

## 야생버섯 추출물의 항돌연변이 효과

박선희 · 김옥미 · 이갑득\*

동국대학교 화학과

## Antimutagenic Effect of Extracts from Wild Mushrooms

Sun-Hee Park, Ok-Mi Kim and Kap-Duk Lee\*

Department of Chemistry, Dongguk University, Kyungju, 780 714, Korea

### Abstract

The inhibitory effects of methanol extracts from wild mushrooms on mutagenicity induced by benzo(a)pyrene (B(a)P) and N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine(MNNG) were investigated using *Salmonella typhimurium* reversion assay. In Ames test, The methanol extracts of 11 mushrooms did not show any mutagenicity but The methanol extracts of *Lactarius piperatus*, *Naematoloma fasciculare* and *Innotus xeranticus* showed 40~80% of inhibitory effect on the mutagenicity induced by indirect mutagen of B(a)P and also showed 60~80% of antimutagenic activity toward MNNG irrespective of their concentrations.

**Key words** – Antimutagenic effect, *Salmonella typhimurium* reversion assay, Wild mushrooms

### 서 론

현대인의 식생활 변화 및 산업화로 인한 환경오염을 비롯한 환경적 요인에 의한 암 발생율이 점차 증가하고 있으며 이에 식품이나 식물로부터 돌연변이 혹은 암의 유발에 대한 억제작용을 갖는 물질을 찾아내어 암의 발생이나 유전물질의 손상을 예방하려는 연구가 많이 행해지고 있다[5,13]. 돌연변이가 암 유발의 초기단계에서 중요한 작용을 하며 현재까지 밝혀진 대부분의 발암물질이 돌연변이 원인이라는 점에서 돌연변이를 억제할 수 있는 물질은 항발암 작용을 가질 수 있다고 할 수 있으므로[11,16] 식품 및 천연식물로부터 암의 예방이나 치료를 목적으로 하는 항돌연변이 물질의 검색이 더욱 시급히 요구되며 최근 발암

물질 탐색작업의 일환으로 과거 민간요법으로 사용했던 여러 가지 식물들에 대한 연구가 많은 진전을 보고 있다 [6,10,20]. 그 중에서도 버섯은 진균류에 속하는 담자균과 자낭균 중 자실체를 형성하는 고등균류로서 향리성분과 약리효과 때문에 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 왔으며 최근에는 버섯의 항암작용, 생체 기능조절 및 뇌졸중, 심장병 등 성인병에 대한 예방과 개선효과가 보고됨에 따라 버섯에 대한 관심은 더욱 높아지게 되었다. 많은 버섯류 중에서 상황버섯(*Phellinus linteus*), 영지버섯(*Ganoderma lucidum*), 구름버섯(*Coriolus versicolor*) 등의 자실체로부터 얻은 단백다당체가 항암효과가 있다고 보고되었고[7,10,17,20], 팽나무버섯(*Flammulina velutipes*), 표고버섯(*Lentinus edodes*), 장수버섯(*Formitella fraxinea*) 등의 자실

\* Corresponding author

채 열탕 추출물에서도 종양 억제작용이 있음이 밝혀졌다 [3,4,19]. 또한 표고버섯, 구름버섯, 영지버섯 등의 균사체 배양물에서 항암성분이 확인되었으며[4,7,12,14], 구름버섯, 표고버섯 및 느타리버섯(*pleurotus ostreatus*) 등의 배양 대사산물의 항종양 성분이 보고되기도 하였다[8,18]. 이처럼 버섯류는 자실체 뿐만아니라 균사체에서도 새로운 생리활성 물질이 탐색될 수 있는 좋은 유전자원으로 다양한 기능성 식품소재 및 신약개발 소재로서의 효용가치도 높아지고 있다.

