

상황버섯 (*Phellinus linteus*)으로부터 항산화 및 항균 효과

김인혜¹ · 진은정² · 이재화^{1,2*}
¹신라대학교 의생명과학대학 제약공학과
²신라대학교 공과대학 생명공학과

Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cambodian Mushroom, *Phellinus linteus*

In Hae Kim¹, Eun Jung Jin², and Jae-Hwa Lee^{1,2*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Collage of Medical Life Science
²Department of Bioscience and Biotechnology, Collage of Engineering, Silla University,
Kwaebop-dong 1-1, Sasang-gu, Busan 607-736, Korea

(Received May 2, 2006 / Accepted June 1, 2006)

ABSTRACT : This study was performed to determine the antioxidant, antimicrobial activity and antifungal of the cambodian mushroom, *Phellinus linteus*, in various concentrations from the mushroom extracts. It's extracts were found to cause significant free radical scavenging effects on DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). This extracts exhibited *in vitro* broad-spectrum antimicrobial activity of Gram-negative, Gram-positive bacteria and without antifungal activity. On the other hand, the extracts had not significant hemolytic activity against human red blood cells. These results indicate cambodian mushroom, *Phellinus linteus* having antioxidant and antimicrobial activity without hemolytic activity maybe useful as therapeutic agents.

Key words : mushroom, *Phellinus linteus*, DPPH, free radical scavenging effect.

서 론

과학 기술과 의학의 발전은 많은 질병의 치료를 가능하게 하였다. 최근에는 건강과 well-being에 대한 관심이 증가하여 우리가 섭취하는 식품이 질병치료의 목적으로 이용되는 경우도 많이 보고되어 있다. 우리가 일상생활에서 섭취하고 있는 식품 중에 함유된 각종 성분들은 기존에 알려진 항암제와는 달리 세포독성 및 유전독성이 거의 없기 때문에 인체에 안전하게 사용될 가능성이 높다고 판단되어 우수한 치료제를 천연물로부터 개발하고자 하는 노력이 전 세계적으로 이루어지고 있는 실정이다 (Ji *et al.*, 2000). 국내의 연구 활동을 살펴보면 여러 분야에서 괄목할만한 성장을 보이고 있으며, 주로 천연물과 전통 식품 및 한약제제를 대상으로 유용한 생리활성 기능을 규명하기 위해 노력하고 있다 (Lee *et al.*, 2002).

버섯은 진균류에 속하는 담자균과 자낭균 중 자실체를 형성하는 고등 균류로서 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질 및 비타민 등의 다양한 영양소를 골고루 함유하고 있을 뿐만

아니라 독특한 맛과 향기를 지니고 있으며, 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 왔다. 또한, 저칼로리 식품 및 무공해 식품으로도 각광을 받고 있다 (Sung *et al.*, 1998).

한방에서는 버섯을 약용으로 사용하여 항암 작용, 생체기능 조절 및 뇌졸중, 심장병 등 성인병에 적용하고 있으며, 버섯의 특수 성분을 약품화 하려는 연구가 활발히 진행되어 있다. 구름 버섯으로부터 크레스틴 (PSK)이 정제되어 항암제로 사용되고 있고, 표고 버섯으로부터는 렌티난 (lentinan)이 추출되어 각종 임상 실험이 진행되고 있다 (Yamada *et al.*, 1994).

본 실험에 사용된 상황버섯은 소나무 비늘과에 속하는 버섯이며, 진흙버섯 (*Phellinus*)에 속하는 흰색 부후균이다. 이 버섯은 뽕나무와 활엽수 줄기에 자생하며, 학명은 목질진흙버섯 (*Phellinus linteus*)이라고 하며, 중국, 캄보디아, 한국, 일본 등에서 자생 또는 재배되고 있다. 상황버섯에 대한 연구로는 일본 국립 암센터의 화학 연구 실장이던 치하라 박사 팀이 고형암 (sarcoma 180)에 대하여 종양 저지율 96.7%, 종양 완전퇴치 87.5%의 결과를 보고한 이래 국산 상황버섯의 항암 작용 (Han *et al.*, 1999), 항전이 효과 (Kim *et al.*, 1996) 및 국산 상황버섯의 면역 조절 기능 (Lee *et al.*, 1996) 등이 보고되어 있으며 특히, 상황버섯에서 추출한

*To whom correspondence should be addressed

다당체 들이나 배양된 균사체를 이용하여 다양한 면역 및 항암효과연구가 주로 이루어 졌다. 상황버섯의 항암 유효 성분으로 단백 다당체는 주로 아라비노스 7%, 실리코스 2.8%, 글루코스 21.1%, 갈락토오스 24.1%, 만노오스 44.2% 등으로 구성되어 있다고 보고되어 있지만, 대체로 상황버섯에 대한 연구는 국산 상황버섯을 중심으로 이루어져 있다. 최근 캄보디아산 상황버섯이 민간에서의 항암 효과가 보고되면서 이의 실험적 연구의 필요성이 제기 되었다.

