Activities of Antioxidation and AChE Inhibition of Extract from *Hericium erinaceus*

Jong Seok Lee and Eock Kee Hong
School of Biotechnology and Bioengineering Kangwon National University
Tel:(033) 250-6275, FAX:(033) 243-6350

Abstract

It has been known that the novel diterphenoids, hericenone and erinacine isolated from the fruiting body and cultured mycelia of *Hericium erinaceus* showed potent stimulating activity of nerve growth factor (NGF)-synthesis. To investigate the biological activities of extracts from fruiting body, cultured mycelium and cell-free broth of *H. erinaceus*, the activity experiments of antioxidation and AChE inhibition were carried out. Sephadex G-10 gel filtration followed by HPLC on a μBondapak C_{18} column of EtOAc extract from cultured mycelium showed a biological activity.

서 론

현재 AD의 발생률은 증가추세에 있으며 아직까지 AD나 다른 퇴행성 뇌질환에 의해 생기는 노인성 치매를 근본적으로 치료할 수는 없으나 Acetylcholinesterase (AChE) 억제제와 항산화제 등이 처방되고 있다. Acetylcholine은 기억력과 학습활동에 있어서 중요한 역할을 하므로 AChE 억제제는 뇌의 아세틸콜린 농도를 증가시켜 인지기능을 향상시키기 위하여 사용된다. 항산화제는 활성산소로 인하여 뇌세포가 산화되고 손상되는 것을 막아주는 역할을 한다고 생각되고 있다.

노루궁뎅이버섯(Hericium erinaceus)는 분류학상 민주름버섯목(Aphyllophorales), 턱수염버섯과(Hydnaceae), 산호침버섯목(Hericium)에 속하며 자실체는 가을철 활엽수 고목이나 생목에서 발생하며 식용으로 약간 쓴맛이 있으나 함암과 소화불량 치료 및 궤양병 치료에 효과가 있는 약용버섯이다. 노루궁뎅이버섯 자실체와 배양 균사체 추출물에서 AD 환자들의 증상을 개선하는 효과가 있는 것으로 알려진 NGF의 합성 자극 물질인 hericenone과 erinacine을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 *Hericium erinaceus*의 액체배양을 통해 erinacine이 존재한다고 알려진 균사체의 최대 생산 조건을 확립하고 대량 생산하기 위한 기본적인 조건을 검토

하였으며, 또한 자실체와 배양물에서 추출한 추출물들의 AChE 억제 활성과 항산화 활성을 측정하여 치매치료제로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에서 사용된 균주는 담자균류의 일종인 *Hericium erinaceus*를 사용하였다. 보관용 배지로는 PDA (potato dextrose agar)를 사용하였으며 3주마다 계대배양하였다. 전배양에서 사용된 접종원은 기본 배지인 YMK medium(glucose 20g/L, yeast extract 5g/L, KH_2PO_4, 1g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/L)이고, 본배양의 플라스크배양에서는 modified medium(glucose 20g/L, yeast extract 10g/L)을 사용하여 실험을 수행하였다.

배양조건 및 회분배양(batch culture)

Agar plate(PDA)를 이용한 배양에서 활성화된 *H. erinaceus*를 250mL 플라스크(working volumne 100mL)에 접종하여 4일간 전배양을 실시하였다. 본배양은 전배양액을 homogenizer (Heidolph Co., DIAX 600)를 이용하여 균질화한 후 전배양액을 접종량 10 %로 하여 접종하였으며 7일간 배양을 실시하였다. 플라스크배양은 Shaking incubator (Vision Scientific Co., VS-8480SR)에서 온도 24℃, 200 rpm, 초기 pH 5.5로 조절하여 배양하였다. 회분배양의 조건은 5 L 생물반응기(Korea Fermentor Co., KF-5L)에서 초기 working volumne을 3 L로 하여 24℃, 200 rpm, 1 vvm 그리고 초기 pH 5.5로 행하였다.

