이상 반복한 결과로 평균값 간에 유의수준 $p < 0.05$ 에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

일반성분 및 무기성분

잎새버섯의 재배방법별 일반성분을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 잎새버섯의 단백질 함량은 봉지재배(22.17±0.20 mg/100 g), 병재배(21.29±0.02 mg/100 g), 토양매립재배(19.13±0.05 mg/100 g) 순으로 높았다. 조지방은 토양매립재배(2.16±0.03 mg/100 g)와 봉지재배(2.23±0.10 mg/100 g)보다 병재배(3.66±0.03 mg/100 g)에서 높게 나왔다. 회분은 봉지재배에서 7.60±0.16 mg/100 g으로 다른 재배방법보다 높게 나왔고, 탄수화물은 토양매립재배에서 72.25±0.11 mg/100 g으로 높게 나왔다. 조섬유는 토양매립재배 16.73±0.64 mg/100 g, 봉지재배 18.35±0.41 mg/100 g, 병재배는 17.71±0.33 mg/100 g로 봉지 재배에서 높게 나왔다. Lee 등(2007)은 잎새버섯 분말의 일반성분을 조사한 결과 단백질 32.6%, 지질 1.1%, 회분 7.4%, 탄수화물 36.9%, 조섬유 13.8%로 보고하였다. Je 등(2018)에 의하면 동결건조한 잎새버섯 단백질 함량은 32.81±0.06%로 본 연구결과보다 높게 나왔고, 조지방은 2.06±0.11%로 토양매립재배와 봉지재배에서 비슷하였으며, 회분은 6.82±0.09% 봉지재배와 병재배보다 낮게 보고하여, 본 연구와 차이를 보였다. 다른 버섯류와 비교하였을 때 잎새버섯의 단백질, 지방, 회분 함량은 새송이버섯 보다 높게 보고되었고(Je 등, 2018), 단백질은 산느타리버섯보다 낮게 보고 되었다(Kwon 등, 2018). 본 연구에서 Ca (Table 2)은 토양매립재배(15.93±3.05 mg/100 g)가 봉지재배(11.41±3.05 mg/100 g)와 병재배(12.25±0.43 mg/100 g)보다 높게 나왔고, Fe도 토양매립재배(12.67±1.12 mg/100 g)에서 다른 두 재배방법에 비해 2-3배가 높게 나왔다. 이와 대조적으로 K은 토양매립재배(1477.12±31.13 mg/100 g)보다 봉지재배(2101.08±76.01 mg/100 g)와 병재배(2200.25±14.93 mg/100 g)가 높게 나왔고, P도 봉지재배(678.35±8.84 mg/100 g)와 병재배(668.27±5.22 mg/100 g)가 토양매립재배(609.46±17.68 mg/100 g)보다 높게 나왔다. Yu 등(2017)의 배지별 영지버섯의 무기염류비교 결과 Ca이 증가할수록 P, K, Mg의 함량은 감소하였다. Na은 재배별 유의적 차이가 없었고, Mg은 병재배(73.47±1.93 mg/100 g) > 봉지재배(69.90±4.67 mg/100 g) > 토양매립재배(63.18±0.28 mg/100 g) 순으로 나왔으며, Mn과 Cu는 병재

Table 1. Proximate compositions of Maitake mushrooms cultivated by three methods

Group ¹⁾	Proximate composition (dry weight basis, mg/100 g)					
	Moisture	Crude Protein	Crude lipid	Crude ash	Carbohydrate	Crude fiber
Outdoor	1.29±0.03 ²⁾³⁾	19.13±0.05 ^c	2.16±0.03 ^b	5.17±0.05 ^c	72.25±0.11 ^a	16.73±0.64 ^b
Bag	1.18±0.07 ^{ab}	22.17±0.20 ^a	2.23±0.10 ^b	7.60±0.16 ^a	66.82±0.32 ^b	18.35±0.41 ^a
Bottle	1.10±0.09 ^b	21.29±0.02 ^b	3.66±0.03 ^a	7.14±0.11 ^b	66.83±0.14 ^b	17.71±0.33 ^{ab}

