

## 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 균사체 발효물의 생리활성

유 광 원\*

충청북도 증평군 대학로 61 한국교통대학교 보건생명대학 식품생명학부 식품영양학전공 27909

### Physiological Activity of Small Black Soybean-*Hericium erinaceum* Mycelia Ferments

Kwang-Won Yu \*

Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

#### ABSTRACT

To utilize as materials of functional *Sunsik*, small black soybean (*Rhynchosia volubilis*, RV-1)-*Hericium erinaceum* mycelia ferments (RVHE-1) with the enhanced physiological activity than RV-1 were prepared, and anti-oxidant and immunostimulating activities of their solvent extracts were investigated. In anti-oxidant component content and radical scavenging activity, RVHE-1-HE (hot-water extract) and -E (EtOH extract) did not show a much increase compared to non-ferments (RV-1). There was also no significant difference in intestinal immune system modulating activity *via* Peyer's patch in all extracts of RV-1 and RVHE-1. However, both extracts from RVHE-1 showed a significantly higher than those of RV-1 in GM-CSF production, which is a cytokine involved in the proliferation and differentiation of bone marrow cells produced from Peyer's patch cells. Macrophage stimulating activity and production of IL-12 were also significantly higher in RVHE-1-HW than in the non-ferments. Macrophage stimulating activity and IL-12 production of RVHE-1 showed significantly higher than RV-1-HW. Based on these results, it could be suggested that RV-*H. erinaceum* ferments was more active than the non-fermented RV and could be fully utilized as a raw material for functional *Sunsik*.

Key words : *Sunsik*, small black soybean, *Hericium erinaceum* mycelia, solvent extracts, physiological activity

#### 1. 서 론

쥐눈이콩(서목태, *Rhynchosia volubilis*)은 껍질은 까맣고 윤이 나며 속은 파란색으로 검정콩보다 작아 쥐눈처럼 생겼다고 하여 붙여진 이름으로 한방에서는 약콩으로도 불리는데, 예전에는 요리에 활용하지 않았으나 몸에 좋다고 해서 밥에 넣어 먹기도 하는 검정콩 일종으로 서목태 콩에는 단백질 30~40%, 탄수화물 35%(25%는 식이성 섬유, 10%는 올리고당), 지질 10~20%, 비타민 3~5%, 칼슘, 레시틴, 이소플라본 등이 함유되어 있다(1, 2). 서목태는 다른 콩과 달리 혈액순환을 촉진하는 효능을 지니고 있어 약용으로 질병 예방과 치료에 많이 사용되고 있는데, 특히 말기 암환자에게 영양의 공급 및 종양의 억제를 위해 다른 약물과 함께 배합하여 복용하면 서목태의 활혈작용으로 항암약물의 투과

성을 높인다고 하며, 그 외에 비만, 당뇨, 고지혈증, 어린이 성장, 신장질환 및 산후풍 등에 많이 사용되고 있다(3, 4). 또한, 버섯은 오래전부터 식품으로서의 활용성뿐만 아니라, 다양한 효능으로 민간에서 질병을 예방하는 우수한 약용식물로 알려져 있으므로 버섯 균사체와의 천연식물의 고체 발효는 버섯 자체의 생리활성 성분의 이행과 함께 발효과정에서 다양한 생리활성 성분을 형성할 수 있으므로 작물의 생리활성 증진을 위한 생물학적 전환기법으로서 최근 많은 산업적 활용이 검토되고 있다(5, 6). 한편, 선식은 다양한 방법으로 여러 가지 곡식을 익혀 이를 분쇄하는 가공을 거침으로 쉽게 물에 타 먹을 수 있게 만든 조리가 간편한 음식으로, 식사를 쉽게 해결하기 위하여 영양이 풍부한 다양한 곡식(현미, 찹쌀, 보리쌀, 검정콩, 검정깨, 들깨, 울무 등)을 가공하여 혼합가루로 섭취하는 것으로 영양 파괴를 최소화하기 위해 -40℃ 이하에서 얼려서 건조한 날 것으로 섭취하는 생식과는 가공공정이 다르다(7, 8). 선식은 불가(佛家)에

