

상황버섯 추출물의 항산화 및 성분분석

김 아 름 · 김 정 은 · 박 수 남[†]

서울과학기술대학교 자연생명과학대학 정밀화학과
나노바이오화장품연구실, 화장품융합기술연구소
(2011년 10월 1일 접수, 2011년 11월 25일 수정, 2011년 11월 28일 채택)

Antioxidative Activity and Component Analysis of *Phellinus linteus* Extracts

A Reum Kim, Jung Eun Kim, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Nanobioscience Lab., Cosmetic R&D Center, Seoul National University of
Science and Technology, 232 Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received October 1, 2011; Revised November 25, 2011; Accepted November 28, 2011)

요약: 본 연구에서는 상황버섯 추출물의 항산화 및 항노화 활성 및 항균 효과, 그리고 성분분석에 관한 연구를 수행하였다. 상황버섯 추출물의 자유 라디칼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC₅₀)은 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획(2.94 µg/mL)에서 가장 큰 활성을 나타내었고, 루미놀-의존성 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 상황버섯 추출물의 총항산화능은 추출물의 에틸아세테이트 분획(0.0072 µg/mL)에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 광증감제인 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였을 때 농도범위(5 ~ 50 µg/mL)에서 50 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획 모두 농도-의존적으로 세포 보호 효과를 나타내었다. 타이로시네이스의 활성 저해 효과(IC₅₀)를 측정한 결과 50 % 에탄올 추출물(IC₅₀ = 6.34 µg/mL)에서 우수한 효과를 나타내었으며, 엘라스테이스의 활성 저해 효과(IC₅₀)는 에틸아세테이트 분획(IC₅₀ = 14.08 µg/mL)에서 큰 효과가 나타났다. TLC, HPLC 및 LC/ESI-MS를 이용하여 상황버섯 추출물 ethyl acetate 분획의 주성분을 분석하였고 hispidin 유도체인 interfungin A를 확인하였다. 이상의 결과들은 상황버섯 추출물이 ROS에 대하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로써 작용할 수 있으며, 특히 상황버섯 추출물의 에틸아세테이트 분획을 항산화, 항노화 및 미백 기능성 화장품 소재로써의 응용 가능성을 확인하였다.

Abstract: In this study, the antioxidative effect, antibacterial, inhibitory effects on tyrosinase, inhibitory effects on elastase and component analysis of *Phellinus linteus* (*P. linteus*) extracts were investigated. The ethyl acetate fraction of *P. linteus* extracts (2.94 µg/mL) showed the highest free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC₅₀). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activity (OSC₅₀) of *P. linteus* extracts on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system was investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The ethyl acetate fraction (0.0072 µg/mL) showed the most prominent ROS scavenging activity. The protective effects of extract/fractions of *P. linteus* extracts on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *P. linteus* extracts showed cellular membrane protective effects in a concentration dependent manner (5 ~ 50 µg/mL). The inhibitory effect (IC₅₀) on tyrosinase of *P. linteus* extract was the highest at 50 % ethanol extract (6.34 µg/mL), and the inhibitory effect (IC₅₀) on elastase of *P. linteus* was the highest at ethyl acetate fraction (14.08 µg/mL). TLC, HPLC chromatogram and LC/ESI-MS of the ethyl acetate fraction obtained from *P. linteus* extracts were identified interfungin A (PL RPT-1a). These results indicate that extract/fractions of *P. linteus* can function as antioxidants in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging ROS, and protect cellular membranes against ROS. Extract/fractions of *P. linteus* can be applicable to new cosmetics for antioxidant, antiaging, antiwrinkle and whitening.

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

Keywords: *Phellinus linteus*, antioxidative activity, antiaging activity, LC/ESI-MS, component analysis

1. 서 론

피부노화는 인체의 노화에 따라 피부에 나타나는 변화를 말하며 원인으로 크게 내적요인과 외적요인으로 나눌 수 있다. 내적요인은 나이의 증가에 따른 노화현상을 말하며 외적요인은 다양한 환경적인 요소들 중 특히 매일 노출되는 신체부분에서 자외선에 의해 야기된다. 자외선은 UVC (200 ~ 280 nm), UVB (280 ~ 320 nm), UVA (320 ~ 400 nm)로 나뉘며 빛의 파장이 짧을수록 투과력이 약하고, 길면 투과력이 강하다. UVC는 파장이 짧아 대기권을 통과하지 못하기 때문에 UVB와 UVA가 피부에 직접적인 영향을 미친다. UVB는 UVA보다 화상을 일으키는 강도, DNA에 손상을 일으키는 정도가 매우 강하지만 지표면에 도달하는 양이 UVA보다 적고 표피에만 피부손상을 야기한다. 하지만 UVA는 투과력이 강하여 피부에 보다 더 깊이 침투하여 진피의 손상을 야기시킨다. 이러한 UVB와 UVA에 피부가 노출되면 생체 내 광증감제 분자에 의한 자외선 흡수로부터 type I 반응과 type II 반응으로 superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($\cdot OH$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen (1O_2) 등의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다[16]. 이러한 ROS는 macrophage나 neutrophil과 같은 면역계 세포가 외부로부터 침입한 병원균을 죽이는 유용한 역할을 하지만 세포에 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하여 콜라겐 및 엘라스틴 분자의 절단, 비정상적인 교차결합 및 섬유아세포의 능력 감소 등 세포 성분들에 대한 손상을 일으켜 주름을 생성시키고 멜라닌 생성 과정에 참여하는 등 광노화를 촉진시킨다[15].

