

약용버섯의 생리활성 분석

허 현

동국대학교 생명과학과

Analysis of Biological Activities of Medicinal Mushrooms

Hyun Hur

Department of Life Science, Dongguk University, Seoul 100-715

Abstract – This study was carried out to observe the antioxidative activity, fibrinolytic activity, nitrite scavenging ability and adenosine content of three medicinal mushrooms. Among water and ethanol extract of each mushroom, water extract of *Inonotus obliquus* (Czech) showed the highest antioxidative activity (57.1 ug/ml), nitrite scavenging ability (52.04%), fibrinolytic activity (86.8%) and adenosin content (94.3 μg/g), whereas nitrite scavenging ability of ethanol extract of *Phellinus linteus* showed higher than that of water extract. Apart from the above statements, water was effective than ethanol as extracting solvent in general. These results suggest that *Inonotus obliquus* (Czech) showed higher activities such as antioxidative activity, nitrite scavenging ability, fibrinolytic activity and adenosin content and water was effective as solvent except for nitrite scavenging ability.

Keywords – *Inonotus obliquus*, *Phellinus linteus*, Fibrinolytic activity.

고등균류인 버섯은 다양한 종류의 성분을 함유하고 있어 예로부터 식용과 약용으로 사용되고 있다. 인¹⁾에 의하면 국내에는 약 1,500여 종의 버섯이 자생하는데 이 중 약 400여 종이 식용으로 약 100여 종이 약용으로 가능하다고 한다. 최근 상황버섯과 차가버섯은 그의 생리기능성 물질들이 보고되고 있다. 진흙버섯류는 일반적으로 담자균문 (Basidiomycotina), 민주름버섯목 (Aphyllphoraies), 소나무비늘과 (Hymenochaetaceae)에 속하는 진흙버섯속 (*Phellinus*)의 균류를 지칭하는 버섯으로 뽕나무 줄기에서 자생하며 샷샷표면을 제외하고 모두 황색이므로 상황이라 알려져 있고, 진흙버섯속 (*Phellinus*)에 속하는 버섯으로는 목질진흙버섯 (*Phellinus linteus*), 말뚝진흙버섯 (*P. Igniarius*), 마른진흙버섯 (*P. gilvus*), 낙엽진흙버섯 (*P. pini*), 참진흙버섯 (*P. contiguus*) 등 다수가 있는데 우리나라에서는 *Phellinus linteus*를 상황으로 인정하고 항암활성이 높은 것으로 보고되어 있다.²⁾ 상황버섯의 생리활성으로는 Ham 등³⁾은 상황버섯 methanol 추출물이 복수암에 걸린 쥐의 수명을 농도의존적으로 연장함을 보고하였고, 사람의 면역조직의 기능을

항상시키며⁴⁾ 항돌연변이원성과 암세포에 대한 세포독성 효과⁵⁾ 및 대장암과 방광암 등의 원인 효소인 장내세균 유해효소 저해효과,⁶⁾ 체액성 및 세포성 면역반응의 항진효과,^{7,8)} 소화기계통의 항암작용⁹⁾ 등이 알려져 있다. 한편 차가버섯 (*Inonotus obliquus*)은 담자균문의 다공균과 (Polyporaceae)에 속하는 약용버섯으로¹⁰⁾ 숙주인 자작나무류 (*Betula*), 오리나무류 (*Alnus spp*), 가래나무류 (*Caryas pp*), 너도밤나무류 (*Fagus spp*), 새우나무류 (*Ostrya spp*) 등에 기생하여 감염된 수목에 치명적인 피해를 주는 수병균의 일종이며,¹¹⁾ 감염이 된 후 십 수 년이 지나면 검은 덩이 모양체의 균핵체 (conk)를 형성하여 차가로 불리는 모양체는 균핵체의 표면이 검고 내부는 황갈색을 띠는데^{6,12)} 약용효과는 균핵체 덩이에서 추출된 수용성 및 불용성 다당체가 항종양 활성을 나타낸다고 하며,^{13,14)} 대장암 및 위암세포에 차가버섯 추출물을 장기간 처리할 때 항암효과가 있으며,¹⁵⁾ 차가버섯의 betulinic acid는 면역증강 작용¹⁶⁾ 등의 효과가 있어 민간에서 널리 이용되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 약용버섯 중 북한산 상황버섯과 북한산 및 체코산 차가버섯 추출물의 생리활성을 밝히고자 하였다.