\* kwyu@ut.ac.kr

서는 참선할 때 위에 부담을 주지 않고 머리를 맑게 하기 위해 먹었으며, 선식의 편리함과 영양가가 알려지면서 민간에 전래 되었고, 민간에서는 곡식 이외에도 각종 채소와 해조류까지 첨가하여 각종 기능성 선식(환자영양식, 체중조절식, 위보호식, 수험생영양식 등)으로도 발전되었다(9, 10). 또한, 소화기가 약한 사람들은 곡식류 껍질에 포함된 셀룰로오스 섬유소가 소화를 방해할 뿐 아니라, 피친 성분이 위장장애를 일으키고, 소화불량, 설사 등을 유발할 수도 있고 특정 재료에 대한 알레르기가 있는 사람의 경우에는 생식보다는 소화 흡수가 잘 되는 선식이 좋은 것으로도 알려져 있다(11). 최근에는 맞춤 영양공급의 기능성 선식이 관심을 받고 있는데, 대표적으로 수험생 영양선식, 변비 개선식, 위 보호식, 간 보호식 및 체중 조절식 등이 출시되었으나 아침 식사를 거르기 쉬운 바쁜 직장인 및 갱년기 여성의 건강증진을 위한 선식의 필요성도 강조되고 있다(9). 특히, 중장년기 이후 직장인은 다양한 스트레스, 불규칙하고 불균형된 식사 및 음주 등으로 인하여 면역력의 저하에 따른 다양한 만성질환 유발이 급증하는 시기로 알려져 있으며 갱년기 이후 여성은 여성호르몬 감소에 기인하는 다양한 신체의 변화에 따른 신체적인 질병의 발생이 동반될 수 있어 상당한 주의가 요구되는 생애주기로 알려져 주의가 요구된다(12, 13). 따라서 쥐눈이콩의 생리활성을 증가시키기 위하여 노루궁뎅이 버섯 균사체의 고체발효물을 제조한 후, 이를 활용한 아침식사 대용 선식으로 개발하기 위하여 본 연구에서는 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 균사체 발효물을 제조하고 고체발효물로부터 용매추출물을 조제한 후 면역활성을 검토하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 노루궁뎅이 버섯 균사체 배양 및 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 균사체 고체발효물 제조

농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터(Gyeonggi-do, Korea)로부터 분양받은 노루궁뎅이 버섯 균사체(*Hericium erinaceum*, HE)를 potato dextrose agar(PDA, BD, Detroit, MI, USA) 사면배지에서 30°C로 10일간 배양한 후 4°C에서 보존하면서 4주마다 계대 배양하였으며, 최적 액체배지로 선정된 potato dextrose broth(PDB, BD)에서 진탕배양기(Jeio Tech. Daejeon, Korea)를 이용하여 30°C에서 배양하여 고체 배양을 위한 노루궁뎅이 버섯 균사체 종균으로 사용하였다. 또한, 천연배지로 사용된 국내산 쥐눈이콩(*Rhynchosia volubilis*, RV)을 청주 대형마트에서 구입한 후 5배수 증류수에서 침지하고, 121°C에서 120분간 고압멸균하였다. 멸균

후에는 액체배양한 노루궁뎅이 버섯 균사체 종균 10%를 접종하고, 배양기에서 4~7일간 고체배양한 후 60°C drying oven(Jeio Tech.)에서 48시간 건조하여 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 균사체 발효물(RVHE-1)로 제조하였다. 한편, 시료 대조군으로는 동일 조건에서 비발효한 쥐눈이콩을 제조하여 시료의 활성비교용으로 사용하였다(비발효물; RV-1).

### 2. 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 균사체 발효물의 용매추출물 조제

쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 균사체 고체배양을 이용하여 제조한 발효물은 시료 대조군인 비발효 쥐눈이콩과의 생리활성 증진 여부를 확인하기 위해 열수 추출물로 조제하였다. 동결건조시킨 쥐눈이콩-노루궁뎅이버섯 균사체 고체발효물(RVHE-1)의 열수 추출물을 조제하기 위하여 발효물에 20배의 증류수를 첨가하여 homogenizer로 5,000 rpm에서 10분간 분쇄한 후 half volume이 되도록 decoction 하였으며, 여과지(No. 2)를 이용하여 잔사와 추출 여액을 분리한 후 잔사는 다시 20배의 증류수를 첨가하여 재추출하였다(2회). 추출 여과액은 원심분리(10,000×g, 4°C, 30분)를 통해 불용성 침전물을 제거하고 농축 및 동결건조하여 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 균사체 발효물의 열수추출물(RVHE-1-HW)로 조제하였다. 한편, 주정추출물은 동결건조한 고체발효물에 대해 각각 5배의 95% 에탄올을 첨가한 후 stirring mantle에서 2,000 rpm으로 70°C의 온도로 2시간 동안 환류시켜 추출하였다. 추출액은 여과지를 이용하여 잔사와 추출 여액으로 분리하고 잔사는 다시 5배의 95% 에탄올을 첨가한 후 추출 여액은 열수추출물과 마찬가지로 원심분리, 농축 및 동결건조를 통하여 쥐눈이콩-노루궁뎅이버섯 균사체 발효물의 주정추출물(RVHE-1-E)로 조제하였다.

### 3. 발효물 용매추출물의 항산화 활성

항산화 성분 분석 중 총 polyphenol 화합물 함량은 Folin-Ciocalteu's 시약이 알칼리 조건에서 고체발효물 열수 및 주정추출물 시료의 polyphenol 화합물에 의해 환원되면 청색에서 노란색으로 발색되는 원리를 이용하여 분석하였다(14). 즉, 발효물의 추출물 시료 100 μL에 알칼리 조건을 형성하기 위해 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 2 mL를 가한 후 3분간 반응시키고 50%의 Folin-Ciocalteu's 시약 100 μL를 첨가해 30분간 반응된 색을 750 nm에서 측정함으로써 주요한 항산화 성분인 총 polyphenol의 함량을 확인할 수 있었다. 표준물질로는 gallic acid를 사용하여 표준곡선을 작성한 후 발효물 시료에

