

## 까치버섯 (*Polyozellus multiplex*)으로부터 분리한 polyozellin과 thelephoric acid의 항산화 활성

정신교<sup>1</sup> · 전소영 · 이희주 · 김숙경<sup>1</sup> · 김상인 · 김금숙<sup>2</sup> · 권순호 · 김자영 · 송경식\*

경북대학교 농업생명과학대학 응용생물화학부, <sup>1</sup>식품공학과, <sup>2</sup>작물시험장 특용작물과

(2004년 2월 9일 접수, 2004년 4월 30일 수리)

### 서 론

자유라디칼의 반응성은 산소분자 자체처럼 매우 낮은 것에서부터 hydroxyl radical( $\cdot\text{OH}$ )과 같이 매우 높은 것에 이르기까지 매우 다양하다.<sup>1,2)</sup> 산소와 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)은 *in vitro*뿐 아니라 *in vivo*에서도 산화 반응을 개시하는 가장 중요한 촉매이다. 삼중항 산소( $^3\text{O}_2$ )는 다른 분자와 반응하여 superoxide anion radical( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), singlet oxygen( $^1\text{O}_2$ ), 오존( $\text{O}_3$ ) 등과 같은 반응성이 매우 큰 활성산소로 전환되어 생체에 치명적인 산소독성을 일으킨다.<sup>3,4)</sup> 현대인의 환경조건에서는 각종 활성산소종이 체내에 축적 될 기회가 많고 효소적, 비효소적인 방어 시스템에 의하여 정상적으로 소거되지 않게 되면 이로 인한 산화적 스트레스를 받게 된다. 따라서 ROS를 비롯한 free radical은 세포막 분해, 단백질 분해, 지질 산화, DNA 변성 등을 초래하여 세포의 기능장애를 유발하고 암을 비롯한 뇌졸중, 파킨슨 병 등의 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 염증, 노화, 자가면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>5,6)</sup>

항산화제에 대한 연구는 SOD(superoxide dismutase)의 발견을 계기로 시작되었으며 각종 질병이나 노화가 ROS에 의하여 야기된다는 것이 밝혀지면서 노화억제제와 질병치료제의 연구 대상으로 항산화제에 초점이 맞춰졌다. 현재 개발되어 사용되고 있는 butylated hydroxy toluene(BHT), butylated hydroxy anisol(BHA) 등과 같은 합성 항산화제는 발암성 등의 보고<sup>7)</sup>가 있어 보다 안전하고 강력한 항산화제의 개발이 요구되고 있다.

이와 같은 배경에 따라 천연물에서 항산화 성분을 탐색하던 중 한국에서 자생하는 식용버섯인 까치버섯(*Polyozellus multiflex*)의 메탄올 가용성 분획으로부터 항산화 물질을 분리하여 그 구조를 동정하고, 수종의 ROS에 대한 소거활성을 측정하였기에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

**재료 및 시약.** 까치버섯은 2001년 9월에서 10월 사이에 오대산 일대에서 채취하여 전보<sup>8)</sup>와 같은 방법으로 동정하였으며

표본은 경북대학교에 보관하고 있다. 까치버섯은 사용 전까지  $-20^\circ\text{C}$ 에서 보관하였으며 사용 시 통풍이 잘 되는 곳에서 음건한 다음 추출하였다. 흡광도치는 Bio-TEK ELx 808(VT, USA)로 측정하였으며  $^1\text{H}$ - 및  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra는 Bruker Avance Digital 400 spectrometer(Karlsruhe, Germany)로 400과 100 MHz에서 각각 측정하였다. Chemical shift는 TMS를 표준물질로 하여  $\delta$ (ppm)로 나타내었다. FAB-MS는 Micromass VK QUATTRO II(Hertsfordshire, UK)를 이용하였으며 matrix로는 glycerol을 사용하여 positive mode에서 측정하였다. TLC는 precoated silica gel plate(Kieselgel 60F<sub>254</sub>, Merck, NJ, USA)를 이용하였으며 silica gel column chromatography는 Kieselgel 60(Art. 7734, 70-230 mesh, Merck, NJ, USA)을 사용하였다. 기타 시약은 Sigma 사(MO, USA)로부터 구입하였다.