정상적인 세포에서도 대사과정 중 소량의 자유 라디칼과 기타 활성산소 및 과산화물이 생성되지만 산화적 손상에 대처하기 위해 생체 내에는 방어기구로서 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase 등의 항산화효소와 함께 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone 등과 같은 항산화물질이 존재한다. 그러나 피부는 다양한 환경적 요인과 항상 접촉하고 있으며 산화적 스트레스에 직접적으로 노출되어있기 때문에 생체 내의 산화적 스트레스와 항산화성 방어망의 불균형이 일어나 활성산소가 증가하여 노화와 암이 발생하게 된다. 따라서 활성산소를 소거

할 수 있는 화합물(free radical scavenger) 또는 과산화물 생성억제 물질과 같은 항산화제를 사용한다면 노화 및 암을 예방할 수 있을 것이다[7,13-16]. 특히 합성 항산화제인 butylhydroxytoluene (BHT)와 butylhydroxyanisole (BHA)의 부작용이나 독성이 보고되면서 독성이 거의 없는 인체에 안전한 천연물로부터의 항산화제를 개발하고자 하는 노력이 이루어지고 있다[17].

버섯은 진균류에 속하는 담자균 중 자실체를 형성하는 고등균류로 항암작용, 생체기능 조절 및 뇌졸중, 심장병과 같은 성인병에 대한 효능이 보고되면서 소비자들의 관심이 높아지게 되었다[1]. 특히 상황버섯(*P. linteus*)은 민주름버섯목, 소나무비늘버섯과의 진흙버섯속에 속하며 예로부터 위암, 식도암, 십이지장암, 결장암, 직장암 및 간암 수술 후 화학요법을 병행할 때 면역기능을 항진시키며 해독작용을 한다고 알려져 있다[2,3]. 최근에는 소나무비늘버섯과에 속하는 *Phellinus* 속과 *Inonotus* 속의 자실체로부터 polyphenol 화합물인 phelligradimer A[4], phelligradin G[5], phelligradins C ~ F[6], davalialactone[7], inonoblin A ~ C[8], interfungin A ~ C[9] 등이 분리되었고 균사체로부터는 phellinsin A[10], phellinusfurans A, B[11]가 보고되었으며 hispidin 자체보다 hispidin 유도체가 더 항산화효능이 높다고 보고되고 있다[12].

따라서 본 연구에서는 천연 항산화제를 찾아 화장품 원료로서 사용가능한 상황버섯 추출물을 제조하여 이들 추출물(혹은 분획)의 항균활성과 자유 라디칼 소거활성, 총 항산화능, 1O_2 로 유도된 세포손상에 대한 보호활성, 더 나아가 기능성 화장품의 원료로서 타이로시네이즈 저해 효과, 엘라스테이즈 저해 효과를 측정함으로써 항산화 및 항노화 화장품의 천연 소재로서 응용 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

(+)- α -Tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, EDTA, 루미놀, 헤파린, 증감제로 사용된 rose-bengal, 자유 라디칼 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 $FeCl_3$

·6H₂O는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H₂O₂는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea) 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된 Na₂HPO₄ · 12H₂O, NaH₂PO₄ · 2H₂O, NaCl, 그리고 trizma base, HCl, 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학발광기는 Berthold (Germany)의 6-channel LB9505 LT를, pH meter는 Istek (Korea) 제품을 사용하였으며, 상황버섯 성분분석을 위한 HPLC는 Shimadzu (Japan)사의 제품을 사용하였다. LC/ESI-MS (Applied Biosystems, USA)는 서울대학교 농생명 과학공동기기에 분석 의뢰하였다. 성분분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet silica gel 60 F₂₅₄ (0.2 mm)로 Merck (USA)에서 구입하였고 본 연구에서 사용한 상황버섯은 2010년 경동시장에서 구입하여 실험에 사용하였다.

2.2. 상황버섯 분획 추출

잘게 자른 건조된 상황버섯 100 g을 50 % 에탄올 2 L를 이용하여 삼일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 50 % 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 비극성 성분을 제거하기 위해 헥산을 처리한 후 에틸아세테이트로 추출한 분획을 감압 농축하여 파우더를 얻었다. 에틸아세테이트 분획 중 일부는 산 가수분해 반응을 이용해 당을 제거시킨 후 얻은 아글리콘 파우더를 실험에 사용하였다. 아글리콘 제조 방법은 에틸아세테이트 분획 가용분 일정량에 H₂SO₄ 및 아세톤 용액을 넣고, 4 h 동안 증탕 가열하면서 환류 · 냉각시킨 후 그 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 증류수로 산, 염기 및 당 등을 제거한 후 다시 에틸아세테이트로 추출하고 이를 감압 · 농축하여 실험에 사용하였다.