대한 gallic acid 상당량(GAE)의 %로 나타내었다. 한편, 총 flavonoid 함량 측정에는 flavonoid에 알칼리를 반응시키면 flavan 또는 flavonol 배당체가 황색을 나타내는 것을 원리로 하여 측정하였다. 즉, 80% 에탄올을 사용해 적당히 희석한 발효물의 추출물 시료 500  $\mu\text{L}$ 에 10% aluminium nitrate 100  $\mu\text{L}$ 와 1 M potassium acetate 100  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 암소에서 40 분간 방치하고, 변화한 흡광도 값을 415 nm에서 측정하여 발효물 시료에 대한 표준물질인 quercetin 상당량(QE)의 %로 나타내었다. 한편, 항산화 활성은 화학적으로 안정화된 free radical인 DPPH 및 ABTS는 항산화 물질과 반응하면 전자를 내어주면서 라디칼이 소멸되고 색이 변하게 되므로, 이를 실험에 응용하여 발효물 용매추출물에 따라 DPPH 및 ABTS의 색이 열리는 정도를 측정하여 항산화력으로 나타내었다(15). 먼저, DPPH radical을 이용한 항산화력 측정은 0.2 mM DPPH radical 용액에 발효물의 추출물 시료 50  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 상온에서 60분간 반응시켜 반응액의 흡광도 변화를 517 nm에서 측정하여 발효물 시료에 대한 표준물질인 ascorbic acid의 상당량(ascorbic acid equivalent antioxidant capacity/AEAC)의 %로 나타내었다. 다음으로 ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 7.4 mM ABTS 용액과 2.6 mM potassium persulphate 용액을 12시간 이상 암소에 방치하여 청록색의 ABTS radical을 형성시킨 다음 734 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 희석하여 사용하였다. 이 용액에 발효물의 추출물 시료 50  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 상온에서 60분 방치시켜 반응액의 흡광도 값의 변화를 측정하고 발효물의 추출물 시료에 대한 % AEAC로 나타내었다.

#### 4. 발효물 용매추출물의 면역활성

생후 6주령 C3H/He과 ICR 마우스(웅성)를 (주)대한실험동물(Chungbuk, Korea)로부터 구입하여 사육조에 5마리씩 넣고, 정수된 물과 실험동물용 펠릿사료((주)삼양사, Incheon, Korea)를 자유공급하고, 스트레스를 받지 않도록 주의하여 배양하였으며, 모든 실험은 고려대학교 실험동물윤리위원회(KUIACUC-2016-159) 규정에 입각하여 진행하였다. 먼저, Peyer's patch를 경유한 장관면역활성 검색은 장관면역계를 구성하는 소장 Peyer's patch로부터 얻은 세포를 활성화하여 골수세포 증식인자의 생산을 촉진하는 정도를 측정하는 Yu 등(16)의 방법을 변형하여 행하였다. 즉, C3H/He 마우스의 소장외벽에 존재하는 Peyer's patch로부터 회수한 세포를  $2 \times 10^6$  cell/mL로 조정하여 96-well plate에 180  $\mu\text{L}$  plating하고 적당히 희석된 시료 20  $\mu\text{L}$ 와 함께 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 5일 동안 배양하였다. 한편, 골수세포는 동일종

마우스의 대퇴부 뼈로부터 회수하여  $2.5 \times 10^5$  cell/mL의 농도로 조정된 후, 96-well plate에 100  $\mu\text{L}$ 씩 분주하고, 위에서 언급한 Peyer's patch 세포와 시료의 반응으로부터 회수한 상등액(conditioned medium)과 10% FBS/RPMI-1640 배지를 각각 50  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 6일 동안 배양하였다. 최종적으로 발효물의 용매추출물 시료에 의한 Peyer's patch-경유 장관면역 활성화는 6일간 배양된 골수세포에 CCK-8 kit 용액 20  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 4시간 후 450 nm에서 흡광도를 측정하고, 시료에 의한 Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성화는 음성대조군(시료를 함유하지 않은 saline에 마크로파지를 배양한 군)에 대한 상대적인 활성(%)으로 나타내었다. 또한, 발효물의 용매추출물 시료와 Peyer's patch 세포와의 배양을 통해 얻어진 배양 상등액에 골수세포 증식과 관련된 사이토카인인 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)의 생산을 ELISA kit로 측정하여 시료에 의한 Peyer's patch 자극 정도를 검토하였다. 한편, 마크로파지 자극활성은 2 mL의 thioglycollate medium을 복강 주사하여 48~72시간 동안 macrophage 염증반응을 유도시킨 ICR 마우스의 복강에서 macrophage 세포를 회수하고 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지에  $1 \times 10^6$  cell/mL의 농도로 현탁하였다. 조정된 macrophage 현탁액을 96 well plate에 200  $\mu\text{L}$ 씩 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 배양하여 monolayer를 형성시킨 후, non-adherent cell은 3회 세척으로 제거하고 새로운 10% FBS-함유 RPMI-1640 배지 180  $\mu\text{L}$ 와 적당한 농도로 희석된 시료 20  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 재배양시켰다. 발효물 용매추출물 시료의 마크로파지에 대한 독성활성은 24시간 배양된 마크로파지에 CCK-8 kit 용액 20  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 4시간 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 시료가 첨가되지 않은 음성대조군(시료를 함유하지 않은 saline에 마크로파지를 배양한 군)에 대한 세포의 생존율(%)로 나타내었다(17, 18). 한편, 시료와 마크로파지의 배양을 통해 얻어진 배양 상등액에 마크로파지 활성화에 따라 생산되는 사이토카인인 interleukin(IL)-12(19)의 생산정도를 ELISA kit로 측정하여 발효물 용매추출물 시료에 따른 마크로파지 자극 정도를 검토하였다.