**활성산소 소거능 측정.** Hydrogen peroxide radical에 대한 소거활성은 Müller의 방법<sup>9)</sup>에 따라 행하였으며 hydroxyl 및 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거활성은 각각 Chung 등<sup>10)</sup> 및 Blois의 방법<sup>11)</sup>에 준하여 행하였다. 또한 superoxide anion 소거능은 xanthine-xanthine oxidase system을 이용하여 Iio 등<sup>12)</sup>의 방법에 준하여 실험하였다. ESR은 xanthine-xanthine oxidase system을 이용하여 Luo 등<sup>13)</sup>의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 즉,  $4\mu\text{l}$ 의 시료,  $25\mu\text{l}$ 의 2 mM xanthine,  $25\mu\text{l}$ 의 xanthine oxidase(0.5 U/ml) 및  $50\mu\text{l}$ 의 900 mM DMPO(5,5-dimethylpyrroline-N-oxide)를 혼합한 후 100 mM phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 총부피를 1 ml로 조절하고, 정확히 1분간 방치한 다음 ESR을 측정하였다.

**추출 및 정제.** 까치버섯 600 g을 수욕 중 메탄올로 환류 추출하여 메탄올(MeOH) 추출물 96.4 g을 얻은 다음 각각 2.0 l의 벤젠, 초산에틸(EtOAc) 및 부타놀로 순차적으로 분획하여 EtOAc 가용성 활성분획 30.1 g을 얻었다. 이를 500 ml의 MeOH에 분산시킨 다음 여과지로 감압 여과하여 MeOH 가용성 및 불용성 분획으로 나누었다. MeOH 불용성 분획을 약 10여 차례 MeOH로 세척하여 흑색 분말상의 화합물 1 12.3 mg을 얻었다. 한편, MeOH 가용성 분획(2.1 g)에 대하여는 100 ml의 EtOAc로 세척한 후 잔사(1.2 g)를 다시 500 ml의 MeOH에 분산시킨 다음  $3,000\times\text{g}$ 에서 50분간 원심분리하고 상정액을 모아 감압 농축하였다. 농축한 시료 125 mg에 대하여 semiprep.-HPLC( $\mu$ Bondapak C18, Waters,  $7.8\times 300\text{ mm}$ , 1% HOAc in 60% MeOH,  $2.0\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , UV 254 nm)를 반복 실시하여 연회색 분말상 화합물 2 80.5 mg을 얻었다.

\*연락처

Phone: 82-53-950-5715; Fax: 82-53-956-5715

E-mail: kssong@knu.ac.kr

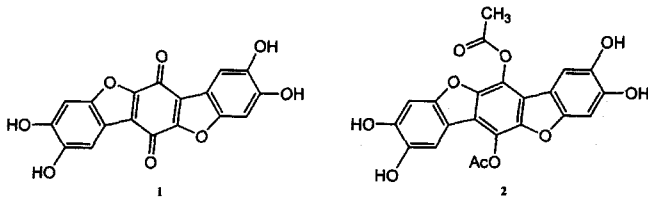


Fig. 1. The structure of thelephoric acid (1) and polyozellin (2).

**화합물 1.** 흑색분말상 화합물.  $\text{FeCl}_3$  양성.  $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 176.6(C-6, C-12, s), 147.5(C-2, C-8, s), 141.6(C-3, C-9, s), 116.1(C-5a, C-11a, s), 115.8(C-4a, C-10a, s), 105.5(C-4, C-10, d), 99.8(C-1, C-7, d).  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7.23 (2H, s, H-4, H-10), 7.13 (2H, s, H-4, H-7).