*교신저자(E-mail): hhyun1305@yahoo.co.kr
(FAX): 02-848-8489

재료 및 방법

실험재료 - 본 연구에서 사용된 차가는 체코산과 북한산으로, 체코산은 체코현지에서, 북한산은 경동시장에서 구입하고 북한산 상황버섯은 (주)포립코리아(경기도 용인시)에서 구입한 후 풍건하고 세분하여 사용하였다. 본 시료는 동국대학교 생명과학과 이민웅 교수가 감정을 하였으며, 표본들(DU08I-01, DU08I-02, DU08P-01)은 동국대학교 생명과학과 미생물실에 보관되어 있다.

시약 - 정량분석에 사용한 표준물질은 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였고 기타 시약들은 특급시약 혹은 HPLC Grade를 사용하였다.

물 추출물의 제조 - 건조된 시료분말 10 g에 증류수 1 l를 넣어 water bath에 넣어 100°C 4시간 추출한 다음 여과지로 여과 하였다. 여액을 감압농축장치를 이용하여 농축한 후 50 ml로 하여 시료로 사용하였다.

에탄올 추출물의 제조 - 건조된 시료분말 10 g에 95% 에탄올 1 l를 넣어 water bath에 넣어 80°C, 4시간 추출한 다음 여과지를 이용하여 여과하였다. 여액을 감압농축장치를 이용하여 농축한 후 50 ml로 하여 시료로 사용하였다.

DPPH 프리라디칼 소거법에 의한 항산화활성 - DPPH radical 분석은 Williams 등¹⁷⁾의 방법을 응용하였다. 농도별로 조제한 시료 각 200 µl를 60 µM DPPH 에탄올 용액 2.8 ml에 첨가한 후 vortex를 이용하여 혼합하였다. 혼합한 용액을 30분간 암실에서 반응 시킨 후 Spectrophotometer (UV-1650PC, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 515 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 시료의 DPPH 프리라디칼 소거활성은 시료 무첨가의 control의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양(µg), 즉 IC₅₀치를 측정하였다.

아질산염의 소거능 측정 - 각 추출물 1 ml와 1 mM NaNO₂ 1 ml에 0.1N HCl로 pH 1.2로 보정하여 반응액의 용량을 10 ml로 하였다. 이 반응액을 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 각 반응액 1 ml를 취하여 2% 초산용액 5 ml로 반응을 정지시킨 후 Griess 시약 0.4 ml를 첨가하였다. 이를 교반한 후 실온에서 15분간 방치하고 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 양을 측정하였다. 대조구는 Griess 시약 대신 증류수를 첨가하여 측정하고, 아질산염 소거능은 대조구에 대한 시료구의 흡광도 감소율로 나타내었다.¹⁸⁾

$\text{Inhibition rate}(\%) = [100 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도})] \times 100$

혈전용해 활성 - 50 mM 인산완충용액 (pH 7.8, 0.15 M NaCl)에 fibrinogen(Sigma, U.S.A)을 0.5%가 되도록 용해시키고, 완전히 용해된 fibrinogen 용액 5 ml에 동일한 완충용