본 연구에서는 캄보디아산 상황버섯을 대상으로 항균 활성, 항곰팡이, 항산화 및 용혈 활성 등을 조사하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

(주) 바이오믹스에서 공급한 캄보디아산 상황버섯은 분말 상태로 제공 받았으며, 상황버섯 분말을 이용하여 본 실험에 사용하였고 실험에 사용하기 전까지 -70°C 에 보관하였다.

시약 및 재료

Sep-Pak C_{18} cartridge는 Waters사 (Miliford, MA, USA)에서 구입하였다. Tryptic soy broth (TSB)와 Lactose-Boullion (LB), potato dextrose agar (PDA) 및 muller-hinton broth (MHB)는 Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 실험에 사용하였다. HPLC-grade의 water (H_2O) 및 acetonitrile (CH_3CN)은 TEDIA사 (Ohio, USA) 와 Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 각각 구입하였고, trifluoroacetic acid (TFA), melittin, low EEO agar, streptomycin, α -tocopherol 및 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

상황버섯 (*Phellinus linteus*)으로부터 시료의 추출

동결 보관된 상황버섯 분말 100 g을 5 L의 끓는 물에 30 분간 가열하였다. 초산을 1% 되게 넣고 4°C 에서 24시간 추출하였다. 균질화된 추출 용액을 원심분리 (8,000 g, 45 min, 4°C)하여 상층액을 농축시켰고, 시료 : MeOH를 1 : 5 (vol/vol)의 비율로 첨가하여 원심 분리 (8,000 g, 45 min, 4°C)를 하였고, 이 과정을 세 번 반복하였다. 이러한 과정을 통하여 고분자 물질을 제거하였다. 농축된 시료는 EtOH 및 NaCl을 시료 (100 mL) : EtOH (500 mL) : NaCl (1.5 g) 비율로 첨가한 후, 다시 원심 분리 (8,000 g, 45 min, 4°C)를 행하였다. 얻어진 상층액이 0.1 N HCl이 되도록 HCl을 첨가하고, 원심분리 (8,000 g, 45 min, 4°C) 하여 침전물을 제

거한 후 Sep-Pak C_{18} cartridge에 시료를 주입하였다. Column 으로부터 0% MeOH (D.W.), 60% MeOH (RM 60) 및 100% MeOH (RM 100)의 물질들을 각각 용출시켰다.

항균활성 측정

상황버섯 추출물의 최소저해농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)를 조사하기 위해 gram-positive bacteria 로서 *Bacillus subtilis* PM125, *Micrococcus luteus* KCTC 1056 및 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916등을 사용하였고, gram-negative bacteria로는 *Escherichia coli* KCTC 1184, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2004 및 *Salmonella typhimurium* KCTC 1925를 사용하였으며, 어병 세균으로는 *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2471과 *Edward tarda* NUF251을 사용하였다.

항곰팡이 활성 측정

항곰팡이의 활성 측정은 liquid growth assay method로 측정하였다 (Gibson *et al.*, 1991). *Candida albicans* KCTC 1940는 potato dextrose broth (PDB) 배지를 사용하여 30°C 에서 48시간 배양하였다. 곰팡이의 농도는 1×10^6 CFU/mL이 되도록 희석하여 96-well plate에 곰팡이 배양액과 연속적으로 희석한 펩타이드 용액을 혼합하였다. 이들은 30°C 에서 48시간동안 배양한 후 Microplate multi-detection (Synergy HT, Biotek, USA)을 이용하여 630 nm에서 측정하였다. 표준시료로서 벌독 유래의 항균활성 펩타이드인 melittin 을 사용하였다.