¹⁾ Outdoor: Outdoor cultivation, Bag: Bag cultivation, and Bottle: Bottle cultivation

²⁾ Values are mean±SD of triplicate determinations (n=3)

³⁾ Means with different letters (a-c) within a column indicate significant differences ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

Table 2. Mineral contents of Maitake mushrooms cultivated by three methods

(unit: mg/100 g)

Group ¹⁾	Ca	K	Mg	Na	Fe	Mn	Cu	P
Outdoor	15.95±3.05 ²⁾³⁾	1477.12±31.13 ^b	63.18±0.28 ^b	8.41±1.16 ^a	12.67±1.12 ^a	0.55±0.03 ^b	1.59±0.02 ^c	609.46±17.68 ^b
Bag	11.41±0.35 ^b	2101.08±76.01 ^a	69.90±4.67 ^{ab}	8.45±0.89 ^a	6.69±0.87 ^b	0.51±0.01 ^b	2.18±0.08 ^b	678.35±8.84 ^a
Bottle	12.25±0.43 ^b	2200.25±14.93 ^a	73.47±1.93 ^a	10.15±1.00 ^a	4.76±0.12 ^b	0.62±0.02 ^a	2.46±0.02 ^a	668.27±5.22 ^a

¹⁾Outdoor: Outdoor cultivation, Bag: Bag cultivation, and Bottle: Bottle cultivation²⁾Values are mean±SD of triplicate determinations (n=3)³⁾Means with different letters (a-c) within a column indicate significant differences ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test

배에서 각각 0.62±0.02 mg/100 g, 2.46±0.02 mg/100 g로 토양매립 재배와 봉지재배보다 높게 나왔다. 무기염류는 버섯 생장의 대사 과정에 영향을 주는 중요한 인자로서 적은 양이 소모되지만 촉매작용으로 버섯균 신장에 필요한 요소이다. Yu 등(2017)에 의하면 온도 및 이산화탄소(CO₂)에 의해 자실체의 특성에 영향을 주며, 온도가 낮고 이산화탄소 함량이 늘어날수록 생육이 지연된다고 보고하였다. 토양매립재배는 재배기간 4개월 동안 평균 10°C 이상의 기온차이가 있지만, 병재배와 봉지재배는 토양매립재배와 달리 재배기간 동안 온도(18°C)와 CO₂ 농도(800 ppm), 상대습도(90%)가 유지되기 때문에 본 연구의 함량별 차이는 재배방법에 따른 차이로 사료된다. Kim 등(2007)에 의하면 자실체는 봉지재배보다는 병재배가 배지내의 영양소를 매우 활발하게 흡수하였고, 이는 산소투과율 및 두께에 대한 미세한 온도차이가 영향을 준것으로 판단된다.

