

약용버섯을 이용한 도토리화분의 세포 발아 및 항산화 활성

홍인표* · 우순옥 · 한상미 · 여주홍 · 조미란

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

Germination and Antioxidant Activity of Korean Oak Pollen Treated with Medicinal Mushrooms

In-Pyo Hong*, Soon-Ok Woo, Sang-Mi Han, Joo-Hong Yeo and Mi-Lan Cho

National Academy of Agricultural Science and Technology, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT : In this study, we measured antioxidant activity as DPPH radical scavenging and the total polyphenol content of pulverized and lyophilized oak pollens inoculated with fungi to confirm the husk removal effect. The total polyphenol content of oak pollen was highest in lyophilized pollen medium inoculated with *Armillaria mellea*, and was lowest in pollen inoculated with *Lentinula edodes*. Total polyphenol content of the lyophilized pollen was higher than that of the refined pollen and the pulverized pollen in oak pollen germinated with *A. mellea*. The total polyphenol content of the lyophilized oak pollen germinated with *A. mellea* was 1.4-fold higher than that extracted with water. Measurement of antioxidant activity using the DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging method showed that the lyophilized oak pollen germinated with *A. mellea* had the highest and that germinated with *L. edodes* was lowest in antioxidant activities. The lyophilized oak pollen germinated with *A. mellea* was 2 to 4 times higher than that extracted with water in the antioxidant activity of DPPH free radical scavenging. Many germinated cells were formed around pore of acorn pollen inoculated with *L. edodes*, while those were formed at the end of hyphae derived from oak pollen inoculated with *A. mellea*.

KEYWORDS : Antioxidant activity, *Armillaria mellea*, Bee pollen, Lyophilization

서론

국내의 양봉산업은 2012년 기준 약 2만 농가에서 180만 개의 봉군을 사육하는 3,900억원 규모이다. 양봉산물 생산액은 벌꿀이 65%로 가장 많으며, 프로폴리스 12%, 로열젤리, 화분 순이다. 화분은 탄수화물, 지방, 비타민, 무기질 등의 영양성분이 풍부하여 오래전부터 자연 건강식품으로 이

용되어 왔다[1]. 특히 벌이 채취한 꿀벌 화분(bee pollen)에는 꿀과 효소가 혼합되어 있어서 일반 화분보다 영양성분이 풍부하여 꿀벌의 단백질원과 로열젤리의 원료로 이용된다. 꿀벌 화분은 이용가치가 매우 높은 자연식품으로 혈관 및 순환계, 소화계, 신진대사계, 노화 등 다양한 질환에 효과가 있다고 알려져 있으며, 또한 항균 및 면역증강 효과, 전립선 비대증 및 전립선염 치료 효과 등이 보고되었다[2]. 최근에는 생활환경과 식생활 등의 변화로 심혈관계 질환과 내분비계 질환인 당뇨병 등 성인병이 증가하는 추세이다. 노화와 질병의 원인은 다양하지만 일반적으로 생체내의 산화적 스트레스에 의해 생성되는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 축적이 세포를 손상시켜 노화가 촉진된다. 활성 산소는 반응성이 매우 높은 물질로 세포를 손상시켜 동맥경화, 당뇨병, 암, 노화 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 항산화 물질은 동, 식물계에 널리 분포하고 있으며, 페놀성 화합물과 플라보노이드, 아스코르빈산, 토코페롤 등의 물질은 성인병을 예방하고 노화를 지연시킨다고 알려져 있다[3]. 벌꿀과 화분은 페놀성 화합물이 함유된 항산화 활성이 높은 항산화제이다[4]. 화분은 이용가치가 매우 높은 완전식품이지만 sporopollenin으로 된 외피(exine)와 cellu-

Kor. J. Mycol. 2014 June, 42(2): 165-169
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.2.165>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: iphong20@korea.kr

Received April 24, 2014
 Revised June 21, 2014
 Accepted June 26, 2014

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

lose와 pectin으로 구성된 내피(intine)는 화학적으로 견고하여 강산처리에도 구조가 파괴되지 않으며 [5], 대부분의 동물, 곤충들도 분해하지 못하여 영양성분의 일부만 흡수한다. 따라서 화분의 영양성분을 추출하기 위한 연구가 최근에 활발히 진행되고 있다. 단백질 분해효소를 이용한 세포벽 용해, 삼투압 또는 발아를 이용한 영양성분 추출, 벌 내장 효소를 이용한 세포질 추출, 화분 외피의 물리적 파쇄에 의한 세포질을 추출하는 방법 등이 보고되었다 [6-8]. 본 연구에서는 국내에서 생산량이 가장 많은 도토리화분을 식품으로 이용하기 위하여 약용버섯을 이용한 화분의 영양성분 추출 효과를 항산화 활성과 화분 세포의 발아 형태로 확인하였다.