**화합물 2.** 연회색 분말상 화합물.  $\text{FeCl}_3$  양성.  $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{DMSO-}d_6 + \text{Chloroform-}d = 1:1$ )  $\delta$ : 168.0(C=O, s), 150.7(C-4a, C-10a, s), 146.6(C-3, C-9, s), 142.9(C-2, C-8, s), 137.6(C-5a, C-11a, s), 130.8(C-6, C-12, s), 116.9(C-6a, C-12a, s), 113.5(C-6b, C-12b, s), 106.2(C-1, C-7, d), 98.8(C-4, C-10, d), 20.4(OCH<sub>3</sub>, q).  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{DMSO-}d_6 + \text{Chloroform-}d = 1:1$ )  $\delta$ : 9.23(2H, brs, -OH), 8.78(2H, brs, -OH), 7.21(2H, s, H-1, H-7), 7.14(2H, s, H-2, H-8).

### 결과 및 고찰

화합물 1은  $\text{FeCl}_3$ 에 양성반응을 나타내어 구조 중 phenolic OH group을 함유하고 있는 것으로 판단되었다. FABMS 분석 결과  $m/z$  353에서  $[\text{M}^+ + 1]$  peak가 검출되었으며, UV 분석 결과, 248 및 479 nm에서 흡수 극대가 관측되어 까치버섯류에서 흔히 발견되는 bis-benzofuran 계통의 화합물일 것으로 추측되었다.<sup>14)</sup>  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서  $\alpha, \beta$ -unsaturated ketone으로 예상되어지는 signal이  $\delta$  176.6에서 관측 되었으며, 6개의 방향족 4급 탄소가  $\delta$  147.5부터 115.8사이에서, 두 개의 방향족 3급 탄소가  $\delta$  105.5와 99.8에서 관측되었다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서는  $\delta$  7.13과 7.23에 두 개의 방향족 singlet 수소만이 관측이 되었다. 이러한 결과는 까치버섯에서 분리되어 보고된 적이 있는 대칭형 bis-

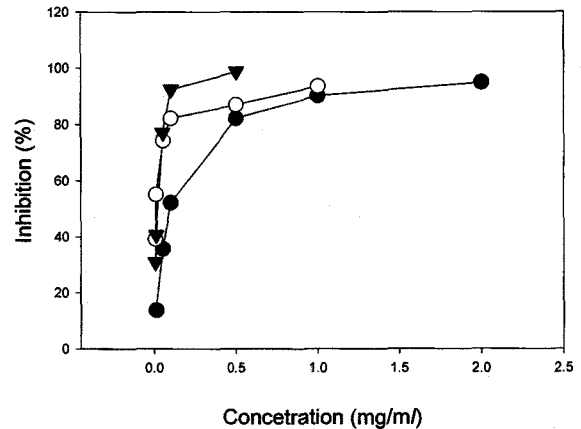


Fig. 2. Inhibition of superoxide radical by thelephoric acid and polyozellin in ESR spectroscopy. Thelephoric acid (○), polyozellin (●), ascorbic acid (▼).

benzofuran quinone 계통과 매우 유사하였으므로, 동족 화합물의 문헌치<sup>15)</sup>를 비교해 본 결과 thelephoric acid와 정확히 일치하였다.

화합물 2는 역시  $\text{FeCl}_3$ 에 양성반응을 나타내었으며 FAB-MS의 결과  $m/z$  439에서  $[\text{M} + 1]^+$  peak가 관측되었다. 한편  $^{13}\text{C-NMR}$  측정 결과, 화합물 1과 매우 유사한 양상을 나타내었으나  $\delta$  176.6에서 나타났던  $\alpha, \beta$ -unsaturated ketone의 resonance가 사라지고 대신  $\delta$  168.0 및 20.4에서 signal이 관측이 되어 1의 ketone기가 reductive acetylation된 형태인 polyozellin일 것으로 예측되었다. 화합물 2의  $^1\text{H-}$  및  $^{13}\text{C NMR data}$ 를 문헌치<sup>16)</sup>와 비교한 결과 polyozellin과 정확히 일치하였다. 이들의 구조는 Fig. 1에 나타내었다.