총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량

총 폴리페놀은 산채류 등 농산물의 주요 성분으로 한 분자내에 2개 이상의 페놀하이드록실기를 가진 방향족 화합물로서, 항산화 기능에 관여한다(Kim 등, 1995). 페놀류 함량이 높은 농산물은 체내에 혈중 총 콜레스테롤 농도를 낮추는 등 혈관 순환계 질병을 예방하고 개선하는 효과가 있다. 잎새버섯의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 총 폴리페놀 함량은 토양매립재배(4.74±0.15 mg TAE/g), 병재배(4.67±0.19 mg TAE/g), 봉지재배(4.48±0.15 mg TAE/g)에서 유의한 차이가 없었고, 총 플라보노이드 함량도 토양매립재배(4.61±0.07 mg RE/g), 봉지재배(4.31±0.38 mg RE/g), 병재배(4.19±0.24 mg RE/g)에서 유의한 차이가 없었다($p<0.05$). Seo (2016)에 보고에 따르면, 총 폴리페놀함량은 병재배에서 44.53 mg TAE/g으로 원목재배보다 높았고, 총 플라보노이드 함량은 병재배에서 5.96 mg RE/g으로 높아, 본 연구와 다른 경향을 보였다. Lee 등(2007)에 보고에 따르면, 잎새버섯 추출물의 총 폴리페놀 함량은 물 추출물 327 mg TAE/100 g로 보고되었고, 메탄올 추출물은 2.5배가 높은 130 mg TAE/100 g으로 보고되었다. Kim 등(2002b)연구에서는 팽이버섯의 물 추출물의 총 폴리페놀 함량은 3.17-3.50 mg TAE/100 g로 보고하였고, Kim 등(2002a)은 만가닥 버섯의 물 추출물의 총 폴리페놀 함량은 1.52-2.92 mg TAE/100 g으로 보고하였으며, Ahn 등(2006)은 새송이버섯의 폴리페놀 함량을 158-387 mg TAE/100 g으로 보고되어, 잎새버섯이 다른 버섯에 비해 총 폴리페놀함량이 높음을 알 수 있었다. 토양매립재배는 재배관리가 까다롭고 생산량이 재배면적과 기간을 생각할 때 큰 소득이 되지 못하는 단점이 있다. 이를 개선하여 배양기간도 짧고 버섯 수확량도 높일 수 있는 병재배와 봉지재배가 연구되었다. 토양매립재배에서 사용되는 배지조건을 병과 봉지 재배에 적용함으로써 동일 배지(톱밥: 맥주박: 밀기울=85:15:5)를 사용할 경우, 성분함량의 차이를 줄일 수 있었다.

Table 3. Total polyphenol and total flavonoid contents of Maitake mushrooms cultivated by three methods

Group ¹⁾	Total polyphenol (mg TAE ^{2)/g}	Total flavonoid (mg RE ^{2)/g}
Outdoor	4.74±0.15 ³⁾⁴⁾⁵⁾	4.61±0.07 ^a
Bag	4.48±0.15 ^a	4.31±0.38 ^a
Bottle	4.67±0.19 ^a	4.19±0.24 ^a

¹⁾Outdoor: Outdoor cultivation, Bag: Bag cultivation, and Bottle: Bottle cultivation²⁾TAE: tannic acid equivalent³⁾RE: rutin equivalent⁴⁾Values are mean±SD of triplicate determinations (n=3)⁵⁾Means with different letters (a-c) within a column indicate significant differences ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test

베타글루칸, 알파글루칸 함량

β -glucan은 다당체의 일종으로 암세포를 직접 사멸시키지 않고, 대식세포를 활성화시켜 암세포가 있는 체내로 들어가 사이토카인이 분비를 촉진시키는 방법으로 면역세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Manzi 등, 1999; Rajarathnam 등, 1998). α -글루칸 또한 혈중 총콜레스테롤을 낮추는 등 NK세포를 활성화하여 항암작용을 하며, 강력한 면역 활성을 가지고 있다(Masuda 등, 2019). 잎새버섯 재배별로 β -glucan 함량을 비교하였을 때(Fig. 2) 토양매립재배(38.05±0.41%)가 병재배(32.77±1.27%)와 봉지재배(31.42±0.34%)보다 유의적으로 높게 나왔고, α -glucan 함량은 토양매립재배(3.35±0.42%)>병재배(2.18±1.31%)>봉지재배(1.80±0.34%)의 순으로 나왔다($p<0.001$). β -glucan 함량과 α -glucan 함량은 같은 배지에서도 재배기간에 따라 차이를 보였다. 토양매립재배는 병재배와 봉지재배와 달리 오랜시간(약 4-5개월) 노지의 수분뿐만 아니라 토양 중 무기물과 유기물 등의 양분을 흡수하고 영양 성분이 다른 재배법보다 높다고 기록되어 있다(RDA, 2020). 따라서, 버섯 재배기간이 길수록 양분 흡수가 증가되어 다른 재배 방법보다 주요성분의 함량이 더 높게 나온 보고에 따라, β -glucan 함량과 α -glucan 함량이 토양매립재배에서 더 높게 나온 것으로 사료된다. 또한, Kim 등(2007)에 의하면 자실체는 봉지재배보다는 병재배가 배지내의 영양소를 매우 활발하게 흡수하였고, 이는 병재배가 봉지재배보다 산소투과율이 높은 이유라 판단된다. Cho 등(1998)에 의하면 버섯은 생체식품으로 호흡작용을 하여 O₂을 소비하고 CO₂를 발생하며 호흡활동을 하고, 호흡활동과 속도는 버섯의 영양분, 품질의 영향을 준다고 하였다.