액에 2% agarose 용액 5 ml를 첨가하여 충분히 혼합하였다. 여기에 다시 thrombin(100 unit/ml) 0.1 ml를 첨가하여 혼합한 후 즉시 plate에 붓고 실온에서 5~10분간 방치하여 고화시킨 후 6 mm 구멍을 만들어 fibrin plate를 제조하였다. 각 시료 20 µl를 취하여 fibrin plate의 시료구멍에 주입하고 37°C에서 18시간 반응시킨 다음, fibrin plate의 용해면적을 측정하였다. 대조구로서는 정제된 혈전용해효소인 plasmin 1.0 unit를 fibrin plate에 첨가하여 형성된 lysed zone의 직경을 측정한 후 점질물의 활성과 비교하였으며, 다음과 같은 방법으로 혈전용해 활성을 산출하였다.¹⁹⁾

$\text{혈전용해 활성}(\%) = (\text{시료의 용해영역} / \text{plasmin의 용해영역}) \times 100$

아데노신 함량분석 - 물 및 에탄올 추출물을 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하여 이액 20 µl를 주입하여 분석하였다. 이때 사용한 HPLC는 SPD-20A Detector가 장착된 Shimadzu CBM-20A를 사용하였고 컬럼은 Cosmosil 5C18 RP를 사용하였다. 오븐온도는 30°C를 유지하였으며 이동상으로는 3% acetonitrile in formic acid system을 사용하였고 이때 유속은 1.0 ml/min, UV 파장은 254 nm이었다. 검량선은 0.096 µl/ml~0.480 µl/ml의 농도를 단계별로 제조하여 각 20 µl를 injection하여 HPLC의 피크면적으로부터 검량선의 회귀방정식과 R²값을 구하였다.

통계처리 - 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정은 Student's *t*-test를 이용하여 나타냈다.

결과 및 고찰

DPPH 프리라디칼 소거활성 - Herting 등²⁰⁾에 의하면 전자 공여능은 시료에 함유되어 있는 flavonoids 및 phenolic 성 물질 등에 대한 항산화작용의 지표라 하였다. 이러한 물질들은 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성 산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거활성을 기대할 수 있고 인체 내에서는 free radical에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다.²¹⁾ 본 실험에서 시료별 추출물의 free radical 소거능은 IC₅₀으로서 산화를 50% 억제시키는데 요구되는 시료의 양으로서 그 결과는 Table I과 같다. DPPH는 물 추출물에서 체코산 차가 57.1 µg/ml, 북한산 차가 85.1 µg/ml, 북한산 상황버섯 149.7 µg/ml이었으며 에탄올 추출물의 경우 북한산 상황 289.2 µg/ml, 북한산 차가 481.0 µg/ml이었고, 체코산 차가는 검출되지 않았다. Lee²²⁾는 700종의 식물 추출물로부터 항산화 활성을 조사했을 때 IC₅₀ 값이 200 µg/ml 이하에서 활성이 있는 것으로 구분하여 그 중 102종이 항산화 활성이 높았다는 보고로 미루어 보면 본 실험에서 밝혀진 차가 및 상

Table I. DPPH free radical scavenging activity of extracts from *Inonotus obliquus* and *Phellinus linteus*

Extract	IC ₅₀ (ug/ml) ^c		
	<i>Inonotus obliquus</i> ^a	<i>Inonotus obliquus</i> ^b	<i>Phellinus linteus</i>
Water	57.1	85.1	149.7
Ethanol	-	481.0	289.2

a. *Inonotus obliquus* collected from Czech Republic
 b. *Inonotus obliquus* collected from N. Korea
 -. Not detected
 c. Concentration giving a 50% decrease of DPPH free radical

Table II. Nitrite scavenging ability of extracts from *Inonotus obliquus* and *Phellinus linteus*.

Extract	Nitrite scavenging ability(%) ^c		
	<i>Inonotus obliquus</i> ^a	<i>Inonotus obliquus</i> ^b	<i>Phellinus linteus</i>
Water	52.04±0.188**	39.38±0.125**	24.17±0.193
Ethanol	39.80±0.611**	32.96±0.174**	30.71±0.069

a. *Inonotus obliquus* collected from Czech Republic
 b. *inonotus obliquus* collected from N. Korea
 c. The values are mean±S.D. of 3 replications. Significantly different from *Phellinus linteus* (**p<0,01)

황버섯의 물 추출물의 IC₅₀값이 각각 57.1 ug/ml, 85.1 ug/ml 그리고 149.7 ug/ml의 범위로 나타나 DPPH 프리라디칼 소거 활성은 비교적 높은 것으로 생각된다.