재료 및 방법

시험재료

꿀벌 화분은 한국양봉농협(Ansung, Korea)에서 구입하여 -20°C 에서 냉동 보관하면서 사용하였다.

화분 분쇄

물리적 처리는 저온초미분쇄기(HKP-02, Korea Energy Technology, Seoul, Korea)와 동결건조기를 이용하여 화분을 분쇄하였다. 저온초미분쇄는 분쇄기의 온도를 -20°C 로 설정하여 시료의 온도상승을 억제하였으며 120 mesh의 필터를 장착하여 80,000 rpm 속도로 고속회전 분쇄하였다. 동결건조는 화분을 급속냉동기(Deep Freezer, DF 9010, Ilshin Lab Co. Ltd, Korea)를 이용하여 -80°C 에서 급속 냉동한 후, 동결건조기(Freeze dryer, FD5508, Ilshin Lab Co. Ltd, Korea)에서 -45°C 로 건조하였다.

시료 추출

도토리화분의 영양성분을 추출하기 위하여 40 mL의 증류수에 도토리 화분 4 g, 10% Sucrose, 0.01% H_3BO_3 , 0.01 CaCl_2 을 각각 넣고 121°C 에서 15분간 멸균하여 화분배지를 제조하고, 팽나무버섯(*Armillaria mellea*), 말굽버섯(*Fomes fomentarius*), 표고(*Lentinula edodes*), 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*), 느타리(*Pleurotus ostreatus*), 복령(*Wolfiporia extensa*) 등 6종의 담자균류를 접종하여 25°C 에서 8일간 배양하였다. 배양이 끝난 배지는 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 추출액을 얻었으며, 추출액은 여과지(Filter paper No.2, Whatman, UK)를 사용하여 고형물을 제거한 다음 분석 시료로 사용하였다.

총 폴리페놀 함량

도토리화분의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu의 방법을 변형하여 측정하였다 [9]. 화분 발아액 1 mL에 EtOH 1 mL, 증류수 5 mL와 50% Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL을 가하여 상온에서 5분간 반응시켰다. 혼합액에 5% so-

dium carbonate(Na_2CO_3) 1 mL를 가하고 어두운 상태에서 1시간 보관한 후 UV spectrophotometer로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 표준물질로서 gallic acid (Sigma, USA)를 이용하여 얻은 검량선으로부터 함량을 구하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

전자 공여능(electron donating ability, EDA) 측정은 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다 [10]. 96 well plate에 화분 발아액 10 μL 와 0.2 mM DPPH 190 μL 를 균일하게 혼합하여 37°C 에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료에 의한 흡광도의 차이는 ethanol만의 흡광도를 측정하여 보정해 주었고, 이때 전자 공여능은 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 구하였다.

화분 세포 관찰

저온초미분쇄와 동결건조한 도토리화분 배지에 6종의 담자균류를 접종하여 25°C 에서 8일간 배양한 다음 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 여과지(filter paper No.2, UK)로 여과하여 발아화분을 수확하였다. 발아화분은 건조한 후 gold-palladium으로 진공상태에서 120초간 코팅시킨 다음 주사전자현미경(SEM; Hitachi, Tokyo, Japan)을 이용하여 화분세포의 발아 형태를 관찰하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량

저온초미분쇄와 동결건조한 도토리화분을 화분배지로 제조하여 6종의 담자균류를 접종하고 8일간 배양한 후 화분 발아액의 총 폴리페놀함량을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 총 폴리페놀 함량(TPC)은 동결건조 화분의 발아액이 정제화분과 저온초미분쇄화분의 발아액보다 높았다. 동결건조 화분 발아액의 총 폴리페놀 함량은 팽나무버섯(*A. mellea*) 배양 발아액에서 22.57 mg GAE/100 mL로 가장 높았으며, 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*) 발아액(18.92 mg GAE/100 mL), 느타리(*P. ostreatus*) 발아액(18.53 mg GAE/100 mL) 순으로 높았으며, 표고(*L. edodes*) 발아액에서 16.59 mg GAE/100 mL로 가장 낮았다. 총 폴리페놀 함량은 동결건조 화분 발아액이 대조구인 PDB배지 발아액에 비하여 10~15배, 저온초미분쇄 화분 발아액은 6~9배 증가하였다. 즉 꿀벌 화분에 의해 총 폴리페놀 함량이 증가됨을 알 수 있었다. 또한 동결건조 화분의 담자균류 발아액의 총 폴리페놀 함량은 대조구인 동결건조 화분 물 추출액보다 높게 나타났으며, 특히 팽나무버섯 발아액은 물 추출액보다 1.4배 높았다. 따라서 담자균류에서 분비되는 효소가 화분의 외피벽 분해에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