그러므로 본 연구에서는 국내에 자생하는 야생버섯류로부터 항암 활성 물질 및 항돌연변이 물질 탐색 연구의 일환으로 먼저 11종의 야생버섯류로부터 메탄올 추출물을 제조한 후, 발암성과의 상관관계가 높다고 알려진 *in vitro* 실험체인 *Salmonella typhimurium* reversion assay를 행하여 야생버섯 메탄올 추출물의 항돌연변이 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용한 야생버섯 자실체는 경주 남산에서 채취한 후 건조하여 사용하였다. *Salmonella typhimurium* TA 98과 TA100은 미국 캘리포니아 대학의 B. N. Ames 교수로부터 제공받았으며, 돌연변이 유발원인 benzo(a)pyrene (B(a)P)과 N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine(MNNG)은 Sigma사로부터 구입하였고, 기타 시약들은 특급 또는 일급 시약을 사용하였다.

### 버섯 자실체로부터 시료조제

건조된 버섯을 분쇄기로 3,000 rpm에서 고르게 분쇄한 다음 10배의 80% 메탄올을 가한 후 24시간 동안 3회 반복 추출하였으며, 그 상정액을 감압 농축시킨 다음 동결건조하여 10% 에탄올에 녹여 실험에 사용하였다.

### *Salmonella typhimurium* reversion assay

Maron과 Ames 등[2]의 방법에 의해 실험하였다. 즉 미리 멸균시킨 capped tube에 시료 50  $\mu$ l, 돌연변이원 50  $\mu$ l, S9 mix 500  $\mu$ l (직접변이원의 경우, 0.2 M phosphate buffer), 균주 100  $\mu$ l를 넣고 37℃에서 20분동안 prein-

cubation시켰다. 이것을 top agar 2 ml와 혼합한 후 최소 평판배지(minimal glucose agar plates)에 골고루 도말하였다. 37℃에서 48시간 배양한 후 배지위의 복귀변이주(revertant)의 콜로니 수를 계수하였다. S9 mixture 제조는 전보[9]에서와 같이 Maron과 Ames 등[2]의 방법에 따라 웅성 Sprague-Dawley rat에 Aroclor 1254를 복강주사하여 제조하였다. 한 시료에 대하여 3개의 최소평판배지를 사용하였으며, 변이원에 대한 억제 효과의 정도(Inhibition rate)는 아래의 식에 의하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \frac{(a-b)}{(a-c)} \times 100$$

a는 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이의 수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀돌연변이의 수이다.

한편 실험에 사용된 시료와 돌연변이 유발물질의 농도는 예비 실험(독성 실험 및 dose response)을 통하여 결정하였다.

### 통계분석

대조군과 각 시료에 대한 실험 결과는 SAS를 이용한 Duncan's multiple range test로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 추출물의 돌연변이원성

본 실험에 사용한 추출물의 종류 및 농도에 따른 돌연변이원성 유무를 확인하기 위하여 Ames test를 실시한 결과, Table로는 나타내지 않았지만 시료 추출물의 농도를 각 plate당 1.25, 2.5, 5  $\mu$ g으로 첨가하였을 때 농도의 증가에 따른 His<sup>+</sup> revertant의 증가가 없는 것으로 보아 본 실험에 사용한 추출물의 농도에서 시료 자체에 의한 돌연변이원성은 없는 것으로 나타났다.

### 돌연변이원성 억제작용

11종의 한국산 야생버섯 메탄올 추출물들의 돌연변이 억제작용을 검토하기 위하여 직, 간접 발암물질을 첨가하여 이들 발암물질에 대한 억제 효과를 살펴보았다.