아질산염 소거능 - 추출물이 발암성 nitrosamine 생성의 전구물질인 아질산염을 소거하거나 또는 분해하는 작용을 알아보기 위해 본 실험에서 측정된 아질산염 소거능을 Table II에 나타냈다. 물 추출물은 체코산 차가 52.04%, 북한산 차가 39.38% 그리고 북한산 상황버섯 24.17% 순으로 분석되었고, 에탄올 추출물은 체코산 차가 39.8%, 북한산 차가 32.96% 그리고 북한산 차가버섯 30.71%순으로 분석됐다. 아질산염은 그 자체가 지니는 독성 때문에 일정농도 이상 섭취하게 되면 혈중의 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 methemoglobin과 같은 중독 증상을 일으키는 것으로 보고되어 있는데,²³⁾ 본 실험에서 나타난 차가와 상황버섯이 갖고 있는 아질산염 소거능의 결과는 다른 식품들과 함께 이용할 경우 좋은 재료가 될 것으로 생각된다.

항혈전 활성 - 혈전증은 활성화된 트롬빈이 피브리노겐을 피브린으로 전파시켜 서로 중합체를 형성하게 하여 생성되는 혈전에 의하여 발생되는 질병이다.²⁴⁾ 근래에 혈전과 섬유소원을 직접 용해하는 효소를 뱀독²⁵⁾과 지렁이²⁶⁾로부터 분리 정제에 관한 보고가 있다. 본 실험에서 차가 및 상황버섯 추출물로부터 혈전용해 활성을 측정할 결과를 Table III에 나타냈다. 물 추출물에서 혈전용해 활성은 체코산 차가 86.83%, 북한산 차가 75.93%, 그리고 북한산 상황버섯

Table III. Fibrinolytic activity of extracts from *Inonotus obliquus* and *Phellinus linteus*.

Extract	Fibrinolytic activity(%) ^c		
	<i>Inonotus obliquus</i> ^a	<i>Inonotus obliquus</i> ^b	<i>Phellinus linteus</i>
Water	86.8±16.3*	75.93±9.67	62.0±10.73
Ethanol	-	-	70.36±6.70

a. *Inonotus obliquus* collected from Czech Republic
 b. *Inonotus obliquus* from N.Korea
 c. The values are mean±S.D. of 3 replications. Significantly different from *Phellinus linteus* (*p<0,05)
 -. Not detected

Table IV. Adenosin content of extracts from *Inonotus obliquus* and *Phellinus linteus*.

Extract	Adenosin content(mg/g) ^c		
	<i>Inonotus obliquus</i> ^a	<i>Phellinus linteus</i>	<i>Inonotus obliquus</i> ^b
Water	0.0943±0.0006**	0.092±50,0008**	0.0128±0,0012
Ethanol	-	-	-

a. *Inonotus obliquus* collected from Czech Republic
 b. *Inonotus obliquus* from N.Korea
 -. Not detected
 c. The values are mean±S.D. of 3 replications. Significantly different from *Inonotus obliquus*^b (**p<0,01)

62,0%로 측정되었으며 에탄올 추출물의 혈전용해 활성은 북한산 상황버섯 추출물이 70.36%로 물 추출물 보다 높게 측정된 반면 차가의 경우에는 검출되지 않아 대조를 보였다. Kim 등은 여러 가지 버섯 추출물 중 *Leucoagaricus rubrotinctus* (돌여우 버섯)는 39%, 먹물버섯과의 *Psathyrella* sp.는 49%, 송이버섯과의 *Lepista sordida* (자주방망이버섯 아재비) 41%, *Marasmius pulcherripes* (종이꽃낙엽버섯) 112%, *Oudemansiella* sp. 26%의 혈전용해 활성을 보고한 바 있다.²⁷⁾ 본 실험에서는 에탄올 추출물의 혈전용해 활성은 북한산 상황버섯만이 70.36%를 보였을 뿐 차가에서는 혈전용해 활성이 없다는 Park 등²⁸⁾의 보고처럼 차가는 물 추출물에서 혈전용해 활성이 있는 것으로 보이며 상황버섯의 경우는 물과 에탄올 추출물 모두에서 비슷한 혈전용해 활성을 보여 다른 버섯들과는 상이한 결과를 보였다.