용혈활성 측정

용혈 활성을 측정하기 위해서 신선한 적혈구를 150 mM NaCl을 포함한 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 세정하여 최종 적혈구의 농도를 5% (v/v)가 되도록 조정하였다 (Park *et al.*, 1996). 적혈구 용액과 연속적으로 희석한 펩타이드 용액을 넣어 37°C 에서 1시간 배양 후, 원심분리 (8,000 g, 10 min)를 행하였다. 그 상층액을 Microplate multi-detection (Synergy HT, Biotek, USA)을 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 적혈구에 시료액이 포함되지 않는 것을 0% (A)로 하고, 1.0% Triton X-100을 넣었을 때의 흡광도를 100% (B)로 정의하여, 시료액을 첨가했을 때 나타나는 상대적인 흡광도 (C)로부터 용혈활성 %를 계산하였다. 표준 시료로는 강력한 Mastoparan (Park *et al.*, 1996)이라는 물질을 사용하였다.

$$\text{Haemolysis (\%)} = (C - A / B - A) \times 100$$

항산화 측정

Free radical scavenging activity를 측정하기 위하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 방법을 사용하였다 (Kitagaki *et al.*, 1999, Koleva *et al.*, 2002). DPPH method는 다음과 같다. DPPH 16 mg을 100 mL의 EtOH에 녹여서 준비하고 시료 50 µ에 DPPH stock 용액을 500 µl 넣은 다음 total volume이 1.0 mL 되도록 EtOH를 첨가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 후, spectrophotometer 517 nm에서 측정한다. 표준 시료로는 α-tocopherol (500 µM)을 사용하였다. 시료의 흡광도를 (A_S)로 표준 시료의 흡광도를 (A₀)로 하여 항산화 효과를 측정하였다.

$$\text{Radical Scavenging Activity (RSA, \%)} = [(A_0 - A_S) / A_0] \times 100$$

결과 및 고찰

항균활성 및 항곰팡이 활성

상황버섯 추출물의 항균 및 항곰팡이에 대한 활성을 각각의 농도별로 최소저해농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)로 측정하였다 (Table 1). 활성의 세기를 관찰하기 위해 positive control (표준물질)로는 벌독 유래의 강력한 항균활성 물질인 melittin을 사용하였다. Table 1을 살펴보면 Gram-positive bacteria인 *B. subtilis* PM125에 대해서만 200 µg/mL의 농도에서 활성을 나타내었고 *M. luteus*와 *S. aureus*에 대해서는 200 µg/mL의 농도에서도 활성을 나타내지 않았다. Gram-negative bacteria의 경우는 거의 활성을 나타내지 않았고 반면에 어병 세균인 *Vibrio sp.*에서 200 µg/mL의 농도에서 약한 활성을 보이고 있으나 *Edward sp.*에서는 25 µg/mL의 높은 활성을 나타내었다. 그러나, 곰팡이인 *C. albicans*에 대하여서는 활성을 나타내지 않았다.

용혈활성 및 항산화 측정

적혈구 막에 대한 상황버섯 추출물의 용혈 활성을 조사하기 위하여 인간의 적혈구를 사용하였다. 인간의 적혈구에 대한 상황버섯 추출물 200 µg/mL의 높은 농도에서도 2%라는 아주 낮은 활성을 나타내었고 그 이후의 농도에서는 2% 미만의 용혈 활성을 보여주고 있다. 이러한 결과는 상황버섯 추출물이 적혈구에는 손상을 입히지 않는 좋은 약물의 후보 물질임을 증명하고 있다 (Table 2).

상황버섯 추출물의 항산화 능력을 조사하기 위하여 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 방법을 이용하여 라디칼 소거능력을 조사하였다 (Fig. 1). 그 결과를 보면 25 µg/mL의 농도에서 100%, 12.5 µg/mL의 농도에서는 87%, 6.25 µg/mL의 농도에서는 64%, 3.13 µg/mL의 농도에서는 49%

Table 1. Antimicrobial activity of mushroom extracts, *Phellinus linteus*

Samples	Minimal inhibitory concentration (µg/mL)	
	mushroom extracts	Melittin
Gram-positive bacteria		
<i>B. subtilis</i> PM125	200 µg/mL	0.78 µg/mL
<i>M. luteus</i> KCTC 1056	NA*	1.56 µg/mL
<i>S. aureus</i> KCTC 1916	> 200 µg/mL	3.13 µg/mL
Gram-negative bacteria		
<i>E. coli</i> KCTC 1184	> 200 µg/mL	0.78 µg/mL
<i>K. pneumonia</i> KCTC 2208	> 200 µg/mL	25 µg/mL
<i>E. aerogenes</i> KCTC 2190	NA*	1.56 µg/mL
<i>P. aeruginosa</i> KCTC 2204	NA*	25 µg/mL
<i>S. typhimurium</i> KCTC 1925	NA*	25 µg/mL
<i>V. parahemolyticus</i> KCTC 2471	100 µg/mL	1.56 µg/mL
<i>E. tarda</i> NUF251	25 µg/mL	0.78 µg/mL
Fungi		
<i>C. albicans</i> KCTC 7965	NA*	> 200 µg/mL

*: NA means not activity.

