

## 참나무 원목 및 톱밥에서 재배된 마른진흙버섯 자실체의 에탄올 추출물에 대한 항산화 및 항암활성

황미현 · 김영환<sup>1</sup> · 김길수 · 김태완 · 조우식<sup>2</sup> · 최성국<sup>2</sup> · 김종춘<sup>3</sup> · 박승춘\*

경북대학교 수의과대학

<sup>1</sup>경북기축위생시험소

<sup>2</sup>경상북도농업기술원 환경농업연구과

<sup>3</sup>전남대학교 수의과대학

(게재승인: 2005년 2월 28일)

## Antioxidant and antitumor activities of ethanol extracts from the fruiting body of *Phellinus gilvus* grown in oak and artificial sawdust

Mi-hyun Hwang, Young-hoan Kim<sup>1</sup>, Kil-soo Kim, Tae-wan Kim, Woo-sik Jo<sup>2</sup>,  
Sung-guk Choi<sup>2</sup>, Jong-choon Kim<sup>3</sup> and Seung-chun Park\*

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>1</sup>Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory, Daegu 702-210, Korea

<sup>2</sup>Gyeongbuk Agricultural Technology Administration, Daegu 702-708, Korea

<sup>3</sup>College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Accepted: February 28, 2005)

**Abstract :** The purpose of this study is to examine the elemental compositions, antioxidant and antitumor activity of water, 20%, 40%, 60%, and 80% ethanol extracts obtained from the fruiting body of *Phellinus gilvus*. In electron donating ability test, the strong activities more than 70% were observed in 80 µg/ml of 20%, 40%, 60% and 80% ethanol extracts from the fruiting body of *P. gilvus* grown in oak and sawdust. The antitumor activity was evaluated by sulforhodamine B (SRB) in terms of cell survival level. The tumor cells (sarcoma 180) were treated with various ethanol extracts (water, 20, 40, 60 and 80%). The results showed that all extracts inhibited proliferation showing a dose-dependent manner against tumor cells.

**Key words :** *Phellinus gilvus*, antioxidant, antitumor

### 서 론

동물약품에서 화학물질에 대한 규제는 점차 강화되고 천연물질에 대한 이용이 점차 증가하고 있는 추세이다. 그 중에서 면역 및 항암활성에 대한 물질의 응용은 동물약품시장에서 매우 유용한 소재이다. 그 중 진흙버섯은 전 세계적으로 약 220종이 알려져 있으며 7종이 한국에 분포하고 있다 [1]. 시중에 유통중인 진흙버섯은 분류학적으로는 담자균아문(Basidiomycotina) 민주름버섯

목(Aphyllophorales) 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae) 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색부후균으로 목질진흙버섯(*P. linteus*), 말뚝진흙버섯(*P. igniarius*), 찰진흙버섯(*P. robustus*), 낙엽송진흙버섯(*P. pini*) 그리고 마른진흙버섯(*P. gilvus*) 등이 주로 많이 연구되어 왔다 [1]. 진흙버섯 중 *P. linteus*와 *P. rimosus*의 항종양 효과는 각종 문헌과 연구에서 입증되고 있으며 현재 그 이용은 점차 증가하고 있다 [2-4, 7]. *P. linteus*의 균사체 배양물에서 면역활성효과를 보고하였으며 또한 자연산과 인공

본 연구는 농림부 농림기술연구개발과제(202035-3)의 연구비와 2003년도 두뇌한국21사업에 의하여 수행되었음.

\*Corresponding author: Seung-chun Park

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

[Tel: +82-53-950-5964, Fax: +82-53-950-5955, E-mail: parksch@knu.ac.kr]

재배된 *P. linteus* 사이에 면역활성에 대하여 비교 실험을 실시한 결과 차이가 없음을 보고하였다 [4]. 국내에서 *P. linteus*와 *P. baumii*의 재배기간은 2년 혹은 3년 동안 재배되어 시중으로 유통되고 있으며 주로 참나무 혹은 뽕나무의 원목을 이용하여 재배되는 것으로 알려져 있다. 또한 진흙버섯의 긴 재배기간과 원목의 부담은 진흙버섯의 가격 상승으로 나타나 진흙버섯 농가에서는 제품화의 어려움을 호소하고 있으며 산업체에서는 진흙버섯을 전량 수입하여 제품화하여 결국은 진흙버섯 농가의 경쟁력을 상실하게 만들고 있다. 마른진흙버섯은 경북농업기술원에서 2001년에 품종 등록한 진흙버섯으로 3개월에 자실체의 수확이 가능한 품종으로 항암효과는 *P. linteus*와 큰 차이가 없는 것으로 알려져 있다 [5, 6]. 따라서 고가의 진흙버섯을 저가로 낮추어 기능성식품의 다양화 및 동물약품시장에서 응용이 가능한 제품출시를 기대하고 있다. 동물약품에서의 응용을 위하여 열수추출 방법 대신에 다양한 에탄올을 이용한 추출을 할 경우 더 많은 생리활성을 포함할 수 있어 항산화 및 항암활성을 기준으로 하여 각각에 대한 최적의 자실체 추출용 에탄올 농도를 정하고자 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 시험물질 준비 및 추출