Table 1. Total polyphenol contents of oak pollen treated with medicinal mushrooms

Fungi	Total polyphenol content (mg GAE/100 mL)			
	Purified pollen	Pulverized pollen	Lyophilized pollen	PDB
<i>Armillaria mellea</i>	3.05	14.36	22.57	2.37
<i>Fomes fomentarius</i>	2.80	9.93	16.74	1.11
<i>Lentinula edodes</i>	2.64	9.48	16.59	1.35
<i>Phellinus linteus</i>	2.65	9.73	18.92	1.25
<i>Pleurotus ostreatus</i>	2.61	9.32	18.53	1.21
<i>Wolfiporia extensa</i>	2.76	10.25	17.97	1.49
Control	11.74	10.79	16.40	-

Table 2. Antioxidant activity of oak pollen treated medicinal mushrooms

Fungi	DPPH radical scavenging (%)			
	Purified pollen	Pulverized pollen	Lyophilized pollen	PDA
<i>Armillaria mellea</i>	41.9 ± 6.3	49.4 ± 3.9	64.4 ± 1.3	10.3 ± 2.8
<i>Fomes fomentarius</i>	22.8 ± 1.0	33.4 ± 1.8	60.9 ± 2.1	6.3 ± 4.9
<i>Lentinula edodes</i>	15.8 ± 2.7	33.4 ± 2.1	47.4 ± 3.5	6.0 ± 0.6
<i>Phellinus linteus</i>	24.0 ± 2.9	30.6 ± 2.3	59.0 ± 3.2	3.1 ± 1.1
<i>Pleurotus ostreatus</i>	15.1 ± 2.2	43.0 ± 1.6	56.5 ± 3.1	11.9 ± 1.3
<i>Wolfiporia extensa</i>	22.0 ± 2.9	54.4 ± 1.9	60.1 ± 2.4	3.3 ± 1.2
Control	8.23 ± 2.37	9.43 ± 2.84	11.7 ± 2.27	-

항산화 활성

저온초미분쇄와 동결건조한 도토리화분을 담자균류와 함께 배양하여 DPPH radical 소거능으로 항산화 활성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. DPPH radical 소거능은 동결건조 화분의 뽕나무버섯 발아액에서 64.4%로 가장 높게 나타났다. 도토리화분에 담자균류를 배양한 화분 발아액의 DPPH radical 소거능은 뽕나무버섯 발아액(64.4%), 말굽버섯 발아액(60.9%), 복령 발아액(60.1%) 순으로 높은 활성을 보였으며, 표고 발아액에서 47.4%로 가장 낮았다. 또한 DPPH radical 소거능은 화분을 첨가하여 제조한 배지에 담자균류를 배양한 발아액이 PDB배지에 담자균류를 배양한 대조구에 비하여 월등히 높았다. 저온초미분쇄 화분 발아액의 DPPH radical 소거능은 대조구 PDB배지에 비하여 5~16배, 동결건조화분 발아액은 6~19배 증가하였다. 저온초미분쇄 화분 발아액과 동결건조화분 발아액의 DPPH radical 소거능은 정제화분 발아액에 비하여 각각 1~3배, 2~4배 증가하였다. 또한 동결건조 화분의 뽕나무버섯 발아액의 DPPH radical 소거능은 물 추출액보다 높게 나타났다. 따라서 도토리화분의 물리적 처리 방법에 따른 DPPH radical 소거능은 동결건조 화분, 저온초미분쇄 화분, 정제화분 순으로 높았다. 화분의 성분은 물리적 파쇄 후 변화한다는 보고가 있다[8]. 따라서 도토리화분의 DPPH radical 소거능에 의한 항산화 활성의 차이는 이러한 분쇄 방법에 기인한 것으로 추정된다.