2.3. 상황버섯 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성

노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 자유 라디칼이 원인 물질로 알려져 있다. 따라서 DPPH를 이용하여 상황버섯 추출물의 자유 라디칼 소거활성을 측정하였다. 실험방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL을 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후

spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율을 나타내었다. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, µg/mL)로 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left\{ 1 - \left[\frac{A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100$$

2.3.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계는 각종 ROS (O₂^{·-}, ·OH 그리고 H₂O₂)를 생성시키며 철이나 구리 같은 전이금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical (·OH) 발생에 있어서 중요한 역할을 한다. 따라서 이 반응을 이용하면 ROS에 대한 총항산화능을 측정할 수 있는데 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 ROS의 검출은 루미놀과 ROS 사이의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 알 수 있다.

실험 방법은 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 추출물과 2.5 mM EDTA 40 µL 및 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 µL를 가한 후 35 mM 루미놀 80 µL를 넣은 다음 흔들어 섞어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣는다. 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 µL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃ · 6H₂O를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, µg/mL)로 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100$$

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 헤파린이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9 % saline phosphate buffer (pH 7.4, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.6 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5×10^7 cells/mL이었다.

2.4.2. 상황버섯 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 μL 씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 미리 항온배양시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 μM) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사 하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm \times 20 cm \times 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min 동안 광조사 하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. 상황버섯 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다.

대조군(control)은 τ_{50} 이 31 min으로 오차범위 ± 1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안 했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균하였다. 상대적인 광용혈 보호 효과는 다음과 같이 나타내었다.

$$\text{Relative protective effects} = \frac{\text{Sample } \tau_{50}}{\text{Control } \tau_{50}}$$

2.5. 타이로시네이즈 저해활성 측정

타이로시네이즈는 멜라닌 생성과정 중 L-타이로신에서 3,4-dihydroxy-L-phenyl ananine (DOPA)를 거쳐 DOPA-quinone으로 산화되는 과정에서 핵심효소로 작용한다. 따라서 타이로시네이즈의 저해활성은 미백활성을 측정하는데 매우 유용하다. L-타이로신 (0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.85 mL, 시료 0.05 mL를 혼합한 후 37 °C 수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 타이로시네이즈 저해활성은 타이로시네이즈의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration, IC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 표기하였다.

2.6. 엘라스테이즈 저해활성 측정

피부노화, 특히 주름생성에는 활성산소에 의한 작용과 matrix metalloproteinases (MMPs : collagenase, elastase 등)에 의한 세포외 매트릭스의 파괴가 주원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs의 저해활성 측정은 피부노화 억제 평가에 있어 매우 중요하다. Tris-Cl (pH 8.0) 0.12 M에 엘라스테이즈 기질인 *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide 1.0 mM이 용해된 buffer 92.5 μL 를 첨가하여 25 °C에서 10 min동안 미리 항온배양시킨 후 여기에 엘라스테이즈 용액을 100 μL 첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25 °C 수욕상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료대신 시료용액으로 사용된 용매를 100 μL 첨가하였다. Blank는 *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.12 M Tris-Cl buffer 1,300 μL 를 첨가하였으며, 농도는 실험군과 동일하였다. 엘라스테이즈 저해활성은 엘라스테이즈의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration, IC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 표기하였다.

2.7. 상황버섯 추출물의 항균 활성 측정

2.7.1. 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 여드름의 원인균인 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) ATCC6919와 비듬균인 *Pityrosporum ovale* (*P. ovale*) ATCC12078, 호기성 그람 양성 균주인 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC6538, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC23736는 한

국 미생물 보존센터에서 분양 받아 사용하였다.

2.7.2. 배지 및 배양조건

*P. acnes*의 배양 배지는 Reinforced clostridial (RC) 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 *P. acnes*는 4 °C에서 보관하면서 실험 72 h 전에 활성화 시켰으며, 균을 배양 배지에 접종한 후 anaerobic jar에서 Gaspack system (Merck Anaerocult® Gaspack system, Germany)을 이용하여 밀봉하여 37 °C에서 72 h 동안 혐기성 배양하였다. 호기성 균주인 *S. aureus*와 *E. coli*는 Mueller-Hinton 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 균을 접종한 후 37 °C incubator에서 24 h 배양하면서 사용하였다. 또한 비듬균인 *P. ovale*는 Pityrosporum 배지(Malt extract agar : 6 %, ox-bile : 2 %, tween 40 : 1 %, glycerol mono-oleate : 0.25 %)를 사용하였으며 균을 접종한 뒤 30 °C에서 24 h 동안 배양하여 사용하였다.