*P. gilvus*는 3개월 동안 참나무 원목과 톱밥 배지에서 속성으로 재배된 것으로 경상북도 농업기술원에서 공급받아 사용하였다. 각각의 *P. gilvus*에 대한 황산화작용 및 항암활성을 비교하고자 자실체를 건조하여 분쇄한 후 D.W., 20%, 40%, 60% 그리고 80% 에탄올을 1:10의 비율로 혼합하여 실온에서 7시간 동안 진탕 추출하였으며 이 과정을 2회 반복하였다. 감압 농축된 시료는 0.22 µm membrane filter (Millipore Corp., USA)에 여과하였다. 여과물은 glucose를 기준으로 한 anthrone 법에 따라 총당을 측정하여 농도를 결정하였다. 여과물의 최고 농도는 rotating vacuum evaporator(modulspin31, Biotron, Korea)을 이용하여 30 µg/ml로 제조하고 이를 Phosphate Buffer Saline(PBS)에 각각 희석하였다. 항암제인 독소루비신(DOX)(Adriamycin, Ildong Pharm., Korea)도 PBS에 희석하여 10, 1, 0.1, 0.01, 및 0.001 mM 농도로 제조하여 실험 전까지 4°C에 보관하였다.

### 자실체 분석

참나무 원목과 톱밥에서 재배된 마른진흙버섯 자실체에 대한 원소분석비를 비교하고자 각각 건조된 진흙버섯을 분쇄기로 분말화하여 각각의 진흙버섯 분말로부터 3군데에서 1 g을 각각 취하여 Elemental Analyzer

(FISON, EA 1110)로 탄소(C), 수소(H), 그리고 질소(N)을 정량 분석하여 비교하였다.

### 항산화 측정

항산화 능력으로 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)에 대한 환원력으로 측정하였다. 각 시료 4 ml (1,000 µg/ml)에  $1.5 \times 10^{-4}$  M의 DPPH 용액 (absolute methanol에 용해) 1 ml를 가하고, vortex에서 10초간 진탕한 후 실온에서 30분 동안 방치한 다음 520 nm에서 흡광도(UV-spectrophotometer; Beckmann, USA)를 측정하였다. 전자공여능은 100-(시료 첨가구의 흡광도/시료 무첨가구의 흡광도)×100으로 나타내었다.

### 항암활성

항암활성 측정을 위하여 마우스 유래 종양 세포주인 암세포주인 sarcoma 180를 한국세포주은행(KOREAN CELL LINE BANK)에서 분양받았다. 종양세포주의 배양 및 유지를 위한 배지는 RPMI 1640을 이용하였으며 fetal bovine serum(FBS) 10%를 첨가하고, penicillin과 streptomycin을 100 units/ml와 100 mg/ml의 농도가 되게 배양액에 첨가하였다. 암세포는 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하여 sulforhodamine B(SRB)법을 시행하였다. SRB법에서 염색된 세포들은 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 490 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 종양 세포들에 대한 시험물질의 효과를 평가하기 위하여 세포수의 측정은 시험물질을 처리한 well의 흡광도를 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군 well의 흡광도로 나누어 %로 나타내었다.

### 통계분석

통계분석은 SAS statistical package(release 8.1 SAS Institute, USA)를 이용하여 ANOVA를 실시하고 그 유의 수준은  $p < 0.05$ 로 하였다. 참나무 원목과 톱밥으로 재배된 마른진흙버섯의 자실체의 원소 함량의 구성비를 비교하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다.

## 결과 및 고찰

Table 1에서 보여주는 것처럼 참나무 원목과 톱밥에서 재배된 자실체의 원소함량은 carbon이 47.3와 46.6%, hydrogen이 5.01%와 5.17% 그리고 nitrogen은 1.12%와 1.46% 등으로 통계학적 유의성은 차이가 없었다. 또한 시험한 진흙버섯의 자실체에서 sulfur는 분석되지 않았다.