균체량 분석

균체량 측정은 건조균체량을 이용하여 행하였다. 건조균체량은 세포 배양액을 filter paper (Whatman #4)를 사용하여 여과한 후 2회 세척하여 80℃에서 항량이 될 때까지 약 24시간동안 건조시켜 측정하였다.

항산화 활성

각 추출물에 대한 항산화활성은 DPPH free radical의 소거활성(전자공여능)으로 검정하였으며, 전자공여능(electron donating ability, EDA)은 Blois의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. DPPH법은 항산화 물질의 전자 공여능으로 인해 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는 정도를 나타내는 지표로 항

산화능을 나타내는 척도가 된다고 알려져 있다.

Acetylcholinesterase(AChE)에 대한 저해 활성

효소활성은 Ellman법을 사용하여 측정하였다. 효소의 기질인 ATCh가 가수분해되면 thiocholine이 생성되는데, 이 화합물이 DTNB와 반응해 새로운 dithio 화합물과 2-니트로벤조산의 thio 음이온을 만든다. 이렇게 생성된 이 음이온은 UV에 정확하게 검출되기 때문에 UV에 의해 이 음이온의 생성속도를 측정함으로써 효소의 활성을 측정할 수 있다.

Erinacine 분석

HPLC 분석은 μ Bondapak C_{18} (300 mm L × 3.9 mm ID)/UV detector(340nm)를 이용하였으며 전개용매로는 methanol을 사용하였다. 분석을 위한 erinacine은 Prof. Hirokazu Kawagishi(Department of Applied Biological Chemistry, Shizuoka University, 일본)로부터 erinacine A를 제공받아 standard로 사용하였다.

Gel chromatography에 의한 분획

Gel filtration column은 Sephadex G-10(detection range of molecular weight: <700)를 증류수로 swelling하고 30% methanol, 70% methanol, 100% methanol로 resin을 옮겨준 것을 degassing한 후 15 mm × 30 mm column에 충진하여 사용하였다. 용출용매로는 methanol을 사용하였으며 용출속도는 2 mL/min이고, 1 mL/fraction으로 auto fraction collector를 setting하여 용출하였다. 용출된 각 fraction은 340nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

생물반응기에서의 회분배양

Fig. 1에서 균체성장은 배양 4일째 최대인 11 g/L를 나타냈으며 배양기간이 플라스크에서보다 짧아지는 것을 관찰할 수 있었다.

항산화 활성

각 추출물의 항산화 작용을 DPPH에 의해 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 자실체 열수추출물, 배양여액 에탄올 가용물, 균사체 에탄올 추출물에서 50%이상의 항산화 활

성을 나타내었다.

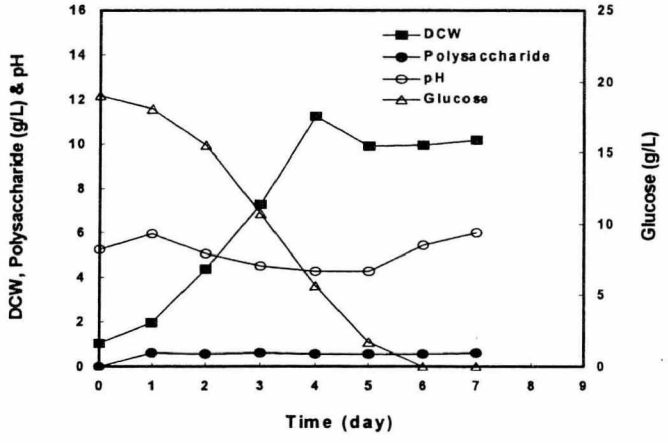

Fig. 1. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with initial pH 5.5 at 200 rpm and 1.0 vvm.