2.7.3. 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)

최소억제농도(MIC)는 한천배지 확산법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 각각의 분획물을 2 mL씩 함유한 배지 20 mL를 petri dish에 주입하였고, 시험균을 평판 배지 위에 0.1 mL 접종하였다. *P. acnes*는 37 °C에서 72 h 후에, *S. aureus*와 *E. coli*는 37 °C에서 24 h 후에, *P. ovale*는 30 °C에서 48 h 후에 육안으로 관찰하였을 때, 각각의 균들이 증식되지 않는 농도를 MIC로 결정하였다.

2.8. 상황버섯 추출물의 hispidin 유도체 분석

2.8.1. TLC 및 HPLC를 이용한 상황버섯 추출물의 Hispidin 유도체 분석

상황버섯 에틸아세테이트 분획을 100 % 에탄올에 녹여 syringe filter (0.45 µm)로 여과한 후 비극성 TLC 및 HPLC를 이용하였다. 비극성 TLC 분석에 사용한 전개용매는 90 %, 70 % 메탄올이며, HPLC 분석은 0.1 % formic acid 수용액과 100 % acetonitrile을 이용해 기울기 용리법으로 분석하였으며 HPLC 분리조건은 Table 1에 나타내었다. 성분확인인 이미 보고된 분광학적 자료를 이용하여 확인하였다.

2.9. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5 % 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

Table 1. HPLC Conditions for Separation of Ethyl Acetate Fraction from *P. linteus*

Condition of HPLC analysis	
Column	Shim-pack VP-ODS (L : 250 mm, LD : 4.6 mm)
Detector	SPD-M20A Diode array detector
Detection wavelength	380 nm
Flow rate	0.5 mL/min
Injection volume	20 µL
Mobile phase	0.1 % Formic acid in water : 100 % Acetonitrile = 90 : 10 ~ 0 : 100 (gradient)

3. 결과 및 고찰

3.1. 상황버섯 추출물의 항산화 활성

3.1.1. DPPH법을 이용한 자유 라디칼 소거활성

(+)- α -Tocopherol, flavonoids 등의 항산화제는 활성 산소종 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응인 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. DPPH는 화합물 내 질소 중심의 안정한 자유 라디칼로 환원력을 가지는 항산화제와 반응 후 DPPH 흡광도 감소로 자유 라디칼의 소거활성을 알아볼 수 있다.

상황버섯 추출물과 비교물질인 (+)- α -tocopherol의 자유 라디칼 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과 50 % 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 그리고 아글리콘 분획에서 각각 12.9 µg/mL, 2.94 µg/mL, 3.74 µg/mL로 나타났으며, 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol의 FSC₅₀는 8.98 µg/mL로 나타났다. 상황버섯 추출물 중 특히 에틸아세테이트 분획에서 자유 라디칼 소거활성이 비교물질로 사용된 (+)- α -tocopherol보다 약 3배 더 우수한 라디칼 소거활성을 나타내었다(Figure 1).

3.1.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성산소 소거활성(총항산화능)

루미놀은 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 활성산소종에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 420 ~ 450 nm에서 발광하는 것으로 알려져 있다. 상황

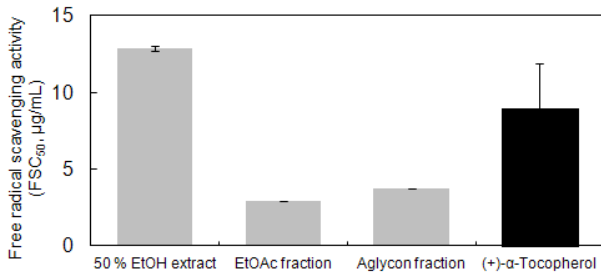


Figure 1. Free radical scavenging activities of extract/fractions of *P. linteus* and reference.

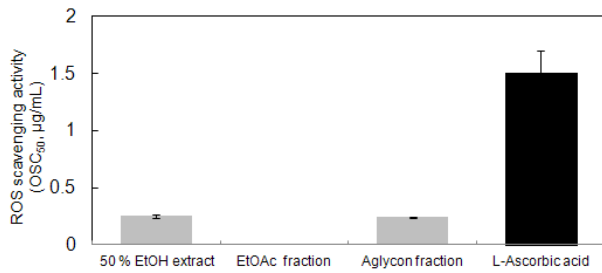


Figure 2. ROS scavenging activities of *P. linteus* extracts and reference by luminol-dependent chemiluminescence assay.

버섯 추출물의 50 % 에탄올 추출물의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 0.25 µg/mL, 에틸아세테이트 분획은 0.0072 µg/mL으로 나타났으며 아글리콘 분획의 총항산화능은 0.24 µg/mL으로 나타났다. 비교물질로 사용한 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid는 1.5 µg/mL로 나타났다. 상황버섯 추출물의 모든 분획에서 L-ascorbic acid보다 6배 이상 큰 활성을 나타내었다(Figure 2).