Cho 등(2013)에 의하면, 영지버섯의 β -glucan 함량이 15-20%인 것에 비해 원목 재배된 잎새버섯의 β -glucan 함량이 28.6%로 높았고, Je 등(2018)에 의하면 잎새버섯의 β -glucan 함량은 16.10-24.51%였고, 새송이버섯은 28.29-39.39%, 이슬송이는 23.05-29.48%로 보고하였다. 또한, Um 등(2010)에 의하면 β -glucan 함량이 버

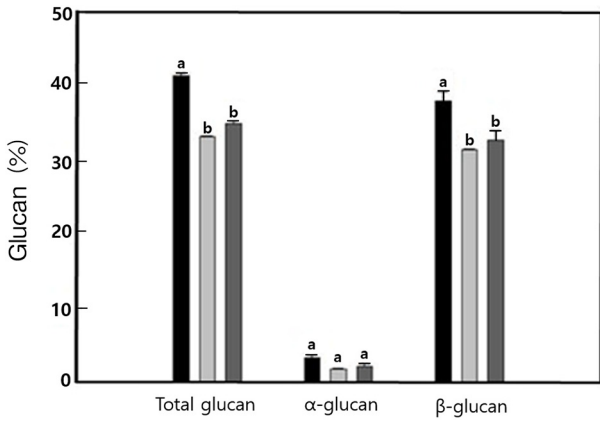


Fig. 2. Total, α-glucan and β-glucan contents of Maitake mushrooms cultivated by three methods. 1) ■: Outdoor cultivation, ▒: Bag cultivation, ▓: Bottle cultivation 2) Means with different letters (a-b) within a column indicate significant differences ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

섯 100 g 당 새송이버섯은 22-38 g, 표고버섯은 22 g, 잎새버섯은 15-20 g 존재하는 것으로 알려져 있어, 본 연구의 잎새버섯 '데미' 품종의 베타글루칸 함량과는 차이가 있었다.

DPPH와 ABTS radical 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 DPPH가 짙은 자색의 안정한 자유 라디칼로 항산화 물질에 의해 환원되면서 짙은 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 측정한다. 잎새버섯의 DPPH radical 소거능 IC_{50} (Table 4)은 각각 토양재배 3.08±0.03 μg/mL, 봉지재배 3.17±0.12 μg/mL 나타났고, 병재배 3.06±0.11 μg/mL로 재배별로 유의한 차이가 없었다($p < 0.05$). 열수추출한 노루궁뎅이 버섯은 1 mg/mL에서 DPPH 라디칼 소거능이 81.4% (Kim 등, 2013)로 보고되었고, 영지버섯은 에탄올 추출물에서 DPPH라디칼 소거능이 67.2% 보고되었다(Oh 등, 2005).