전자공여능 활성에 대한 실험결과는 Fig. 1에 나타내

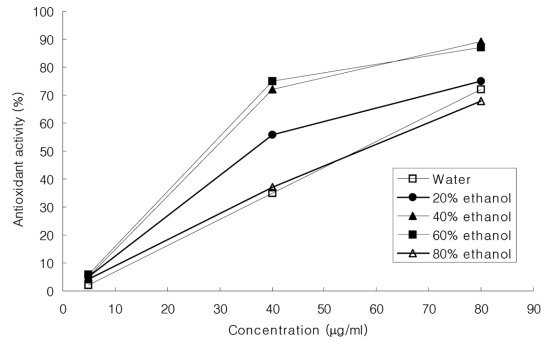
었다. 톱밥에서 재배된 자실체에서 전자공여능에 대한 활성의 차이는 나타나지 않았으나 농도에 따라 전자공여능의 활성이 증가함을 보여주었다. 추출용매를 비교시 40%와 60% 에탄올에서 가장 좋은 활성을 보여주었다. 열수추출 외에 참나무 원목과 톱밥에서 에탄올 함량

에 따른 추출물에서 항암활성을 Fig. 2와 Table 2에 나타내었다. 참나무 원목과 톱밥에서 자란 자실체에서 추

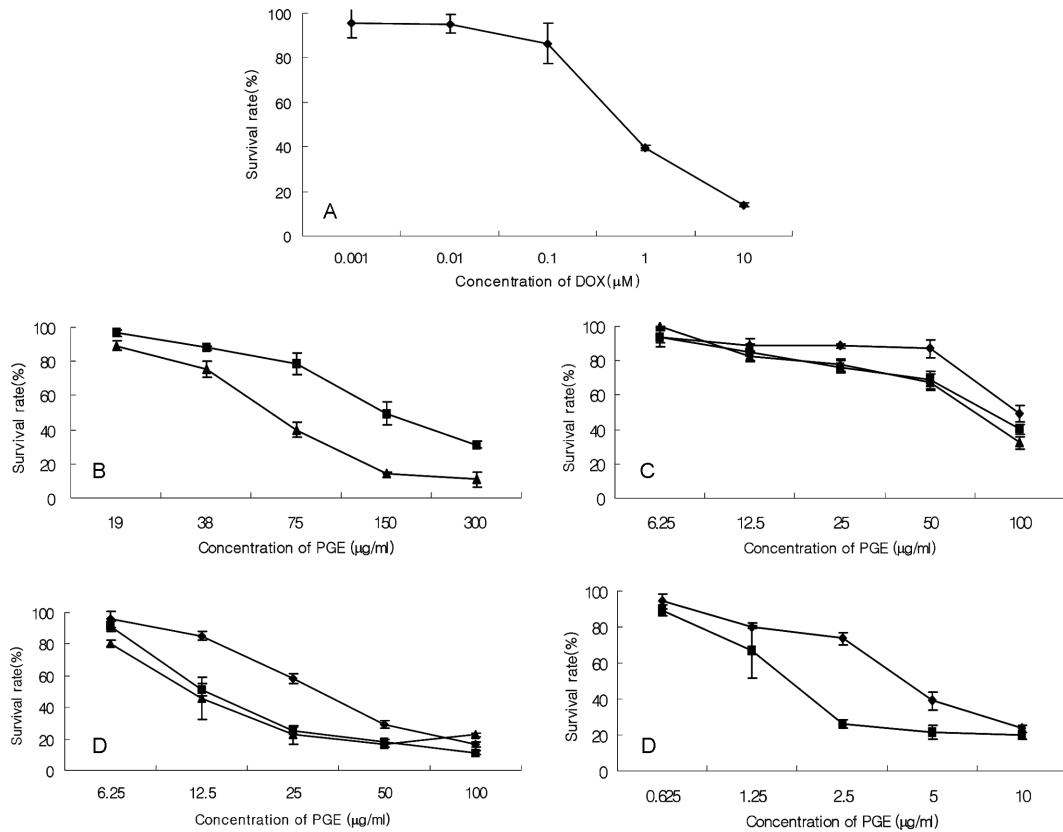
**Table 1.** Comparison of elemental compositions of the fruiting body of *Phellinus gilvus* grown in Oak tree and artificial sawdust

Composition (%)	Oak tree	Oak sawdust
Nitrogen	1.12±0.08	1.46±0.21
Carbon	47.3±0.04	46.6±0.55
Hydrogen	5.01±0.02	5.17±0.02

The value are mean±SD. Statistical analysis was performed by student's t-test.



**Fig. 1.** Electron donating ability of various ethanol extracts obtained from the fruiting body of *Phellinus gilvus*.



**Fig. 2.** Cytotoxicity of various ethanol extracts obtained from the fruiting body of *Phellinus gilvus* grown in oak tree and sawdust. A (doxorubicin), B (■: hot water extract of fruiting body grown in oak tree, ▲: hot fruiting body grown in oak sawdust), C (▲: 60% ethanol extract of fruiting body grown in oak tree, ■: 40% ethanol extract of fruiting body grown in oak tree, ◆: 20% ethanol extract of fruiting body grown in oak tree), D (▲: 60% ethanol extract of fruiting body grown in oak sawdust, ■: 40% ethanol extract of fruiting body grown in oak sawdust, ◆: 20% ethanol extract of fruiting body grown in oak sawdust), and E (◆: 80% ethanol extract of fruiting body grown in oak tree, ■: 80% ethanol extract of fruiting body grown in oak sawdust).