#### 5. 통계처리

모든 실험결과는 3회 반복의 결과를 평균 $\pm$ 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었고, 면역활성은 SPSS V26(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's *t*-test로 계산하여 각각  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검증하였다. 또

한, 항산화 활성 및 구성분 분석에서는 유의성 평가를 위해 ANOVA를 실시하여 각 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

### III. 실험결과 및 고찰

#### 1. 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 균사체 발효물 제조 및 용매추출물 조제

다양한 생리활성이 알려져 있으면서 오래전부터 식용으로 사용하여 식품의약품안전처(MFDS)에 식품으로 등록된 노루궁뎅이 버섯 균사체(*Hericium erinaceum*, HE)를 이용하여 생리활성이 증진된 쥐눈이콩(*Rhynchosia volubilis*, RV)-노루궁뎅이 버섯 균사체 발효물(RVHE)을 조제하였다. 침지수를 제외한 침지콩만의 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 균사체 발효물(RVHE-1)에서 수율은 열수추출물이 주정추출물보다 2.5~3배 정도 높았다. 쥐눈이콩 비발효 열수추출물(RV-1-HW)에서 주성분인 중성당과 단백질은 유사한 함량(47.5와 46.7%)을 나타내었고, 발효물 열수추출물(RVHE-1-HW)은 단백질이 감소(30.6%)되었으며, 상대적으로 중성당과 산성당은 증가(60.0과 9.4%)하는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 발효과정 중 균사체의 단백질 가수분해에 기인하는 것으로 사료되며 비발효물과 발효물의 구성분이 차이를 보이고 있음을 알 수 있었다(Table 1).

비발효 및 발효물 주정추출물은 거의 대부분 중성당(91.2%와 92.4%)으로 구성되어 있음을 나타냈는데 에탄올 극성을 고려할 때 이들은 주로 당당류로 보이며, 발효 유무와 관계없이 유사하게 높은 구성분 비율을 나타내었다. 산성당이 6.5~7.2%를 나타낸 반면, 단백질은 극히 소량 함유되어(1.1~1.6%) 용매 극성에 따라 조제된 주정추출물이 열수추출물과는 완전히 다른 구성분 비율을 나타내고 있음을 확인하여(Table 1) 추출물의 면역활성 결과를 통해 쥐눈이

콩 발효물의 활성에 작용하는 주요 구성분의 영향을 검토할 수 있었다.

#### 2. 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 균사체 발효물로부터 조제된 용매추출물의 항산화 활성

일반적으로 식물에는 항산화 성분으로 알려진 폴리페놀과 플라보노이드 화합물이 함유되어 항산화 활성을 나타내고 있으며, 두류에도 이러한 항산화 성분이 함유되어 있으므로 쥐눈이콩 비발효 및 발효물의 용매추출물에 대하여 항산화 성분으로 알려져 있는 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량 변화를 측정하였다. 먼저, 비발효 쥐눈이콩의 열수추출물(RV-1-HW)은 총 폴리페놀이  $5.22 \pm 0.34$  mg gallic acid equivalent(GAE)/100 mg sample로 가장 높은 함량을 보였고 주정추출물(RV-1-E)은  $3.88 \pm 0.08$  mg GAE/100 mg으로 RV-1-HW보다 낮았으며 총 플라보노이드 함량은  $1.38 \pm 0.11$  mg quercetin equivalent(QE)/100 mg(RV-1-HW)과  $1.71 \pm 0.09$  mg QE/100 mg(RV-1-E)으로 주정추출물이 약간 높은 경향을 나타내었다(Table 2). 한편, 발효물의 경우에 총 폴리페놀은 열수추출물(RVHE-1-HW,  $3.38 \pm 0.12$  mg GAE/100 mg)과 주정추출물( $3.24 \pm 0.12$  mg GAE/100 mg) 모두 비발효 쥐눈이콩(RV-1-HW;  $5.22 \pm 0.34$  mg GAE/100 mg 및 RV-1-E;  $3.88 \pm 0.08$  mg GAE/100 mg)보다 낮은 반면, 총 플라보노이드에서 발효물 열수추출물은  $1.41 \pm 0.06$  mg QE/100 mg으로 비발효균과 유사하였으나 주정추출물(RVHE-1-E,  $1.84 \pm 0.13$  mg QE/100 mg)에서는 비발효균( $1.71 \pm 0.09$  mg QE/100 mg)보다 약간 증가하였다(Table 2).