ABTS 라디칼 소거활성은 산화 유도제인 potassium persulfate와 반응에 의해 형성된 ABTS양이온이 시료중의 항산화 물질에 의해 제거될 때 일어나는 탈색반응을 이용하여 물질의 항산화 능력을 측정하는 방법이다. 본 연구의 ABTS radical 소거능 IC_{50} 은 각각 병재배(5.51±0.13 μg/mL) < 봉지재배(6.02±0.19 μg/mL) < 토양재

Table 4. DPPH and ABTS radical scavenging activities of Maitake mushrooms cultivated by three methods

Group ¹⁾	DPPH IC_{50} ²⁾ (μg/mL)	ABTS IC_{50} ³⁾ (μg/mL)
Outdoor	3.08±0.03 ⁴⁾⁵⁾	6.77±0.07 ^a
Bag	3.17±0.12 ^a	6.02±0.19 ^{ab}
Bottle	3.06±0.11 ^a	5.51±0.13 ^b

¹⁾Outdoor: Outdoor cultivation, Bag: Bag cultivation, and Bottle: Bottle cultivation
²⁾Concentration giving a 50% decrease of DPPH radical
³⁾Concentration giving a 50% decrease of ABTS radical
⁴⁾Values are mean±SD of triplicate determinations (n=3)
⁵⁾Means with different letters (a-c) within a column indicate significant differences ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

배(6.77±0.07 μg/mL)순으로 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). Seo (2016)의 보고에 의하면, 재배지의 토양분석 결과 잎새버섯 자실체 발생에 있어서 가장 중요한 것은 재배지의 토양 즉, pH이며 pH가 낮으면 상관 없이 적정함량 기준이 5.5-6.5 보다 높으면 자실체 발생에 영향을 미친다고 하였다. 본 연구의 생리활성 차이는 토양의 pH 및 영양성분의 영향을 받았을거라 판단된다. Kwon 등(2018)의 보고에 의하면, 잎새버섯의 ABTS radical 소거능은 99.4%로, 산노타리버섯(94.4%) 보다 높게 나왔고, Song 등(2003)이 보고한 영지버섯의 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능을 91.3%보다 높게나왔다. 또한, Lee 등(2007)의 보고에 따르면, 잎새버섯 열수추출물에서 DPPH radical 소거능이 45.2-72.4%로 높았으며, 메탄올 추출물에서는 37.1-65.0%로 본 연구와 같이 높은 활성이 보고되었다.

Nitric oxide (NO) 생성량 및 세포생존율

재배 방법에 대한 잎새버섯의 추출물의 항염증 효과를 알아보기 위하여 RAW264.7에 1 μg/mL의 LPS를 잎새버섯 추출물(1000, 5000, 10000 μg/mL)로 처리하여 24시간을 반응시켰다(Fig. 3). NO 생성량은 LPS 처리군에서 5.7±0.36 μM, LPS 비처리군에서 0.1±0.01 μM로 NO생성이 약 5배 정도로 증가하였다. 잎새버섯 추출물에서 병재배(0.8±0.50 μM), 봉지재배(0.8±0.36 μM), 토양재배(0.9±0.14 μM)의 모든 재배별에서 LPS 처리군에 비해 NO 생성이 유의하게 저해되었으며($p < 0.001$), LPS 단독처리군에 비해