3.2. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

상황버섯 추출물을 이용하여 활성산소에 의해 야기되는 세포 손상에 대한 보호효과를 적혈구 광용혈법으로 측정하였고 각 분획의 농도에 따른 세포 보호효과를 Table 2에 나타내었다. 적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ₅₀)은 세포보호활성이 클수록 크게 나타나는데 상황버섯 추출물의 50 % 에탄올 추출물은 5, 10, 25, 50 µg/mL에서 각각 50.4, 66.0, 90.3, 117.3 min, 에틸아세테이트 분획 또한 동일한 농도 범위에서 44.5, 67.3, 87.6, 102.6 min으로 나타났다. 비교물질로 사용한 (+)-α-tocopherol은 10, 50 µg/mL에서 각각 38.00 min, 74.33 min으로 동일 농도에서 상황버섯 추출물의 효능이

Table 2. Cellular Protective Effects of Extract/Fraction from *P. linteus* and Reference Compounds on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration, µg/mL	τ ₅₀ (Half time of hemolysis ¹⁾)			
	5	10	25	50
<i>P. linteus</i> extract (50 % EtOH extract)	50.4 (± 1.76)	66.0 (± 0.60)	90.3 (± 0.57)	117.3 (± 0.49)
<i>P. linteus</i> extract (EtOAc fraction)	44.5 (± 3.25)	67.3 (± 2.25)	87.6 (± 1.25)	102.6 (± 1.85)
(+) - α -Tocopherol	-	38.00 (± 1.80)	-	74.33 (± 6.35)

¹⁾ Control, τ₅₀ = 31 ± 1.0 min

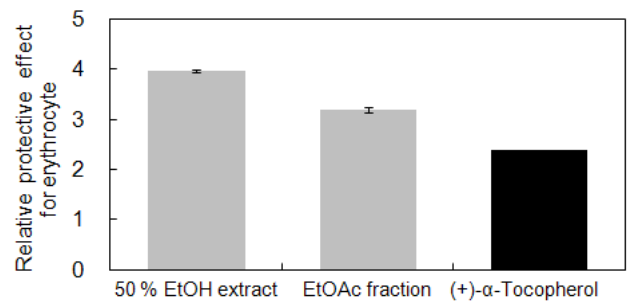


Figure 3. The relative protective effects of extract/ fraction of *P. linteus* and (+)-α-tocopherol at 50 µg/mL on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes (Relative protective effect = sample τ₅₀ / control τ₅₀).

약 1.5배 정도 더 우수한 세포보호 활성이 있는 것으로 나타났다(Figure 3).

3.3. 타이로시네이즈 저해활성

멜라닌 생성과정의 핵심적인 효소인 타이로시네이즈는 L-타이로신으로부터 시작되는 멜라닌 합성과정에서 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)로부터 DOPA quinone으로 산화되는 과정과 dihydroxyindole (DHI)로부터 유멜라닌으로 전환되는 과정에서 촉매역할을 한다. 따라서 타이로시네이즈 저해활성을 통해 미백활성 측정을 할 수 있다.

상황버섯 추출물 중 50 % 에탄올 추출물의 타이로시네이즈 저해활성(IC₅₀)은 6.34 µg/mL으로 나타났으며

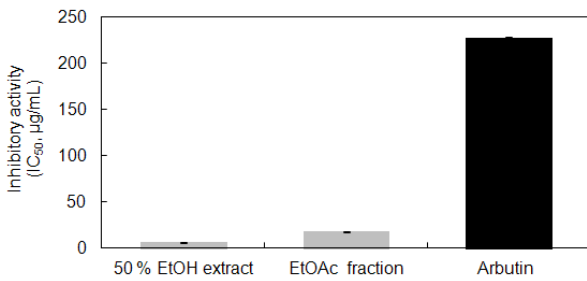


Figure 4. The inhibitory effect of extract/fraction obtained from *P. linteus* and reference compound on tyrosinase.

에틸아세테이트 분획의 경우 17.78 µg/mL로 50 % 에탄올 분획이 약 3배 더 큰 저해활성을 보였으며 비교물질로는 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려져 있는 알부틴의 저해활성(IC₅₀ = 226.88 µg/mL)을 측정한 결과 상황버섯 추출물이 약 12배 이상 더 타이로시네이즈 저해활성이 더 우수한 것으로 나타났다(Figure 4). 따라서 상황버섯 추출물을 미백화장품에 응용할 경우 우수한 미백효과를 나타낼 것으로 사료된다.

3.4. 엘라스테이즈 저해활성

Matrix-metalloproteinases (MMPs)는 피부 진피층에 존재하며 자외선 및 활성산소등에 의해 유발되어 피부노화, 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs에는 콜라제네이즈, 젤라티네이즈 및 엘라스테이즈 등이 있으며, 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 엘라스테이즈의 활성 감소는 매우 중요하다.