아데노신의 함량분석 - Mizuno 등에 의하면 버섯에 들어있는 아데노신과 같은 염기성 물질이 혈소판 응집억제 작용과 관련이 있다고 보고하였다.²⁹⁾ 본 실험에서 물과 에탄올 추출물을 분석하여 나타난 아데노신의 함량을 Table IV에 나타냈다. 물 추출물에서 아데노신함량은 북한산 상황버섯 0.0925 mg/g, 체코산 차가 0.0943 mg/g, 북한산 차가 0.0128 mg/g 순으로 분석되었다. 반면 에탄올 추출물에서는

차가와 상황버섯 모두 아데노신이 검출되지 않아 물 추출물과 대조를 보였다.

결 론

북한산 차가버섯과 상황버섯, 체코산 차가버섯을 용매별로 추출하여 항산화 효과와 생리활성 그리고 아데노신을 분석하였다. 항산화 효과는 DPPH radical 소거활성이 체코산 차가버섯의 물 추출물이 57.1 ug/mg로 가장 높았으나 에탄올 추출물에서는 활성이 나타나지 않았다. 아질산염 소거능은 체코산 차가버섯의 물 추출물에서 52.04%로 가장 높게 나타났으며 상황버섯은 에탄올 추출물이 30.7%로 물 추출물보다 높게 측정되었다. 항혈전 활성은 차가버섯이 물 추출물에서만 활성을 보인 반면 상황버섯은 물과 에탄올 추출물에서 모두 활성을 나타냈으며 에탄올 추출물에서 활성이 높게 측정되었다. 생리활성물질 아데노신의 함량은 물 추출물에서 체코산 차가가 0.0943 mg/g으로 가장 높게 분석되었고 에탄올 추출물에서는 검출되지 않았다.

사 사

이 논문은 한국학술진흥재단의 일부 지원에 의하여 연구되었습(No.C00004)을 감사드립니다.