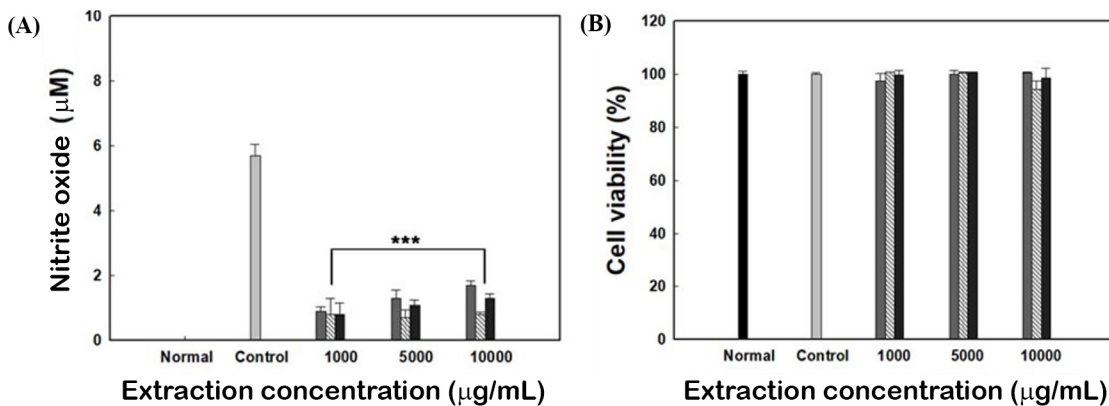


Fig. 3. Nitrite oxide (A) and cell viability (B) of Maitake mushrooms cultivated by three methods. 1) ▒: Control (LPS alone), ■: Outdoor cultivation, ▒: Bag cultivation, ▓: Bottle cultivation 2) Values are means±SD of three independent experiments. * $p < 0.001$ versus the non-treated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus LPS-treated control group

병재배는 86.55%, 봉지재배는 85.71%, 토양매립재배는 84.87%의 저해율을 보였다.

정상 세포주에 대한 잎새버섯 재배별 세포 독성을 평가하기 위해 WST assay를 수행하였다. 모든 추출물을 1000, 5000, 10000 µg/mL의 농도로 하루 동안 세포에 처리한 결과, 대식세포의 생존율은 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으므로 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

요 약

본 연구에서는 잎새버섯 재배별(토양매립재배, 봉지재배, 병재배) 일반성분(수분, 단백질, 지방, 회분, 탄수화물, 조섬유) 및 무기성분(Ca, K, Mg, Na, Fe, Mn, Cu, P), α-글루칸, β-글루칸, 총 폴리페놀함량, 항산화 활성(DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능), Nitric oxide (NO) 생성량의 효과를 측정하였다. 연구결과 봉지재배에서 조단백질(22.17±0.20 mg/100 g)과 조회분(7.60±0.16 mg/100 g), 조섬유(18.35±0.41 mg/100 g)가 다른 재배방법보다 높게 나왔고, 병재배에서는 조지방(3.66±0.03 mg/100 g)이 유의하게 높게 나왔다. 또한, 토양매립재배에서는 탄수화물(72.25±0.11 mg/100 g)이 유의하게 높게 나왔다. K (2200.25±14.93 mg/100 g)와 Mg (73.47±1.93 mg/100 g), Mn (0.62±0.02 mg/100 g), Cu (2.46±0.02 mg/100 g)는 병재배에서 높게 나왔고, Ca (15.95±3.05 mg/100 g)와 Fe (12.67±1.12 mg/100 g)은 토양매립재배에서 높았다. 잎새버섯 α-글루칸과 β-글루칸은 토양매립재배에서 두 처리군 보다 높게 나타났다. 잎새버섯 재배방법에 따라 총 폴리페놀함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거능은 유의한 차이를 보이지 않았고, ABTS 라디칼 소거능 IC₅₀은 병재배(5.51±0.13 µg/mL)에서 다른 재배방법보다 낮게 나타났다. NO 생성은 병재배(86.55%), 봉지재배(85.71%), 토양매립재배(84.87%)에서 LPS 처리군에 비해 유의하게 저해되었다($p < 0.001$). 본 연구를 통해 잎새버섯의 재배방법에 따른 품질 특성과 항산화 활성을 비교하였다. 재배방법에 따라 성분함량이 유의한 차이가 없거나, 토양매립재배 뿐만 아니라 병, 봉지재배에서도 생리활성이 높게 나타난 것을 확인할 있었다. 1년에 한번 수확이 가능한 토양매립재배의 단점을 보완하여 한달에 한번 수확이 가능한 병, 봉지재배방법이 토양매립재배에 비하여 품질의 차이가 없는 것으로 나타나 향후 토양매립재배를 대신하여 농가 보급에 적합한 재배방법으로 활용될 수 있을거라 사료된다.