다음으로 이러한 추출물에 대한 라디칼 소거활성을 조사한 결과, ABTS 라디칼 소거능에서는 총 폴리페놀 함량과 유사하게 비발효 열수추출물인 RV-1-HW에서 가장 높은  $2.17 \pm 0.00$  mg AEAC/100 mg sample을 나타낸 반면, 발효물인 RVHE-1-HW는  $1.48 \pm 0.03$  mg AEAC/100 mg의 항산화

**Table 1. Yield and component content of solvent extracts from small black soybean-*Hericium erinaceum* mycelia ferments**

Yield & content (%) <sup>1)</sup>	RV-1-HW <sup>2)</sup>	RVHE-1-HW	RV-1-E	RVHE-1-E
Yield	17.4	13.9	4.2	5.0
Neutral sugar	$47.5 \pm 2.2^a$	$60.0 \pm 2.2^b$	$91.2 \pm 4.1^c$	$92.4 \pm 4.4^d$
Uronic acid	$5.8 \pm 0.3^a$	$9.4 \pm 1.4^c$	$7.2 \pm 1.2^b$	$6.5 \pm 1.2^b$
Protein	$46.7 \pm 2.1^c$	$30.6 \pm 1.1^b$	$1.6 \pm 0.2^a$	$1.1 \pm 0.2^a$

<sup>1)</sup> Yield percentage (%) against raw material, component % against each solvent extracts.  
<sup>2)</sup> RV-1-HW & RVHE-1-HW; hot-water extract from non-fermented and fermented small black soybean (SBS)-*H. erinaceum* mycelia ferments, RV-1-E & RVHE-1-HW; EtOH extract from non-fermented and fermented SBS-*H. erinaceum* mycelia ferments.

**Table 2. Anti-oxidative component of solvent extracts from small black soybean-*Hericium erinaceum* mycelia ferments**

Content <sup>1)</sup>	RV-1-HW <sup>2)</sup>	RVHE-1-HW	RV-1-E	RVHE-1-E
Flavonoid (mg QE/100 mg)	1.38±0.11 <sup>a</sup>	1.41±0.06 <sup>a</sup>	1.71±0.09 <sup>ab</sup>	1.84±0.13 <sup>ab</sup>
Polyphenol (mg GAE/100 mg)	5.22±0.34 <sup>c</sup>	3.38±0.12 <sup>a</sup>	3.88±0.08 <sup>ab</sup>	3.24±0.12 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Content: mg QE/100 mg; mg quercetin equivalent/100 mg each solvent extracts, mg GAE/100 mg; mg gallic acid equivalent/100 mg each solvent extracts.

<sup>2)</sup> Solvent extracts refer to Table 1.

활성을 나타내어 발효과정에 의한 항산화 증진은 없었다 (Table 3). 또한, 주정추출물에서도 RV-1-E가 1.26±0.03 mg AEAC/100 mg의 활성을 나타낸 반면, 발효물인 RVHE-1-E는 1.03±0.01 mg AEAC/100 mg으로 낮아 총 폴리페놀의 함량과 유사하게 발효에 의한 항산화 성분과 항산화 활성의 증가는 관찰되지 않아 발효조건에 개선이 필요한 것으로 보인다(Table 3). DPPH 라디칼 소거활성에서는 전반적으로 모든 시료가 ABTS 라디칼 소거능보다 낮은 활성(Table 3)을 보였는데, 이는 함유한 항산화 성분종류에 기인하는 것으로 추정되며 일반적으로 폴리페놀 화합물은 ABTS 라디칼 소거능이 우수하다고 알려져 있는데, Table 2의 결과처럼 본 시료도 플라보노이드보다 폴리페놀 화합물이 많기 때문에 ABTS 라디칼 소거능이 높은 것으로 추정된다(Table 3).

비발효물과 발효물의 DPPH 소거활성도 ABTS 소거능 결과처럼 발효물(RVHE-1-HW; 0.09±0.01 mg AEAC/100 mg과 RVHE-1-E; 0.08±0.02 mg AEAC/100 mg)보다 비발효물인 RV-1-HW(0.28±0.04 mg AEAC/100 mg) 및 RV-1-E(0.26±0.03 mg AEAC/100 mg)에서 높은 항산화 활성을 나타냄으로써, 발효에 의한 항산화 활성의 증가는 보이지 않았음을 알 수 있다(Table 3).

### 3. 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 균사체 발효물로부터 조제된 용매추출물의 면역활성

아침 대용 선식은 식품으로서 경구섭취되어지고 소장

서 흡수되는데, 이 과정에서 소장내 존재하는 다양한 점막 면역조직 및 기관들이 자극되면 장관면역계가 활성화되고 이들이 순환면역계를 활성화시켜 장관면역계의 역할은 대단히 중요한 의미를 갖는다. 특히 장관면역계 Peyer's patch 조직에는 M 세포라는 특이적인 microfolding cell이 존재하여(20) 고분자 물질을 포식하고 이를 통해 장관면역이 활성화될 수 있으므로 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 발효물로부터 분획된 다양한 획분의 장관면역 활성화에 기여하는 바를 검토하고자 하였다. 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 발효물의 주정추출물과 열수추출물의 Peyer's patch를 통한 장관면역 활성 결과, Peyer's patch와 시료의 배양을 통해 얻어진 세포배양액의 골수세포 증식에 미치는 영향에서는 쥐눈이콩과 발효물의 주정 및 열수추출물 모두에서 농도와 무관하게 유의적인 활성 차이를 보이지는 않았다(Figure 1A).