Thelephoric acid는 0.01 mM 농도에서 73.0%의 hydroxy radical을 저해하였으며, 32.6%의 superoxide anion radical 및 27.4%의 DPPH radical을 소거하였으나 같은 농도에서 hydrogen peroxide에 대하여는 활성을 나타내지 못하였다(Table 1). 한편, 0.1 mM 농도에서는 superoxide anion radical에 대하여는 45.7%의 소거효과를 나타내어 양성대조군으로 사용한 BHA(22.0%) 및  $\alpha$ -tocopherol(25.6%)보다 약 1.8~2배 높은 활

Table 1. Reactive oxygen species scavenging activities<sup>a</sup> of thelephoric acid and polyozellin

Compounds (mM)	Inhibition (%)				
	DPPH <sup>b</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HR <sup>c</sup>	SOA <sup>d</sup>	
TA <sup>e</sup>	0.01	27.4	2.9	73.0	32.6
	0.1	44.0	3.2	74.6	45.7
	1.0	-	33.6	-	-
PZ <sup>f</sup>	0.01	27.4	6.3	69.8	28.1
	0.1	42.2	3.8	79.4	38.7
	1.0	-	90.4	-	-
BHA <sup>g</sup>	0.01	27.4	9.2	73.0	14.5
	0.1	30.7	9.0	79.4	22.0
	1.0	-	95.7	-	-
V-E <sup>h</sup>	0.1	26.5	6.9	75.6	22.1
	1.0	32.7	2.7	83.6	25.6

<sup>a</sup>Presented as an inhibition %. <sup>b</sup> $\alpha, \alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl.

<sup>c</sup>Hydroxyl radical. <sup>d</sup>Superoxide anion. <sup>e</sup>Thelephoric acid. <sup>f</sup>Polyozellin. <sup>g</sup>Butylated hydroxyl anisol. <sup>h</sup> $\alpha$ -Tocopherol.

성을 나타내었으며, 그 이외의 radical 소거활성은 양성대조군과 거의 같은 활성을 나타내었다. 또한 polyozellin 역시 고농도에서 hydrogen peroxide 라디칼에 대한 소거능력이 thelephoric acid에 비하여 높다는 점 이외에는 기타 radical에 대하여 thelephoric acid와 비슷한 정도의 활성을 나타내었다.

측정한 활성산소종 중 대조군에 비해 상대적으로 가장 높은 소거활성을 나타낸 superoxide anion radical에 대하여 ESR에 의한 소거능을 측정하여 보았다. 그 결과, polyozellin의 IC<sub>50</sub> 값은 218.0 μM, thelephoric acid의 IC<sub>50</sub> 값은 21.1 μM로 나타났으며, 양성대조군으로 사용한 vitamin C의 경우는 4.8 μM이었다(Fig. 2).

까치버섯은 한국, 일본 등지에 자생하는 식용버섯으로 prolyl endopeptidase에 대한 저해활성,<sup>15,16</sup> 항암활성<sup>17</sup> 등이 보고되어 있다. 또한 한 등<sup>18</sup> 및 황 등<sup>8</sup>은 지질과산화 저해활성에 대하여 보고한 바 있으나, 그 활성 본체를 완전히 규명하는 데 실패하였다. Thelephoric acid와 polyozellin의 각종 ROS에 대한 소거활성에 대한 보고는 이번이 처음으로 한국산 까치버섯의 식품학적, 의약적 이용에 있어 기초적인 자료로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 과정은 농촌진흥청 바이오그린21 사업 연구비에 의하여 수행되었음을 감사 드립니다.