References

- Ahn MS, Kim HK, Seo MS. Physicochemical characteristics of ethanol extracts from each part of the *Pleurotus eryngii*. Korean J. Food Cult. 21: 297-302 (2006)
- AOAC. Official Method of Analysis of AOAC Intl. 17th ed. International Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg MD, USA (2000)
- Cho JH, Lee JY, Lee MJ, Oh HN, Kang DH, Jhune CS. Comparative analysis of useful β-glucan and polyphenol in the fruiting bodies of *Ganoderma* spp. J. Mushrooms Sci. Prod. 11: 164-170 (2013)
- Cho SH, Lee DS, Lee SD, Kim NG, Ryu JS. Modified atmosphere packaging for keeping freshness of enoki mushroom (*Flammulina velutipes*). J. Korea Soc. Food Sci. Nutr. 27: 1137-1142 (1998)
- Cui FJ, Tao WY, Xu ZH, Guo WJ, Xu HY, Ao ZH. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. Bioresour. Technol. 98: 395-401 (2007)
- Custódio L, Ferreira AC, Pereira H, Silvestre L, Vizetto-Duarte C, Barreira L, Varela J. The marine halophytes *Carpobrotus edulis* L. and *Arthrocnemum macrostachyum* L. are potential sources of nutritionally important PUFAs and metabolites with antioxidant, metal chelating and anticholinesterase inhibitory activities. Bot. Mar. 55: 281-288 (2012)
- Dissanayake AA, Zhang CR, Mills GL, Nair MG. Cultivated maitake mushroom demonstrated functional food quality as determined by in vitro bioassays. J. Funct. Foods. 44: 79-85 (2018)
- Fan YN, Wu XY, Zhang M, Zhao T, Zhou Y, Han L. Physical characteristics and antioxidant effect of polysaccharides extracted by boiling water and enzymolysis from *Grifola frondosa*. Int. J. Biol. Macromol. 48: 798-803 (2011)
- Harada N, Kodama N, Nanba H. Relationship between dendritic cells and the D-fraction-induced Th-1 dominant response in BALB/c tumor-bearing mice. Cancer Lett. 192: 181-187 (2003)
- Je HJ, Kim HY, Ha GJ, ha Ij, Cho SR. Quality characteristics of *Pleurotus eryngii*, *Lentinus edodes* GNA01 and *Grifola frondosa* as affected by different drying methods. Korean J. Food Preserv. 4: 181-188 (2018)
- Kabir Y, Yamaguchi M, Kimura S. Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) and maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. J. 33: 341-346 (1987)
- Kim DH, Park SR, Debnath T, Hasnat A, Pervin M, Lim BO. Evaluation of the antioxidant activity and anti-inflammatory effect of *Hericium erinaceus* water extracts. Korean J. Medicinal Crop. Sci. 21: 112-117 (2013)
- Kim YI, Bae JS, Huh JW, Kwak WS. Monitoring of feed-nutritional components, toxic heavy metals and pesticide residues in mushroom substrates according to bottle type and vinyl bag type cultivation. J. Anim. Sci. Technol. 49: 67-68 (2007)
- Kim HK, Choi YJ, Jeong SW, Kim KH. Functional activities of microwave-assisted extracts from *Lyophyllum ulmarium*. Korean J. Food Preserv. 9: 385-390 (2002a)
- Kim HK, Choi YJ, Kim KH. Functional activities of microwave-assisted extracts from *Flammulina velutipes*. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 1013-1017 (2002b)
- Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 80-85 (1995)
- Kodama N, Harada N, Nanba H. A polysaccharide, extract from *Grifola frondosa*, induces Th-1 dominant responses in carcinoma bearing BALB/c mice. Jpn. J. Pharmacol. 90: 357-360 (2002)
- Kubo K, Aoko H, Nanba H. Anti-diabetic activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). Biol. Pharm. Bull. 17: 1106-1110 (1994)
- Kubo K, Nanba H. Anti-hyperlipidosis effect of maitake fruit body (*Grifola frondosa*). Biol. Pharm. Bull. 20: 781-785 (1997)
- Kwon HJ. Gangwon Maitake Mushroom Cooking Recipe. Gangwon-do Agricultural Research. No: 72-6420057-000076-01 (2018)
- Lee JS, Lee JS. Physiological function and development of beverage from *Grifola frondosa*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 36(10): 1241-1247 (2007)
- Lee GJ, Park YH, Joo BJ, Lee BY, Joo JH, Park DS, Kim KH. Cultural characteristics of new oyster mushroom variety "Cheongsan". J. Mushrooms Sci. Prod. 5: 21-24 (2007)
- Liang XL, Wang XL, Li Z, Hao QH, Wang SY. Improved in vitro assays of superoxide anion and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity of isoflavones and isoflavone metabolites. J. Agric. Food Chem. 58: 11548-11552 (2010)
- Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. Food Chem. 65: 477-482 (1999)
- Masuda Y, Nakayama Y, Mukae T, Tanaka A, Naito K, Konishi M. Maturation of dendritic cells by maitake α-glucan enhances anti-cancer effect of dendritic cell vaccination. Int. J. Immunopharmacol. 67: 408-416 (2019)
- Nanba H, Kodama N, Schar D, Turner D. Effects of maitake (*Grifola frondosa*) glucan in HIV-infected patients. Mycoscience. 41: 293-295 (2000)
- Oh SI, Lee MS. Antioxidative and antimutagenic effects of *Ganoderma lucidum* Krast extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 18:

- 54-62 (2005)
- Park MH, Choi BG, Lim SH, Kim KH, Heo NK, Yu SH, Kim JD, Lee KJ. Analysis of general components, mineral contents, and dietary fiber contents of *Synurus deltoides*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 40: 1631-1634 (2011)
- Park YH, Lim SH, Kim HY, Park MH, Lee KJ, Kim KH, Kim YG, Ahn YS. Biological activities of extracts from flowers of *Angelica gigas* Nakai. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 40: 1079-1085 (2011)
- Rajarithnam S, Shashirekha MN, Bano Z. Biodegradative and bio-synthetic capacities of mushrooms: present and future strategies. Crit. Rev. Biotechnol. 18: 91-236 (1998)
- Rural Development Administration (RDA). Available from: <http://www.nongsaro.go.kr>. Accessed Aug. 6, 2020.
- Seo HY. The effects of log cultivation conditions on fruiting body and physiological activities in *Grifola frondosa*. The graduate school, Ms thesis, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Korea (2016)
- Singleton VL, Orthofer R, Amuela-Raventos RM. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means Folin-Ciocalteu reagent. Method. Enzymol. 299: 152-178 (1999)
- Song JH, Lee HS, Hwang JG, Jeong TY, Hong SL, Park GM. Physiological activities of *Phellinus ribis* extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 690-695 (2003)
- Um SN, Jin GE, Park KW, Yu YB, Park KM. Physiological activity and nutritional composition of *Pleurotus* species. Korean J. Food Sci. Technol. 42: 90-96 (2010)
- Yiasmin MN, Islam MS, He H, Liu Y, Wang M, Yang R, Hua X. Purification, isolation, and structure characterization of water soluble and insoluble polysaccharides from Maitake fruiting body. Int. J. Biol. Macromol. 164: 1879-1888 (2020)
- Yu YJ, Choi KH, Seo SY, Kang CH, Lee GK, Kim HJ. Comparison of growth characteristics of *Ganoderma lucidum* based on media and environmental conditions. J. Mushrooms Sci. Prod. 15: 104-110 (2017)
- Yuki M, Yoshiaki N, Takehiro M, Akihiro T, Kenta N, Morichika K. Maturation of dendritic cells by maitake α -glucan enhances anti-cancer effect of dendritic cell vaccination. Int. J. Immunopharmacol. 67: 408-416 (2019)
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64: 555-559 (1999)
- Zhuang C, Wasser SP. Medicinal value of culinary-medicinal maitake mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray (Aphyllophoromycetidae). Int. J. Med. Mushrooms. 6: 287-313 (2004)