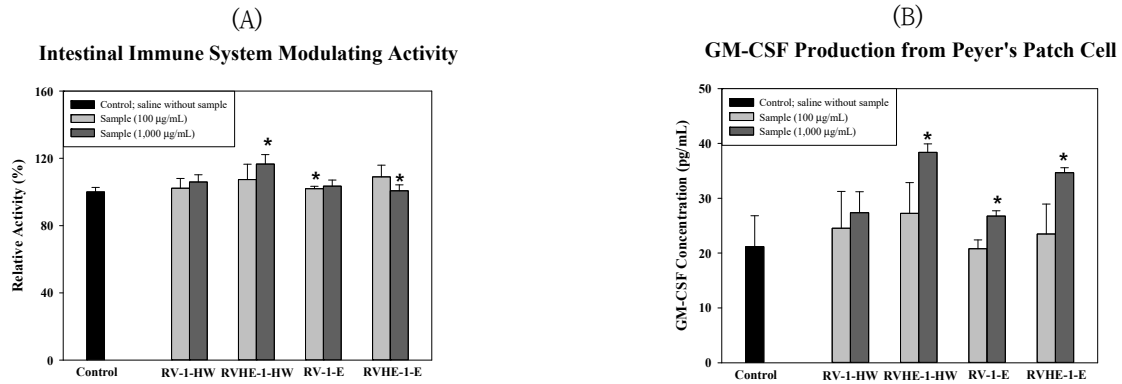
그러나 시료와 Peyer's patch cell로부터 배양에 의해 생산되는 골수세포로부터 과립구와 마크로파지의 증식 및 분화에 관여하는 중요한 사이토카인의 한 종류인 GM-CSF의 생산에서는 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 발효물로부터 조제된 열수추출물(RVHE-1-HW)과 주정추출물(RVHE-1-E) 모두에서 원료인 비발효 쥐눈이콩 열수추출물(RV-1-HW) 또는 주정추출물(RV-1-E)보다 농도 의존적으로 유의적인 증가를 나타내었다(Figure 1B). 한편, 선천면역계를 대표하는 중요한 면역세포인 마크로파지는 이물질 또는 침입 미생물을 포식하거나 획득면역 세포인 T 세포 등에 항원을 제시해주는 중요한 세포로 작용하는데, 시료가 복강으로부터 유도

**Table 3. Anti-oxidative activity of solvent extracts from small black soybean-*Hericium erinaceum* mycelia ferments**

Radical scavenging activity (mg AEAC/100 mg) <sup>1)</sup>	RV-1-HW <sup>2)</sup>	RVHE-1-HW	RV-1-E	RVHE-1-E
ABTS	2.17±0.01 <sup>d</sup>	1.48±0.03 <sup>c</sup>	1.26±0.03 <sup>b</sup>	1.03±0.01 <sup>a</sup>
DPPH	0.28±0.04 <sup>ab</sup>	0.09±0.01 <sup>a</sup>	0.26±0.03 <sup>ab</sup>	0.08±0.02 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Radical scavenging activity: mg AEAC/100 mg; mg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity/100 mg each solvent extracts.

<sup>2)</sup> Solvent extracts refer to Table 1.



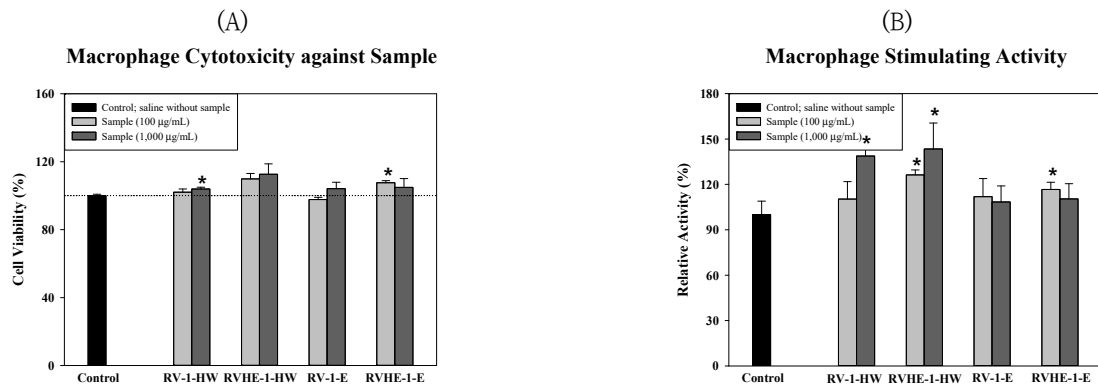
**Figure 1. (A) Intestinal immune system modulating activity through Peyer's patch, and (B) GM-CSF production from Peyer's patch cell by solvent extracts from small black soybean-*Hericium erinaceum* mycelia ferments.** RV-1-HW & RVHE-1-HW; hot-water extract from non-fermented and fermented small black soybean (SBS)-*H. erinaceum* mycelia ferments, RV-1-E & RVHE-1-E; EtOH extract from non-fermented and fermented SBS-*H. erinaceum* mycelia ferments.