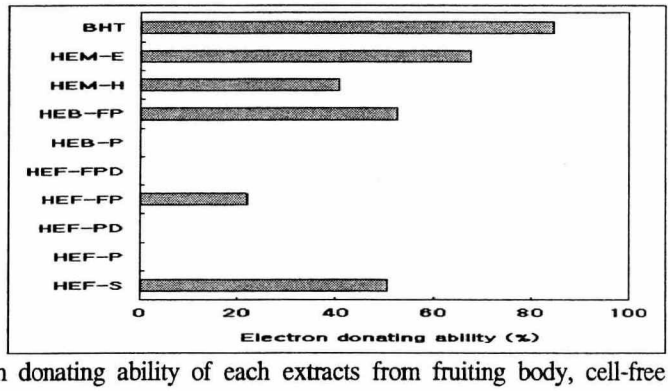

Fig. 2. Electron donating ability of each extracts from fruiting body, cell-free broth and mycelium of *H. erinaceus*.

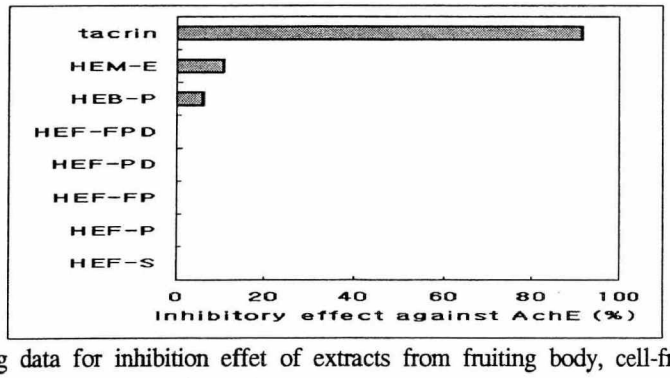

Fig. 3. Screening data for inhibition effet of extracts from fruiting body, cell-free broth and mycellum of *H. erinaceus* on AChE activity.

Acetylcholinesterase(AChE)에 대한 저해 활성

Ellman 등의 방법에 의하여 AChE에 대한 각 추출물의 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 배양여액에서 에탄올 침전해 얻은 polysaccharide와 균사체 에탄올 추출물에서 저해활성이 나타났다.

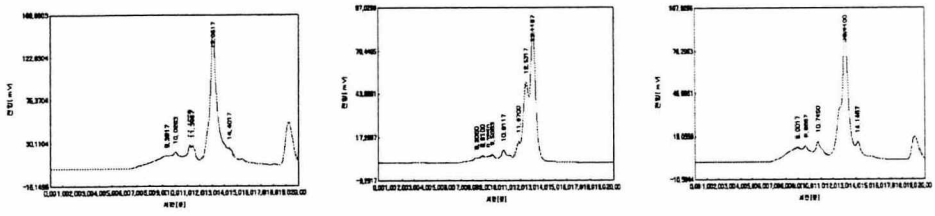

Fig. 4. HPLC chromatogram of mycelium extract(left), erinacine standard(middle), mixture of erinacine standard and mycelium extract(right) of *H. erinaceus*.

Erinacine 분석

Fig. 4는 HPLC를 이용한 *H. erinaceus* 균사체로부터 erinacine에 대한 분석결과를 나타낸 것이다. 왼쪽 그림은 균사체 에탄올 추출물에 대한 것이고 가운데 그림은 erinacine A이며, 오른쪽 그림은 균사체 추출물과 erinacine 혼합물에 대한 결과이다. 균사체 추출물중 erinacine standard와 일치하는 peak를 볼 수 있다.

Gel chromatography에 의한 분획

항산화 활성과 AChE 저해 활성을 보인 균사체 에탄올 추출물의 gel filtration 결과는 Fig. 5와 같다.

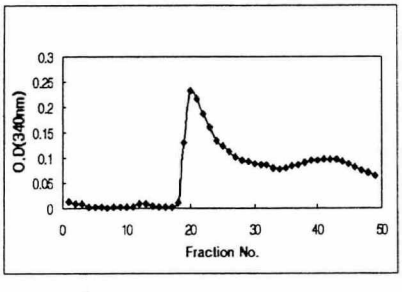

Fig. 5. Elution profiles of mycelium extract by Sephadex G-10 gel filtration.

Reference

1. Kawagishi, H., M. Ando, and T. Mizuno, Hericenone A and B as cytotoxic principles from the mushroom *Hericium erinaceum*(1990), *Tetrahedron letters*, 31(3), 373-376.