상황버섯 추출물 중 50 % 에탄올 추출물은 61.44 µg/mL으로 나타났으며 에틸아세테이트 분획의 경우 14.08 µg/mL로 나타났다. 비교물질로 사용한 oleanolic acid (IC₅₀ = 13.7 µg/mL)과 비교하였을 때 50 % 에탄올 추출물 보다 에틸아세테이트 분획에서 비슷한 저해활성을 나타냈다(Figure 5).

3.5. 상황버섯 추출물의 항균 활성

상황버섯 추출물의 피부 상재균에 대한 항균 활성을 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. 여드름 균인 *P. acnes*에 대한 상황버섯 추출물의 50 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획의 MIC는 각각 0.50 %, 0.25 %으로 화장품에 주로 사용되는 항균제인 메틸 파라벤(MP, MIC = 0.25 %) 및 천연 플라보노이드 성분인 quercetin (MIC = 0.30 %)과 비슷한 항여드름 균 활성을 나타냄을 확인하였다. 피부에서 습진의 주원인으로 작용하는

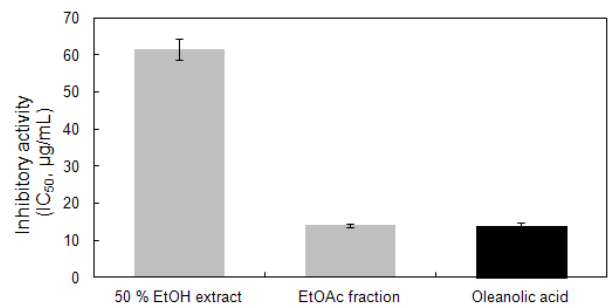


Figure 5. The inhibitory effects of extract/fraction obtained from *P. linteus* and reference compound on elastase.

Table 3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC, w/v %) of Extract/Fraction from *P. linteus* against Various Bacteria

Strains	<i>P. linteus</i> extract (50 % EtOH)	<i>P. linteus</i> extract (EtOAc fraction)	Methyl paraben	Quercetin
<i>E. coli</i>	-	0.50	0.13	0.06
<i>P. ovale</i>	-	0.50	0.13	0.15
<i>P. acnes</i>	0.50	0.25	0.25	0.3
<i>S. aureus</i>	0.25	0.06	0.25	0.15

gram(+) 균주 *S. aureus*에 대한 상황버섯 추출물의 50 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획의 MIC는 각각 0.25 %, 0.06 %으로 나타났으며 MP (MIC = 0.25 %)와 quercetin (MIC = 0.15 %)과 비교하였을 때 50 % 에탄올 추출물보다 에틸아세테이트 분획에서 더 낮은 농도로 *S. aureus*의 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 비듬균인 *P. ovale*에 대한 상황버섯 추출물 에틸아세테이트 분획의 MIC는 0.5 %로 비교물질인 MP (MIC = 1.3 %)와 quercetin (MIC = 0.15 %)과 비교하였을 때 항균활성을 나타내지 않았으며 대장균인 *E. coli*에 대한 상황버섯 추출물의 에틸아세테이트 분획의 MIC는 0.5 %으로 나타나 MP (MIC = 0.13 %)와 quercetin (MIC = 0.06 %)보다 낮은 항균활성을 나타냈으며 50 % 에탄올 추출물의 경우에는 항균활성을 나타내지 않았다. 현재 사용되고 있는 방부제나 항균제가 평균적으로 0.20 ~ 0.40 % 정도의 농도 범위 내에서 사용하고 있는 것을 감안하면 특히 *S. aureus*에 대한 천연 방부제 · 항균제로서 역할이 충분히 기대된다.

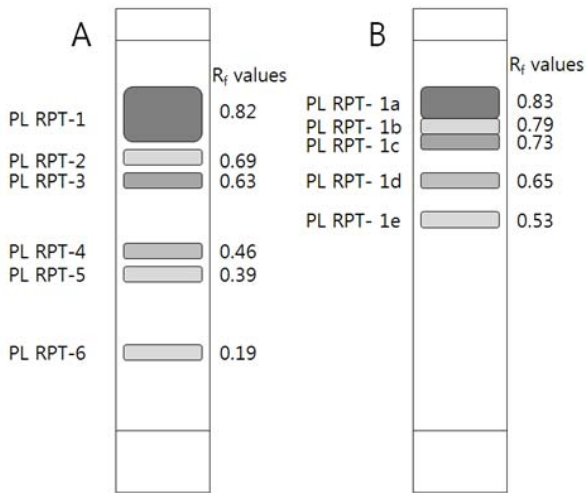


Figure 6. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *P. linteus*. Eluent system : A : Methanol : Water = 9 : 1 (v/v), B : Methanol : Water = 7 : 3 (v/v).