시킨 마크로파지와 배양한 후 마크로파지 증식 및 활성화에 따라 생산되는 사이토카인에 미치는 영향을 검토하고자 하였다. 즉, 복강으로부터 thioglycollate medium에 의해 유도된 마크로파지에 대한 시료의 세포독성 결과를 검토하기 위해 마크로파지와 시료 100 µg/mL 및 1,000 µg/mL를 배양한 후 생존율을 검토한 결과, 쥐눈이콩 또는 발효물의 열수 및 주정추출물 모두 어떤 농도에서도 세포독성을 나타내지는 않았다(Figure 2A).

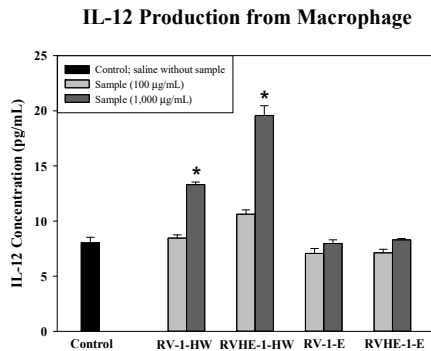
시료를 마크로파지와 배양한 후 마크로파지가 활성화되면 분비하는 효소의 활성을 검토한 마크로파지 자극활성에서 주정추출물(RVHE-1-E)은 비발효콩(RV-1-E)과 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 열수추출물의 경우에는 100 또는

1,000 µg/mL의 모든 농도에서 발효물(RVHE-1-HW)이 비발효 쥐눈이콩(RV-1-HE)보다 유의적으로 활성이 증가됨을 보여주었다(Figure 2B). 또한, 활성화된 마크로파지로부터 생산되는 대표적인 사이토카인으로서 T 세포 면역반응 자극 및 T 세포나 자연살해세포로부터 IFN-γ 생산을 촉진하는 IL-12의 생산능에서도 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 발효물의 주정추출물은 사이토카인 생산 촉진이 거의 없었으나, 열수추출물(RVHE-1-HW)에서는 가장 유의적으로 높은 IL-12의 생산을 나타내어 원료인 비발효 쥐눈이콩의 RV-1-HW보다 증강된 사이토카인 생산능을 보여주었다(Figure 3).

이러한 결과를 토대로 침지 후 침지공만을 이용하여 고체 발효시킨 쥐눈이콩-노루궁뎅이 버섯 고체발효물은 원료인



**Figure 2. (A) Macrophage cytotoxicity, and (B) macrophage stimulating activity by solvent extracts from SBS-*Hericium erinaceum* mycelia ferments.** RV-1-HW & RVHE-1-HW; hot-water extract from non-fermented and fermented small black soybean (SBS)-*H. erinaceum* mycelia ferments, RV-1-E & RVHE-1-E; EtOH extract from non-fermented and fermented SBS-*H. erinaceum* mycelia ferments.



**Figure 3. IL-12 production from peritoneal macrophage by solvent extracts from SBS-*Hericium erinaceum* mycelia ferments.** RV-1-HW & RVHE-1-HW; hot-water extract from non-fermented and fermented small black soybean (SBS)-*H. erinaceum* mycelia ferments, RV-1-E & RVHE-1-E; EtOH extract from non-fermented and fermented SBS-*H. erinaceum* mycelia ferments.

취논이콩보다 열수추출물에서 대조군이나 주정추출물보다 면역활성이 다소 증진됨을 관찰하였으나, 유의적으로 비발효 취논이콩보다 발효물에서 면역활성이 더욱 증진된 발효물을 조제하기 위한 발효조건 보완을 통해 향후에 취논이콩 침지수 혼합 발효물 및 취논이콩 침지수와 영양원을 보강한 발효물을 조제하여 면역활성을 검토하고자 한다.

#### IV. 결 론

기능성 선식의 식품소재로 활용하기 위해 검정콩(*Rhynchosia volubilis*, RV-1)보다 생리활성이 강화된 취논이콩-노루궁뎅이 버섯 균사체 발효물(RVHE-1)을 제조하고 이들 용매추출물의 항산화 및 면역활성을 조사하였다. 수율 및 성분 함량 분석을 통해 EtOH 추출물(E)보다는 열수 추출물(HE)에서 유의적인 차이를 보여 균사체 발효가 충분히 진행되었음을 확인하였다. 항산화 성분 함량과 라디칼 소거능에서 발효물(RVHE-1)의 EtOH와 열수 추출물 모두는 비발효 RV-1에 비해 크게 증가하지 않았다. 또한 RV-1과 RVHE-1의 모든 추출물은 농도와 관계없이 Peyer's patch를 통한 장 면역계 조절 활성에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 Peyer's patch 세포에서 생산된 골수세포의 증식과 분화에 관여하는 사이토카인인 GM-CSF 생산에서는 RVHE-1 추출물이 비발효 RV-1 추출물보다 유의하게 높은 것으로 나타났다. RVHE-1의 대식세포 자극 활성과 대식세포 활성화에 관여하는 IL-12의 생성 또한 RV-1-HW보다 유의하게 높았다. 이

러한 결과는 취논이콩-노루궁뎅이 버섯 균사체 발효물이 비발효 취논이콩보다 활성이 높아 기능성 선식의 원료로 충분히 활용될 수 있음을 제시할 수 있었다.