**Table 2.** Comparative cytotoxicity (mean±SE) of the extracts (PGE) obtained from fruiting body grown in the oak tree and oak sawdust culture

Extract solvent	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	Oak tree	Oak sawdust
Hot water	148±22	63±8*
20% ethanol	99±11	32±4*
40% ethanol	83±4	24±2*
60% ethanol	75±3	20±1*
80% ethanol	24±1	18±1

\*IC<sub>50</sub> of PGE was compared between oak tree and sawdust by Student's t-test ( $P < 0.05$ ). The value are mean±SD.

출한 추출물은 모두 용량-의존적인 결과를 보여주었으며 에탄올 함량에 따른 모든 추출물에서도 참나무 원목 재배보다 참나무 톱밥에서 더 높은 항암활성을 보여주었다(Fig. 2). Fig. 2로부터 항암활성을 처리별 항암활성을 비교하고자 참나무 원목에서 열수추출, 20%, 40%, 60% 그리고 80%의 에탄올 추출물에 대한 항암활성(IC<sub>50</sub>) 결과 148, 99, 83, 75 그리고 24 µg/ml의 수치를 보여주었으며 참나무 톱밥에서는 63, 32, 24, 20 그리고 18 µg/ml의 IC<sub>50</sub> 값을 보여주었다. 이러한 결과로 참나무 원목보다는 톱밥에서 재배된 마른진흙버섯이 항암성분이 증가되는 결과로 나타났다. 에탄올이 함유된 추출용매에 추출되는 것으로 보아 항암활성을 나타내는 성분은 β-글루칸은 아닌 것으로 추측이 되며 단백질당체 혹은 다당체 이외의 물질일 가능성이 높은 것으로 생각되었다 [8]. 이상의 결과로부터 톱밥에서 속성으로 재배되는 마른진흙버섯의 자실체를 에탄올로 추출한 추출물에 대하여 항암활성 등을 비롯한 다양한 생리활성이 검증될 경우 동물약품 원료로서 가능성이 기대된다.

## 결 론

본 연구에서는 참나무원목과 톱밥에서 재배된 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)의 자실체의 원소구성비를 분석하였으며 또한 열수추출, 20%, 40%, 60% 그리고 80% 에탄올 추출물에 대한 항산화 및 항암활성을 조사하였다. 참나무 원목과 톱밥에서 재배된 자실체의 원소함량은 carbon이 47.3와 46.6%, hydrogen이 5.01%와 5.17%

그리고 nitrogen은 1.12%와 1.46%로 차이가 없었다. 전자공여능 활성은 40%와 60% 에탄올에서 가장 좋은 활성을 보여주었다. 항암활성은 참나무 원목에서 열수추출, 20%, 40%, 60% 그리고 80%의 에탄올 추출물에 대한 항암활성(IC<sub>50</sub>)은 148, 99, 83, 75 그리고 24 µg/ml의 수치를 보여주었으며 참나무 톱밥에서는 63, 32, 24, 20 그리고 18 µg/ml의 IC<sub>50</sub> 값을 보여주었다.

## 참고문헌

1. 정경수, 김신숙, 김희수. 한국산 목재부후균류의 분포상에 대한 연구 (II)-담자균류 민주름 버섯목의 분포에 대하여. 한국균학회지 1994, **22**, 62-99.
2. Ajith TA, Janardhanan KK. Antioxidant and antihepatotoxic activities of *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. J Ethnopharmacol 2002, **81**, 387-391.
3. Ajith TA, Janardhanan KK. Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extract of *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. Indian J Exp Biol 2001, **39**, 1166-1169.
4. Han SB, Lee CW, Jeon YJ, Hong ND, Yoo ID, Yang KH, Kim HM. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. Immunopharmacology 1999, **41**, 157-164.
5. Hwang HJ, Kim SW, Xu CP, Choi JW, Yun JW. Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus gilvus*. J Appl Microbiol 2003, **94**, 708-719.
6. Jang BS, Kim JC, Bae JS, Rhee MH, Jang KH, Song JC, Kwon OD, Park SC. Extracts of *Phellinus gilvus* and *Phellinus baumii* inhibit pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide in rats. Biotechnol Lett 2004, **26**, 31-33.
7. Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Hong ND, Yoo ID. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. Int J Immunopharmacol 1996, **18**, 295-303.
8. Kim SH, Song YS, Kim SK, Kim BC, Lim CJ, Park EH. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. J Ethnopharmacol 2004, **93**, 141-146.