3.6. 상황버섯 추출물의 성분분석

3.6.1. 상황버섯 추출물의 TLC 분석

상황버섯 추출물의 에틸아세테이트 분획에 대한 TLC 크로마토그램은 Figure 6에 나타내었다. 에틸아세테이트 분획을 역상 TLC를 이용하여 1차 분리로 6개의 띠(PL RPT-1, PL RPT-2, PL RPT-3, PL RPT-4, PL RPT-5, PL RPT-6)로 분리 후 자외선 흡수방법으로 확인한 결과 그 중 가장 진한 PL RPT (*P. linteus* Reverse Phase TLC)-1 (R_f 0.82)을 다시 2차 분리를 하여 5개의 띠(PL RPT-1a, PL RPT-1b, PL RPT-1c, PL RPT-1d, PL RPT-1e)를 확인하였다. 이 중 가장 진하게 나타난 PL RPT-1a (R_f 0.83)를 긁어 추출·여과하고 용매를 감압·건조시켜 얻은 파우더를 성분 분석에 사용하였다. 분리된 TLC 띠 성분 확인에는 HPLC에 의한 분리 및 retention time 확인, LC/ESI-MS 등에 의한 분자량 등의 분광학적 데이터를 이용하였다.

3.6.2. HPLC 및 LC/ESI-MS를 이용한 상황버섯 추출물의 hispidin 유도체 분석

상황버섯 추출물의 에틸아세테이트 분획을 Table 1의 조건으로 HPLC를 실시하였다. $\lambda = 380$ nm에서 크로마토그램은 9개의 peak으로 나타났으며(data not shown) 각각의 peak를 동정하기 위하여 Figure 6에 있는 TLC 크로마토그램에서 분리된 띠를 긁어서 추출·여과하고 용매를 감압·건조시킨 후 얻은 파우더를 에탄올로 녹여

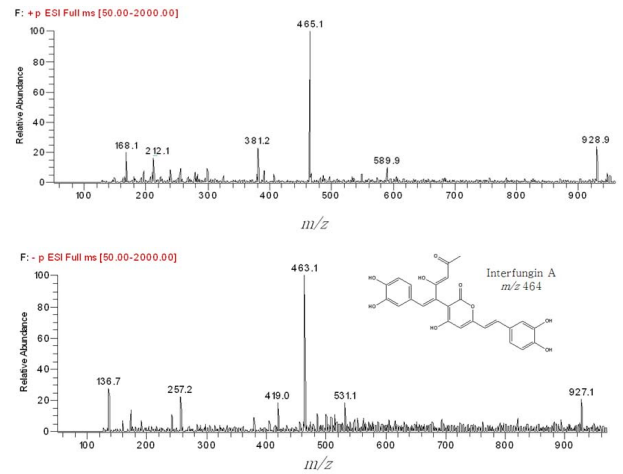


Figure 7. Mass spectra of HPLC peak 3 (PL RPT-1a) in positive mode (upper) and negative mode (lower) (LC-MS).

HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. 그 결과 상황버섯 추출물 중 에틸아세테이트 분획에 대한 Figure 6의 TLC 크로마토그램에서 PL RPT-1a는 peak 3 (25.18%)과 일치함을 확인하였다(data not shown).

상황버섯 추출물의 에틸아세테이트 분획의 주성분을 확인하기 위하여 HPLC 상에서 함량이 높은 peak 3 (25.18%)를 LC/ESI-MS를 이용하여 분자량을 확인하였다. HPLC peak 3 (PL RPT-1a)의 성분확인을 위한 LC/ESI-MS를 이용한 분석 결과 positive ion mode에서 분자이온 $[M+H]^+$ 는 m/z 465.1이, negative ion mode에서 분자이온 $[M-H]$ 는 m/z 463에서 나타났다. 이는 Yun 등이 보고한 논문에서도 확인할 수 있었다[9]. 따라서 상황버섯 추출물 에틸아세테이트 분획의 TLC 상 PL RPT-1a 띠는 hispidin 유도체인 분자량 464의 interfungin A임을 확인하였다.

4. 결 론

1) 상황버섯 추출물의 자유 라디칼 소거능력(FSC₅₀)은 50% 에탄올 추출물에서 12.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 에틸아세테이트 분획에서 2.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 아글리콘 분획에서 3.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 큰 소거활성을 나타내었으며 이는 비교물질인 (+)- α -tocopherol보다 더 큰 소거활성을 나타내었다.

2) 상황버섯 추출물의 활성산소 소거활성(OSC₅₀)은 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획 각각 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.0072 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 비교물질인 L-ascorbic acid보다 매우 큰 항산화능을 나타

내었다.

3) $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구의 광용혈 실험에서 상황버섯 추출물은 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도범위(5 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 50 % 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 모두 농도·의존적으로 세포 보호효과를 나타냈으며, 비교물질인 (+)- α -tocopherol 보다 약 1.5배 큰 세포보호활성을 나타내었다.