Benzo(a)pyrene(B(a)P)은 S9 mix에 의해서 DNA와 반응성이 강한 물질로 변화해서 돌연변이 활성을 나타내는

간접변이원으로, 이 변이원에 대한 야생버섯 메탄올 추출물들의 돌연변이 억제효과를 검토한 결과는 Table 1에서와 같이 굴털이버섯(*Lactarius piperatus*), 노란다발독버섯(*Naematoloma fasciculare*) 및 금빛시루뻨버섯(*Innotus xeranticus*)의 메탄올 추출물이 *S. typhimurium* TA98과 TA100에서 40% 이상의 저해효과를 보였다. 그러나 쓴맛그물버섯속(*Tyloporus* sp.), 삼색도장버섯(*Daedaleopsis tricolor*), 덕다리버섯(*Laetiporus sulphureus*), 끈적버섯속(*Cortinarius* sp.), 잣버섯속(*Lentinus* sp.), 미치광이버섯(*Gymnopilus spetabilis*), 구름버섯(*Coriolus versicolor*), 꽃송이버섯(*Sparass crispa*)의 메탄올 추출물은 *S. typhimurium* TA98과 TA100에서 항변이원성 물질이 존재하지 않는 것으로 관찰되었다.

그리고 직접변이원인 N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine (MNNG)는 세포내의 DNA에 직접 손상을 주는 강력한 변이원으로서, 이 변이원에 대한 야생버섯 메탄올 추출물들의 돌연변이 억제효과에 대한 결과는 Table 2에서와 같이 굴털이버섯, 노란다발독버섯 및 금빛시루뻨버섯의 메탄올 추출물에서 60~70% 정도의 비교적 강한 저해효과를 볼 수

Table 2. Antimutagenic effect of methanol extracts (5 mg/plate) from wild mushrooms on the mutagenicity by N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine (0.35 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatments	Revertants/plate	
	TA100	
Spontaneous	92 ± 3 <sup>1,†</sup>	
MNNG (control)	725 ± 10 <sup>a</sup>	
<i>Lactarius piperatus</i>	261 ± 14(73) <sup>2,c</sup>	
<i>Naematoloma fasciculare</i>	261 ± 13(73) <sup>e</sup>	
<i>Innotus xeranticus</i>	339 ± 16(61) <sup>d</sup>	
<i>Tyloporus</i> sp.	700 ± 9(4) <sup>bc</sup>	
<i>Daedaleopsis tricolor</i>	713 ± 4(-) <sup>ab</sup>	
<i>Sparass crispa</i>	723 ± 11(-) <sup>a</sup>	
<i>Laetiporus sulphureus</i>	708 ± 6(3) <sup>ab</sup>	
<i>Cortinarius</i> sp.	697 ± 5(4) <sup>bc</sup>	
<i>Lentinus</i> sp.	699 ± 8(4) <sup>bc</sup>	
<i>Coriolus versicolor</i>	689 ± 11(6) <sup>c</sup>	
<i>Gymnopilus spetabilis</i>	718 ± 15(-) <sup>a</sup>	

<sup>1</sup>The values are mean ± SD of 3 replications significantly different from the control at p<0.05 level  
<sup>2</sup>The values in parentheses are the inhibition rate (%)

Table 1. Antimutagenic effect of methanol extracts (5 mg/plate) from wild mushrooms on the mutagenicity induced by benzo(a)pyrene (4 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with or without S9 mixture

Treatments	Revertants/plate	
	TA98	TA100
Spontaneous	32 ± 2 <sup>1,i</sup>	109 ± 3 <sup>k</sup>
B(a)P (control)	994 ± 12 <sup>a</sup>	1100 ± 20 <sup>a</sup>
<i>Lactarius piperatus</i>	378 ± 21(64) <sup>2,g</sup>	508 ± 5(60) <sup>j</sup>
<i>Naematoloma fasciculare</i>	574 ± 22(44) <sup>f</sup>	623 ± 22(48) <sup>h</sup>
<i>Innotus xeranticus</i>	206 ± 18(82) <sup>h</sup>	532 ± 9(57) <sup>i</sup>
<i>Tyloporus</i> sp.	916 ± 7(8) <sup>e</sup>	1043 ± 10(5) <sup>bcd</sup>
<i>Daedaleopsis tricolor</i>	932 ± 14(6) <sup>de</sup>	1059 ± 11(4) <sup>bc</sup>
<i>Sparass crispa</i>	970 ± 8(2) <sup>bc</sup>	1039 ± 9(6) <sup>cde</sup>
<i>Laetiporus sulphureus</i>	953 ± 13(4) <sup>cd</sup>	1012 ± 8(8) <sup>f</sup>
<i>Cortinarius</i> sp.	992 ± 6(-) <sup>ab</sup>	1019 ± 8(8) <sup>ef</sup>
<i>Lentinus</i> sp.	943 ± 12(5) <sup>d</sup>	982 ± 9(12) <sup>g</sup>
<i>Coriolus versicolor</i>	934 ± 5(6) <sup>de</sup>	1025 ± 7(8) <sup>def</sup>
<i>Gymnopilus spetabilis</i>	987 ± 8(-) <sup>ab</sup>	1063 ± 6(4) <sup>b</sup>