화분세포 발아

수집된 꿀벌화분은 경단처럼 뭉쳐진 알갱이 형태이며 (Fig. 1A), 물에 침지하여 꿀벌의 분비물과 꿀 성분을 제거한 순수 화분은 분말형태로 크기는 0.1~0.003 mm 정도이다 (Fig. 1B). 도토리화분의 전자현미경 구조는 단립이며 모양은 장구형(prolate)이고 극면상은 난형이다. 발아구는 3구형이며 비교적 짧고 곧은 주름이 있다. 표면은 과립상(verrucate) 또는 미립상(scabrate)으로 불규칙한 돌기가 있다 (Fig. 2). 저온초미분쇄한 화분은 세포벽이 파쇄 또는 절단되었으며 (Fig. 3A), 동결건조한 화분에서는 세포벽이 파열되어 세포질이 나출되는 양상을 보였다 (Fig. 3B). 표고를 접종한 화분배지에서의 세포 발아 형태는 공구(pore) 주변에 외피가 없는 다량의 발아세포가 형성되었으며 (Fig. 4A), 뽕나무버섯을 접종한 화분배지에서의 세포 발아 형태는 화분에서 균사와 유사한 발아관이 형성되고 그 위에 발아세포가 형성되었다 (Fig. 4B). 이는 담자균류에서 분비되는 효소가 화분 세포의 외피를 분해하는 것으로 추정된다[10].

적 요

도토리화분의 총 폴리페놀함량은 화분배지에 뽕나무버섯 (*Armillaria mellea*) 배양한 발아액에서 가장 높았으며, 표고 (*Lentinula edodes*) 발아액에서 가장 낮았다. 뽕나무버섯을 배양한 발아액 중에서 동결건조 화분의 발아액이 정제



Fig. 1. Pollen morphology. A, Granule form of bee pollen; B, Powder form of bee pollen.

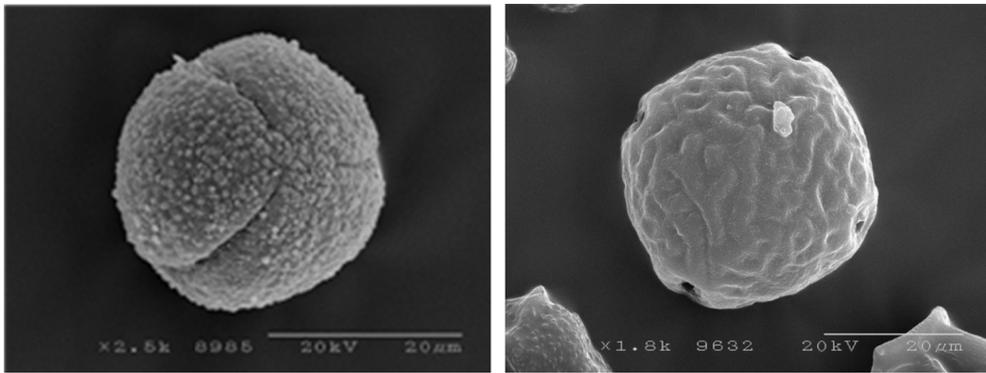


Fig. 2. SEM morphology of oak pollens.

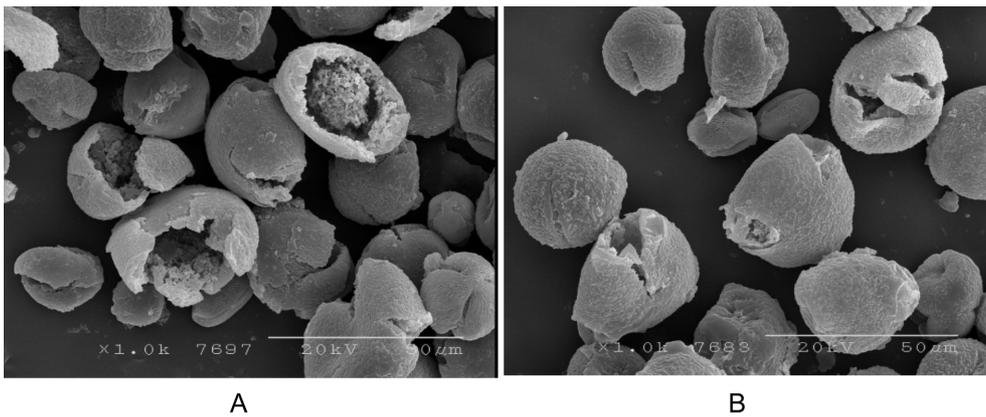


Fig. 3. The morphology of the oak pollens after pulverizing or lyophilizing. A, The pulverized pollens; B, The lyophilized pollens.