4) 상황버섯 추출물의 타이로시네이즈 저해활성(IC_{50})은 50 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획에서 각각 6.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 17.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 나타났으며 비교물질인 알부틴보다 약 12배 이상 타이로시네이즈 저해활성이 더 우수한 것으로 나타났다.

5) 상황버섯 추출물의 엘라스테이즈 저해활성(IC_{50})은 50 % 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획에서 각각 61.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 14.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났으며 특히 에틸아세테이트 분획은 비교물질인 oleanolic acid과 비슷한 저해활성을 나타내었다.

6) 상황버섯 추출물의 항균활성 측정결과, *E. coli*, *P. ovale*, *P. acnes*, *S. aureus*에 대한 에틸아세테이트 분획의 MIC는 각각 0.50, 0.50, 0.25, 0.06 %로 나타났으며, 특히 *S. aureus*에서는 50 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획 모두에서 매우 큰 항균활성을 나타내었다.

7) 상황버섯 추출물 중 에틸아세테이트 분획의 TLC 및 HPLC 크로마토그램에서 peak 3 (PL RPT-1a)은 LC/ESI-MS negative ion mode에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 이 m/z 463으로 나타났다. 따라서 PL RPT-1a은 hispidin 유도체인 분자량 464의 interfungin A임을 확인하였다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 상황버섯 추출물은 항산화, 주름 및 미백 기능성 원료로서 우수한 응용가능성이 있다고 판단되며 추가적으로 이런 활성을 가진 물질을 분리·정제 및 구조분석을 통한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

- G. H. Kim and H. K. Han, The effect of mushroom extracts on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 326 (1998).
- H. D. Lee, Korean medicinal mushroom pictorial book, Kyohaksa, 576.
- J. M. Sung, Y. B. Ryu, and D. R. Cha, Mushroom, Kyohak press, 593.
- Y. Wang, S. J. Wang, S. Y. MO, S. Li, Y. C. Yang, J. G. Shi, and Phelligradimer A, A highly oxygenated and unsaturated 26-membered macrocyclic metabolite with antioxidant activity from the fungus *Phellinus igniarius*, *Org. Lett.*, **7**(21), 4733 (2005).
- Y. Wang, S. Y. Mo, S. J. Wang, S. Li, Y. C. Yang, and J. G. Shi, A unique highly oxygenated pyrano[4,3-c][2]benzopyran-1,6-dione derivative with antioxidant and cytotoxic activities from the fungus *Phellinus igniarius*, *Org. Lett.*, **7**(9), 1675 (2005).
- S. Mo, S. Wang, G. Zhou, Y. Yang, Y. Li, X. Chen, and J. Shi, Phelligridins CF: cytotoxic pyrano[4,3-c][2]benzopyran-1,6-dione and furo[3,2-c]pyran-4one derivatives from the fungus *Phellinus igniarius*, *J. Nat. Prod.*, **67**(5), 823 (2004).
- I. K. Lee and B. S. Yun, Hispidin analogs from the mushroom *Inonotus xeranticus* and their free radical scavenging activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**(9), 2376 (2006).
- I. K. Lee, Y. S. Kim, Y. W. Jang, J. Y. Jung, and B. S. Yun, New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**(24), 6678 (2007).
- I. K. Lee and B. S. Yun, Highly oxygenated and unsaturated metabolites providing a diversity of hispidin class antioxidants in the medicinal mushroom *Inonotus* and *Phellinus*, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**(10), 3309 (2007).
- E. H. Hwang, J. R. Kim, T. S. Jeong, S. Lee, M. C. Rho, and S. U. Kim, *Phellinsin A* from *Phellinus* sp. PL3 exhibits antioxidant activities, *Planta Med.*, **72**(6), 572 (2006).
- B. S. Min, B. S. Yun, H. K. Lee, H. J. Jung, H. A. Jung, and J. S. Choi, Two novel furan derivatives from *Phellinus linteus* with anti-complement activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**(12), 3255 (2006).
- S. J. Kim and I. J. Kang, Evaluation of the antioxidant activity of the fruiting body of *Phellinus linteus* using the on-line HPLC-DPPH method, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **52**(5), 472 (2009).
- H. Muramatsu, K. Kogawa, M. Tanaka, K. Okumura, K. Koike, T. Kuga, and Y. Niitsu, Superoxide

- dismutase in SAS human tongue carcinoma cell line is a factor defining invasiveness and cell motility, *Cancer Res.*, **55**, 6210 (1995).
14. I. H. Park, S. K. Chung, K. B. Lee, Y. C. Yoo, S. K. Kim, G. S. Kim, and K. S. Song, An antioxidant hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*, *Arch. Pharm. Res.*, **27**(6), 615 (2004).
 15. S. N. Park, Antibacterial and antioxidative activities of *Quercus acutissima* carruth leaf extracts and isolation of active ingredients, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(2), 159 (2009).
 16. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**(3), 75 (1997).
 17. R. Kahl and H. Kappus, Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **196**(4), 329 (1993).