인용문헌

- An, D.G. (1992) Medicinal mushrooms in Korea. *The Korean Journal of Mycology* **20**: 154-166.
- Sung, J. M., Yoo, Y. B. and Cha, D. Y. (1998) Mushroom Science. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd. Korea. 589-590.
- Ham, I. H., Jeong, M. Y., Choi, Y. J., Lee, S. D., Sung, H. G., Shim, S. S. and Whang, Y. K. (2002) Physiological activities of *Phellinus linteus* as ethano-medical preparation *Chung-Ang J. Pharm. Sci.* **14**: 23-27.
- Chung, K. S. and Kim, S. S. (1994) Effect of Kp, an anti-tumor protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus*, on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep fed blood cells. *Arch. Pharm. Res.* **16**: 336-338.
- Ji, J. H., Kim, M. N., Chung, C. K. and Ham, S. S. (2000) Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**: 322-328.
- Kier, L. (1961) Triterpenes of *Poria obliquus*. *J. Pharm. Sci.* **50**: 471-474.
- Kim, D. H., Choi, H. J. and Bae, E. A. (1998) Effects of artificially cultured *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacterial enzymes and rat intestinal α -glucosidases. *J. Food Hyg. Safty* **13**: 20-23.
- 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.
- Ikekawa, T., Nakanish, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuroka, F. (1968) Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus*. *Gann.* **59**: 1714-1715.
- Kim, S. Y., Lee, J. U., Kim, K. Y., Park, J. M., Kim, M. O., Lee, T. S. and Lee, J. D. (2004) Phylogenetic relationships between the genus *Inonotus* and its related genera based on the nucleoside sequence of internal transcribed spacers. *The Korean Journal of Mycology* **32**: 152-157.
- Terho, M. and Hallaksela, A-M. (2005) Potential hazard characteristics of *Tilia*, *Betula*, and *Acer* trees removed in the Helsinki city area during 2001-2003. *Urban Forestry & Urban Greening* **3**: 113-120.
- Shivrina, A. N. (1967) Chemical characteristics of compounds extracted from *Inonotus obliquus*. *Chem. Abstr.* **66**: 17271-17279.
- Kahols K., Kangas L. and Hitunen R. (1987) Antitumor activity of some compounds and fractions from an *n*-hexane extract of *Inonotus obliquus* in vitro. *Acta. Pharm. Fennica.* **96**: 33-40.
- Kahols K., Kangas L. and Hitunen R. (1989) Ergosterol peroxide, an active compounds from *Inonotus obliquus*. *Planta Med.* **55**: 389-390.
- Hwang, Y. I., Rho, K. W. and Kim, S. H. (2003) Effects of *Inonotus obliquus* extracts of proliferation and caspase-3 activity in human castro-intestinal cancer cell lines. *Kor. J. Nutr.* **36**: 18-23.
- Chung, Y. S. (2002) A study of disease treatment by *Inonotus* mushroom. Ph.D thesis, Evangel Christian Univ. of America
- Williams, W. B., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT.* **28**: 25-30.
- Grayand, J. and Dugan, L. R. (1975) Inhibition of *N*-nitrosoamine formation in model food system. *J. Kor. Soc. Food Sci.* **40**: 981-985.
- Yang, E. I. (2005) Physiological functions of *Chungkook-jang* and viscous substance. master thesis, Chonbuk national university, Jeonju, Korea.
- Herting, M. C. L., Feskens, E. J. M., Hoffman, P, C. H., Katan, M. B. and Kromhout, D. (1993) Dietart antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease : the Zutphen Elderly study. *Lancet* **342**: 1007-1011.
- Torel, J., Gillard, J. and Gillard, P. (1986) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* **25**: 383-385.
- Lee, S. K. (1997) Evaluation of cancer chemopreventive activity mediated by antioxidants and modulators of tumor promotion. Ph D thesis. University of Illinois at Chicaco. pp. 52-54.

23. Peter F. S. (1975) The toxicology of nitrate, nitrite and *N*-nitroso compounds. *J. Sci. Food. Agric.* **52**: 1761-1764.
24. Marks, D., Marks, A. and Smith, C. (1996) Basic medical biochemistry. Williams and Wilkins, Baltimore. p 157.
25. Chung, K. H. and Kim, D. S. (1992) Fibrinolytic and coagulation activities of Korean snake venoms. *Korean Biochem. J.* **25**: 696-701.
26. Park, Y. D., Kim, J. W., Min, B. G., Seo, J. W. and Jeong, J. M. (1998) Rapid purification and biochemical characteristics of *Lumbrokinase* III from earthworm for use as a fibrinolytic agent. *Biotechnol. Lett.* **20**: 169-172.
27. Kim, J. H., Yoo, K. H., Seok, S. J. and Kim, Y.S. (2005) Screening of fibrinolytic activities of extracts from wild mushroom. *Journal of Mycology* **33**: 18-21.
28. Park, J. S., Hyun, K. W., Seo, S. B., Cho, S. M., Yoo, C. H. and Lee, J. S. (2003) Detection of platelet aggregation inhibitors and fibrinolytic substances from mushrooms. *The Korean Journal of Mycology* **31**: 114-116.
29. Mizuno, T. (1994) Food Function and Medicinal Effects of Mushroom Fungi. pp 1-170. Laboratory of Biochemistry. Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka.

(2008년 9월 22일 접수)