화분과 저온초미분쇄화분의 발아액보다 총 폴리페놀함량이 많았다. 또한 동결건조 화분의 뽕나무버섯 발아액은 물추출액보다 총 폴리페놀함량이 1.4배 높았다. 도토리화분의 DPPH radical 소거능은 뽕나무버섯 발아액에서 가장 높았으며, 표고 발아액에서 가장 낮았다. 동결건조 화분의 뽕나무버섯 발아액은 DPPH radical 소거능이 물추출보다

2~4배 높았다. 수집된 꿀벌화분은 알갱이 형태이며, 꿀벌의 분비물을 제거한 순수 화분은 분말형태로 크기는 0.1~0.003 mm 정도이다. 화분의 전자현미경 구조는 도토리화분은 단립이며 모양은 장구형(prolate)이고 극면상은 난형이다. 발아구는 3구형이며 비교적 짧고 끝은 주름이 있다. 표면은 과립상(verrucate) 또는 미립상(scabrate)으로 불규

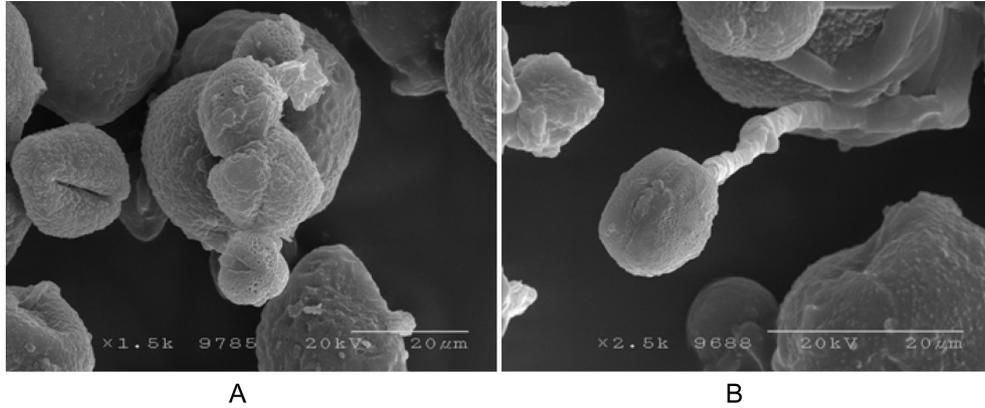


Fig. 4. The germinated cells formed on oak pollen medium treated with fungi. A, The germinated cells formed from pollen treated with *Lentinula edodes*; B, The germinated cells formed from pollen treated with *Armillaria mellea*.

칙한 돌기가 있다. 저온초미분쇄한 화분은 세포벽이 파쇄 또는 절단되었으며, 동결건조한 화분에서는 세포벽이 파열되어 세포질이 누출되는 양상을 보였다. 표고를 접종한 도토리 화분의 세포 발아 형태는 공구(pore) 주변에 외피가 없는 다량의 발아세포가 형성되었으며, 뽕나무버섯을 접종한 화분배지에서의 세포 발아 형태는 화분에서 균사속과 유사한 발아관이 형성되고 그 끝에 발아세포가 형성되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ 008539)의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Chung YG, Yoon SH, Kwon JS, Bae MJ. Nutritional and biochemical studies on the pollen loads studies on lipid compositions of sunflower pollen load and effects of its pollen load on liver cholesterol metabolism in mouse. *J Kor Soc Food Nutr* 1984;13:169-74.
2. Li F, Yuan QP, Rashid F. Isolation, purification and immunobiological activity of a new water-soluble bee pollen polysaccharide from *Crataegus pinnatifida* Bge. *Carbohydr Polym* 2009;78:80-8.
3. Block G, Langseth L. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technol* 1994;48:80-4.
4. Andrade P, Ferreres F, Gil MI, Tomás-Barberán FA. Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry* 1997;60:79-84.
5. Kress WJ, Stone DE, Sellers SC. Ultrastructure of exine-less pollen: *Heliconia* (Heliconiaceae). *Amer J Bot* 1978;65:1064-76.
6. Choi SJ, Jeong YH. Effect of proteases on the extraction of crude protein and reducing sugar in pollen. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 2004;33:1353-8.
7. Fang KE, Wang YN, Yu TQ, Zhang LY, Baluska F, Samaj J, Lin JX. Isolation of de-exined pollen and cytological studies of the pollen intines of *Pinus bungeana* Zucc. Ex Endl. and *Picea wilsonii* Mast. *Flora* 2008;203:332-40.
8. Han MR, Lee SJ, Kim MH. Development of pine pollen cell wall rupture technique using a high impact planetary milling process. *Dankook J New Material Technol* 2004;12:43-54.
9. Blois MS. Antioxidants determination by the use of a stable free radical. *Nature* 1958;181:1199-200.
10. Liangli Y, Scott A, Jonathan P, Mary H, John W, Ming Q. Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. *J Agric Food Chem* 2002;60:1619-24.
11. Schwarze FWMR, Engels J, Mattheck C. *Fungal Strategies of Wood Decay in Trees*. Springer; 2000. p. 61-4.