#### 사 사

이 논문은 2023년도 한국교통대학교 교내학술연구비의 지원을 받아 수행한 연구임.

#### 참고문헌

- Li SH, Xiang QL. (2011) Chemical constituents in *Rhynchosia volubilis*. Chin Trad Herb Drugs. 42, 1276~8.
- Kim HJ, Bae IY, Ahn CW, et al. (2007) Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from black soybean protein hydrolysate. Peptides. 28, 2098~103.
- Kinjo J, Nagao T, Tanaka T, et al. (2001) Antiproliferative constituents in the plant 8. Seeds of *Rhynchosia volubilis*. Biol Pharm Bull. 24, 1443~5.
- Rammohan A, Reddy GM, Bhaskar BV, et al. (2020) Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Rhynchosia*: A comprehensive review. Planta, 251, 9.
- Kim H, Jeong JH, Shin JY, et al. (2011) Immunomodulatory and anti-inflammatory activity of mulberry (*Morus alba*) leaves fermented with *Hericium erinaceum* mycelium by solid-state culture. J Korean Soc Food Sci Nutr. 40, 1333~9.
- Chiang S-S, Ulzizjargel E, Chien R-C, et al. (2015) Antioxidant and anti-inflammatory properties of solid-state fermented products from a medicinal mushroom, *Taiwanofungus salmoneus* (higher Basidiomycetes) from Taiwan. Int J Med Mushrooms. 17, 21~32.
- Bang YS, Jang EH, Chung HJ. (2017) Quality and physicochemical characteristics of newly developed *Sunsik* products with germinated brown rice. Korean J Food Sci Technol. 49, 513~18.
- Kim BR, Park SS, Youn GJ, et al. (2020) Characteristics of *Sunsik*, a cereal-based ready-to-drink Korean beverages, with added germinated wheat and herbal plant extract. Foods. 9, 1654~68.
- Kim JH, Park PS, Kim JK. (2005) Manufacture of

- nutritionally balanced *Sunsik* for the moderns: Its quality characteristics. *Korean J Food Preserv.* 12, 123~9.
10. Koh EM, Jang KH, Surh JH. (2014) Improvement of physicochemical properties of cereal based ready-to-eat *Sunsik* using fermentation with *bionuruk* and *Bifidobacterium longum*. *Food Sci Biotechnol.* 23, 1977~85.
  11. Woo JW. (1989) Physico-chemical properties of proteins, lipids and dietary fibers of job's tears (Yulmoo: *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf & Yeomjoo: *Coix lachryma-jobi* L.) Ph.D. Thesis, Yonsei Univ. Seoul, Korea.
  12. Kwak JH, Choi S, Ju DJ, et al. (2021) An analysis of the association between chronic disease risk factors according to household type for the middle-aged: The Korean National Health and Nutrition Examination Survey (2013 ~2015). *Korean J Food Nutr.* 34, 88~95.
  13. Choi O-K, Chung K, Cho G-S, et al. (2002) Proximate compositions and selected phytoestrogens of Iranian black pomegranate extract and its products. *Korean J Food Nutr.* 15, 119~25.
  14. Kim SH, Kwon TW, Lee YS, Choung MS, Moon GS. (2005) A major antioxidative components and comparison of antioxidative activities in black soybean. *Korean J Food Sci Technol.* 37, 73~7.
  15. Sanchez M. (2002) Review: Method used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci Tech Int.* 8, 121~37.
  16. Yu KW, Kiyohara H, Matsumoto T, et al. (1998) Intestinal immune system modulating polysaccharides from rhizomes of *Atractylodes lancea* DC. *Planta Med.* 64, 714~9.
  17. Conrad RE. (1981) Induction and collection of peritoneal exudates macrophages. In: Herscovitz BH, Holden HT, Ballanti JA, Ghaffar A. editors. *Manual of Macrophage Methodology*, New York: Marcel Dekker Incorporation. 5~11.
  18. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, et al. (1996) A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull.* 19, 1518~20.
  19. Ruhland A, Kima PE. (2009) Activation of PI3K/Akt signaling has a dominant negative effect on IL-12 production by macrophages infected with *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Exp Parasitol.* 122, 28~36.
  20. Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, et al. (2013) Microfold (M) cells: Important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* 6, 666~77.

---

Received Oct. 30, 2023, Revised Nov. 29, 2023, Accepted Dec. 8, 2023