<sup>1</sup>The values are mean ± SD of 3 replications significantly different from the control at p<0.05 level  
<sup>2</sup>The values in parentheses are the inhibition rate (%)

있었다. 이러한 결과는 초피의 메탄올 추출물이 *Salmonella typhimurium* TA 98과 TA 100 균주에서 MNNG의 돌연변이를 억제시켰다는 보고[10]와 유사한 경향을 나타내었다. 이 결과로부터 버섯의 종류에 따라 직,간접변이원에 대한 저해활성이 같은 경향을 보였음을 알 수 있었으며, Kim 등은 한국산 야생버섯류 중 꽃구멍장이버섯, 짚뽕버섯, 리버섯, 진갈색주름버섯, 테미로버섯, 턱수염버섯 등의 메탄올 추출물이 B(a)P 및 MNNG에 대하여 강한 항변이원 효과가 있음을 보고[9]하였는데 굴털이버섯, 노란다발독버섯 및 금빛시루뻨버섯(*Innotus xeranticus*)의 경우도 이들 야생버섯류와 유사한 경향을 나타내었다.

특히 직,간접 변이원에 대해 비교적 강한 저해활성을 보인 굴털이버섯, 노란다발독버섯 및 금빛시루뻨버섯의 메탄올 추출물들의 농도를 달리하여 직, 간접변이원에 대한 돌연변이 억제 효과를 검토한 결과 각 추출물들의 농도를 1.25, 2.5, 및 5 mg/plate로 증가할수록 농도 의존적인 항돌연변이원성은 크게 나타나지 않았다(Table. 1-4). 이와같이 굴털이버섯, 노란다발독버섯 및 금빛시루뻨버섯의 메탄올 추출물은 직,간접변이원에 대해서 시료의 농도에 관계없이 40~80% 정도의 비교적 높은 항변이원 효과가 있음을

Table 3. Antimutagenic effect of the methanol extracts from *Lactarius piperatus*, *Naematolona fasciculare* and *Innotus xeranticus* on the mutagenicity induced by benzo(a)pyrene (4µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with or without S9 mixture

Treatment	Revertants/plate	
	TA98	TA100
Spontaneous	33 ± 2 <sup>1,d</sup>	109 ± 3 <sup>c</sup>
B(a)P (Control)	994 ± 12 <sup>a</sup>	1,100 ± 20 <sup>a</sup>
B(a)P+ <i>Lactarius piperatus</i> ext.		
1.25 mg/plate	573 ± 5 <sup>d</sup> (44) <sup>2</sup>	515 ± 7 <sup>d</sup> (59)
2.5 mg/plate	490 ± 13 <sup>c</sup> (52)	513 ± 10 <sup>d</sup> (59)
B(a)P+ <i>Naematolona fasciculare</i> ext.		
1.25 mg/plate	651 ± 13 <sup>b</sup> (36)	611 ± 15 <sup>b</sup> (49)
2.5 mg/plate	613 ± 18 <sup>c</sup> (40)	618 ± 20 <sup>b</sup> (49)
B(a)P+ <i>Innotus xeranticus</i> ext.		
1.25 mg/plate	508 ± 9 <sup>c</sup> (51)	558 ± 14 <sup>c</sup> (55)
2.5 mg/plate	494 ± 17 <sup>c</sup> (52)	571 ± 16 <sup>c</sup> (53)