### 참고문헌

1. Packer, L. (1994) In *Methods in Enzymology: Oxygen Radicals in Biological Systems*. Vol. 233, Part C, Academic Press, San Diego.
2. Wettasinghe, M. and Shahidi, F. (2000) Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chem.* **70**, 17-26.
3. Sawyer, D. T. and Valentine, J. S. (1981) How super is superoxide? *ACC. Chem. Res.* **14**, 393.
4. Fridorich, I. (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 1-11.
5. Davies, K. J. A. (1995) In *Environment, Drugs and Food*

- Additives*, Portland Press, Portland, pp. 1-31.
6. Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative diseases. *Science* **221**, 1256-1264.
7. Wuertzen, G. and Olsen, P. (1986) Chronic study on BHT in rats. *Food Chem. Toxicol.* **24**, 1121-1125.
8. Hwang, J. S., Song, K. S., Kim, Y. S., Seok, S. J., Lee, T. H. and Yoo, I. D. (1996) Lipid peroxidation inhibitors from *Polyozellus multiflex*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 591-596.
9. Muller, H. E. (1985) Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* **259**, 151-158.
10. Chung, S. K., Osawa, T. and Kawakishi, S. (1997) Hydroxyl radical-scavenging effect of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 118-124.
11. Blois, M. S. (1985) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1201.
12. Iio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takai, N. and Fukumoto, M. (1985) Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2173-2182.
13. Luo, G. M., Qi, D. H., Zheng, Y. G., Mu, Y., Yan, G. L., Yang, T. Y. and Shen, J. C. (2001) ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron. *FEBS Lett.* **492**, 29-32.
14. Gripenberg, J. (1960) Fungus pigments-XII. The structure and synthesis of thelephoric acid. *Tetrahedron* **10**, 135-143.
15. Kwak, J. Y., Rhee, I. K., Lee, K. B., Hwang, J. S., Yoo, I. D. and Song, K. S. (1999) Thelephoric acid and kynapcin-9 in mushroom *Polyozellus multiflex* inhibit prolyl endopeptidase *in vitro*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 798-805.
16. Hwang, J. S., Song, K. S., Kim, W. G., Lee, T. H., Koshino, H. and Yoo, I. D. (1997) Polyozellin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase from *Polyozellus multiflex*. *J. Antibiot.* **50**, 773-777.
17. Lee, I.-S. and Nishikawa, A. (2003) *Polyozellus multiflex*, a Korean wild mushroom, as a potent chemopreventive agent against stomach cancer. *Life Sci.* **73**, 3225-3234.
18. Han, J. and Lee, I. S. (2000) Antioxidation and anticancer effects of *Polyozellus multiflex*. *Kor. J. Mycol.* **28**, 55-59.

---

**Antioxidative Effects of Polyozellin and Telephoric Acid Isolated from *Polyozellus multiflex***

Shin-Kyo Chung<sup>1</sup>, So-Young Jeon, Hee-Ju Lee, Suk-Kyung Kim<sup>1</sup>, Sang-In Kim, Geum-Soog Kim<sup>2</sup>, Soon-Ho Kwon, Ja-Young Kim and Kyung-Sik Song\* (*Division of Applied Biology & Chemistry, Kyungpook National University; <sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, 1370, Sankyuk-Dong, Daegu 702-701, Korea; Industrial Crop Division, National Crop Experiment, RDA, Suwon 441-100, Korea*)

**Abstract:** In the course of screening for reactive oxygen species scavengers from natural products, two antioxidants were isolated from the edible mushroom *Polyozellus multiflex* and identified as polyozellin and telephoric acid. Telephoric acid inhibited 45.7% of the super oxide anion radical, 74.6% of the hydroxyl radical, and 44.0% of the DPPH radical at 0.1 mM, while the positive control  $\alpha$ -tocopherol did 22.1%, 75.6%, and 26.5% of each radical, respectively. Polyozellin, the reductive acetylated form of telephoric acid, showed almost same scavenging activity against above mentioned radicals. The isolated compounds showed scavenging activity on the superoxide anion radical in the ESR method ( $IC_{50}$  of polyozellin and telephoric acid were 218.0  $\mu$ M and 21.1  $\mu$ M, respectively). However, they showed no significant activity on the hydrogen peroxide radical.

---

Key words: *Polyozellus multiflex*, reactive oxygen species scavenger, antioxidant, polyozellin, telephoric acid

\*Corresponding author