Table 2. Measurement of haemolytic activity using human erythrocyte

Samples	Hemolytic activity (%)	
	Mushroom extracts	Mastoparan
200 µg/mL	2.0	99.9
100 µg/mL	1.3	99.9
50 µg/mL	1.2	99
25 µg/mL	1.1	99
12.5 µg/mL	0.02	99
6.25 µg/mL	0.01	90
3.13 µg/mL	0.01	90
1.56 µg/mL	0.01	68
0.78 µg/mL	0.01	64
0.39 µg/mL	0.01	41

마지막으로 1.56 µg/mL의 농도에서는 44%의 라디칼 소거능력을 나타내었다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때 상황버섯이 좋은 항산화 물질을 함유함이 판명되었다.

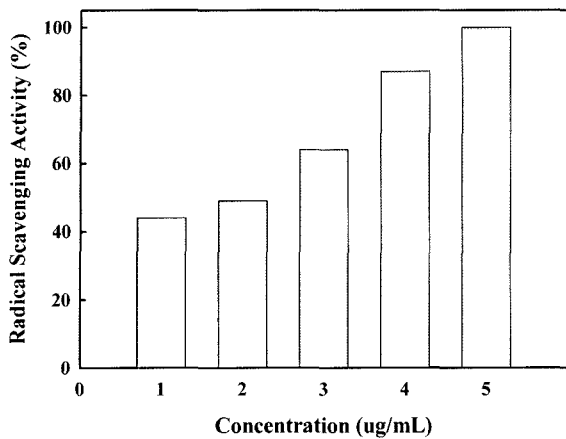


Fig. 1. Free radical scavenging effect on DPPH. Concentration: 1; 1.56 $\mu\text{g/mL}$, 2; 3.13 $\mu\text{g/mL}$, 3; 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 4; 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 5; 25 $\mu\text{g/mL}$.

참 고 문 헌

- Gibson, B.W., Tang, D.Z., Mandrell, R., Kelly, M. and Spindel, R. R. (1991). Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of asian toad, *Bomina orientalis*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23103-23111.
- Han, S.-B., Lee, C.-W., Jeon, Y.-J. (1999). The inhibitory effect of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* on tumour growth and metastasis. *Immunopharmacology*, **41**, 157-164.
- Ji, J.-H., Kim, M.-N., Chung, C.-K. and Han, S.-S. (2000) Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* Extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 322-328.
- Kim, H.M., Han, S.B., Oh, G.T., Kim, Y.H., Hong, D.H., Hong, N.D. and Yoo, I.D. (1996) Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int. J. Immunopharmacol.* **18**, 295-303.
- Kitagaki, H. and Tsugawa, M. (1999) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging ability of sake during storage. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 328-332.
- Koleva, I.I., Van Beveke, T.A. and linszen, J.P.H. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.*, **13**, 8-17.
- Lee, H.J., Lee, H.J., Park, J.M., Song, G.Y., Kang, K.S. and Kim, S.H. (2002) Study on antitumor and limmuno-regulatory effects on cambodian *Phenolions linteus*. *Korean J. Oreintal Physiology & Pathology*, **16**, 332-337.
- Lee, J.H., Cho, S.M., Song, K.S., Hong, N.D. and Yoo, I.D. (1996) Characterization of carbohydrate-peptide linkage of acidic heteroglycopeptide with immunostimulating activity from mycelium of *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*, **43**, 2105-2108.
- Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S., Jackson, R. and Eisenhauer, P. (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods*, **137**, 167-173.
- Park, N.G., Yamato, Y., Lee, S.M., Sugihara, G., Park, J.-S. and Kang, S.-W., The interaction of mastoparan B from venom of hornet *Vespa basalis* with phospholipid matrices. (1996) *Bull. Korean Chem. Soc.*, **17**, 50-56.
- Sung, J.M., Yoo, Y.B. and Cha, D.Y. (1998) Mushroom kyo-haksa, *Seoul*, 3.
- Yamada, S. (1994) Mycelial culture method of *Phellinus linteus*. *Korean patient* 92-1194.