<sup>1</sup>The values are mean±SD of 3 replications significantly different from the control at p<0.05 level

<sup>2</sup>The values in parentheses are the inhibition rate (%)

Table 4. Antimutagenic effect of the methanol extracts from *Lactarius piperatus*, *Naematolona fasciculare* and *Innotus xeranticus* on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine (0.35 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate	
Spontaneous	92 ± 3 <sup>1,d</sup>	
MNNG (Control)	725 ± 10 <sup>a</sup>	
MNNG+ <i>Lactarius piperatus</i> ext.		
1.25 mg/plate	321 ± 15 <sup>b</sup>	(64) <sup>2</sup>
2.5 mg/plate	279 ± 16 <sup>b</sup>	(70)
MNNG+ <i>Naematolona fasciculare</i> ext.		
1.25 mg/plate	214 ± 7 <sup>c</sup>	(81)
2.5 mg/plate	270 ± 11 <sup>b</sup>	(72)
MNNG+ <i>Innotus xeranticus</i> ext.		
1.25 mg/plate	282 ± 17 <sup>b</sup>	(70)
2.5 mg/plate	356 ± 17 <sup>b</sup>	(58)

<sup>1</sup>The values are mean±SD of 3 replications significantly different from the control at p<0.05 level

<sup>2</sup>The values in parentheses are the inhibition rate (%)

알 수 있었다.

이러한 결과는 Kim 등이 먹물버섯 사실휘 에탄올 추출물은 B(a)P에 대해서 *S. typhimurium* TA98의 경우 추출물의 농도에 관계없이 60% 이상의 비교적 높은 돌연변이 억제효과를 나타내었고 또한 *S. typhimurium* TA100의 경우도 모든 추출물의 농도에서 90% 정도의 높은 돌연변이 억제효과를 나타낸다는 보고[21]와 유사한 경향을 나타내었다. 특히 고등균류에서는 heteroglycan, chitin, peptidoglycan, proteoglycan, lecitin, nucleic acid, dietary fiber 등이 β-D-glucan과 결합해서 항암효과를 가진다고 보고되고 있으므로, 이들 야생버섯류의 항돌연변이 활성을 나타내는 성분도 이것들과 관련된다고 사료된다.

그러므로 앞으로 이들 추출물의 돌연변이 억제 작용에 대한 연구 및 항돌연변이 활성 물질의 규명 연구가 필요하다고 하겠다.

## 요 약

천연물질로부터 항돌연변이원성 물질 및 항암 물질 탐색을 위한 연구의 일환으로 11종의 국내산 야생 버섯류로부터 메탄올 추출물을 제조한 후 Ames test를 이용하여 돌연변이 억제효과를 검토하였다. 실험에 사용한 농도에서 야생버섯 추출물 자체의 돌연변이원성은 없었으며 굴털이버섯(*Lactarius piperatus*), 노란다발독버섯(*Naematolona fasciculare*) 및 금빛시루뿔버섯(*Innotus xeranticus*)의 메탄올 추출물은 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100 균주에서 추출물의 농도에 관계없이 간접변이원인 B(a)P에 대하여 40~80% 정도의 항돌연변이 효과를 나타내었으며, 직접변이원인 MNNG에 대해서는 60~80% 정도의 비교적 높은 돌연변이 억제효과를 나타내었다.

## 참 고 문 헌

- Ahn, D. K. 1992. Medicinal fungi in Korea. *Kor. Mycol.* **20**, 154-166.
- Ames, B. N. and D. M. Maron. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173-215.
- Chihara, G., Y. Y. Maeda, Y. Arai and F. Fukuoka. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially

- Lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* **30**, 2776-2781.
4. Cho, S. M., J. H. Lee, S. B. Han, H. M. Kim, S. H. Yu and I. D. Yoo. 1995. Immuno-stimulating polysaccharides from the fruiting bodies of *Formitella fraxinea* (1). *Kor. Mycol.* **23**(4), 332-339.
  5. Chun, H. S., I. H. Kim, Y. J. Kim and K. H. Kim. 1994. Inhibitory effect of rice extract on the chemically induced mutagenesis. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**(2), 188.
  6. Ham, M. S., S. S. Kim, J. S. Hong, J. H. Lee, E. K. Chung, Y. S. Park and H. Y. Lee. 1996. Screening and comparison of active substances of *Angelica gigas nakai* produced in kangwon and *Angelica acutioba* Kitagawa produced in Japan. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**(5), 624-629.
  7. Kang, C. Y., M. J. Shim, E. C. Choi, Y. N. Lee and B. K. Kim. 1981. Studies on antitumor components of *Gandermia lucidum*. *Kor. Biochem. J.* **14**(2), 101.
  8. Kawagish, H. 1994. Cell-function regulating substance from mushrooms. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **68**, 1671.
  9. Kim, H. J., B. H. Lee, O. M. Kim, K. D. Lee and K. R. Lee. 1998. Screening for antimutagenic effects of the wild mushrooms in Korea. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**(3), 688-692.
  10. Kim, S. H. and K. Y. Park. 1993. Inhibitory effects of Chinese pepper on the mutagenicity and growth of MG-63 human osteosarcoma cells. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **21**(6), 628-634.
  11. Kimboll, R. F. 1987. The development of ideas about the effect of DNA repair on the induction of gene mutation and chromosomal aberration by radiation and by chemicals. *Mutation Research* **186**, 1.
  12. Kwag, S. D., J. W. Bok, J. W. Hyun, E. C. Choi and B. K. Kim. 1992. Studies on constituents of higher fungi of Korea(LX X III). antitumor components of the cultured mycelia of *Paxillus atrotomentosus*. *Kor. Mycol.* **20**(3), 240-251.
  13. Kim, H. J., B. H. Lee, O. M. Kim, J. T. Bae, S. H. Park, D. C. Park and K. R. Lee. 1999. Antimutagenic effect of the fruiting body and the mycelia extracts of *Coprinus comatus*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**(2), 452-457.
  14. Lee, K. I., S. H. Rhee, J. O. Kim, H. Y. Chung and K. Y. Park. 1993. Antimutagenic and antioxidative effects of perilla leaf extracts. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **22**(2), 175-180.
  15. Lew, J. W., Chaung C. H., Jeong H. J. and Lee K. H. 1996. Anticomplementary and antitumor activities of the alkali extract from the mycelia of *Lentinus edodes* IY-105. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 571.
  16. Mizuno, T., A. Motoharu, S. Reiko, H. Ito, K. Shizmra, T. Sumiya and M. Akira. 1992. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from an edible mushroom Ningyotake, the fruiting body and the cultured mycelium of *Polyporus confluens*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**(1), 34.
  17. Mutsushima, T., T. Sngimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shiral and M. Sawamura. 1980. Factors modulating mutagenicity in microbial test, In "Short-term test systems for detecting carcinogens", Norpath, K. H. and R. C. Garne. (eds), Springer, Berling 273.
  18. Park, K. S., J. Y. Lee, S. J. Lee, S. H. Kim and J. S. Lee. 1992. Extraction and separation of protein-bound polysaccharide produced by *Coriolus versicolor*(Fr) Quel. *Kor. Mycol.* **20**, 72-76.
  19. Park, M. H., K. Y. Oh and B. W. Lee. 1998. Anticancer activity of *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*. *K. J. Food Sci. Technol.* **30**(3), 702-708.
  20. Woo, M. S. 1983. Studies on anticancer components of *Flammulina velutipes* of Korea(II). *Kor. J. Mycol.* **2**(4), 147-150.
  21. Yang, Y. M., J. W. Hyun, K. H. Lim and J. G. Park. 1996. Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants(III). *Kor. J. Pharmacogn.* **27**(2), 105-110.