

노루궁뎅이버섯 물 추출물 및 유기용매 분획물의 생리활성 효과

김준호*

상지대학교 이공과대학 정밀화학신소재학과

Biological Activities of Water Extract and Solvent Fractions of an Edible Mushroom, *Hericium erinaceus*

Jun-Ho Kim*

Department of Fine Chemistry and New Materials, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

(Received 16, August 2012., Revised 30, August 2012., Accepted 8, September 2012)

ABSTRACT: This study was performed to investigate the biological activities of *Hericium erinaceus* fruiting body, including antioxidative, fibrinolytic, thrombin inhibitory and α -glucosidase inhibitory activities. The water extract of *H. erinaceus* was fractionated into hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water fractions, and each of these fractions was individually assayed. The water extract showed high antioxidative activity at 87.78%. The water fraction showed the highest extraction yield at 35.68% (w/w). In the fraction activity tests, butanol and water fractions showed strong antioxidative activities at 87.91% and 92.27%, respectively. Assays for fibrinolytic activity indicated that only the ethyl acetate fraction has significant efficacy at 2.96 plasmin units/mL. The 10-fold dilution of hexane fraction showed high thrombin inhibitory activity, and α -glucosidase inhibitory activity at 77.67% and 90.53%, respectively. In conclusion, solvent fractions of *H. erinaceus* can be used as materials for the development of biofunctional foods to prevent cardiovascular diseases.

KEYWORDS : Antioxidative activity, Fibrinolytic activity, Fruiting body, *H. erinaceus*, Thrombin inhibitory activity

서 론

버섯을 단순히 영양소를 공급해주는 급원이라든지, 맛과 향을 즐기는 기호식품의 일부로 보던 시대는 지나고, 이제는 버섯의 기능성에 더 초점이 맞추어지고 있다. 식용 가능한 버섯에서 기능성 생리활성 물질이 확인되면 양과 활성이 적을 지라도 항시 섭취 가능하여 그 효과는 크게 나타날 것으로 기대되기 때문이다. 많은 버섯들이 성인병 치료와 예방에 관련된 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 상황버섯(Choi *et al.*, 1996)과 구름버섯(Tsukagoshi and Ohashi, 1974)의 다당류가 항암물질로 알려져 있으며, 능이(Kang *et al.*, 2011)의 항고혈압성 활성과 차가버섯의 혈소판 응집 저해활성(Hyun *et al.*, 2006)이 확인되었으며, 팽이(Shin and Choi, 1998)와 할미송이버섯(Kim and Kim, 2001)으로부터 활성이 큰 혈전용해효소와 석이로부터 혈당강화 효과가 큰 물질이 확인되었다(Choi *et al.*, 2000).

한국인의 사망원인 중 가장 큰 비율을 나타내는 악성 종양의 원인 중 하나로 알려진 활성산소는 정상세포에 반

응하여 암이나 노화세포로 발전시키는 것으로 알려져 있다. 이 활성산소의 양을 줄이는 항산화물질인 비타민 C와 비타민 E가 버섯에 많이 포함되어 있으며(Hong *et al.*, 2004), 버섯의 ergothioneine(ERG)와 페놀성 화합물도 항산화물질로 대표되고 있다(Ryu *et al.*, 2009). 혈관안에서 혈소판과 섬유소로 이루어진 불용성 고분자인 혈전이 혈관을 따라 흐르며 뇌출혈, 뇌혈전증, 심부전증, 심근경색 등의 혈관계 질환을 초래 한다. 따라서 혈관계 질환은 혈전을 용해시킴으로써 치료할 수 있으며, 혈전형성의 필수효소인 트롬빈의 활성을 억제하여 혈전생성 억제로 혈관계 질환을 예방할 수 있다. 최근 새로운 혈전용해 물질과 트롬빈 저해물질을 발효식품과 버섯, 약용식물로부터 찾는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 당뇨병은 혈액내 당의 농도가 높아 발생하는 질환으로 당뇨병 그 자체보다는 합병증으로 인한 위험 때문에 혈당의 농도를 적정수준으로 유지해야만 한다. 따라서 소장에서 포도당 흡수를 억제하여 혈당량의 감소로 당뇨병의 발생을 예방하려는 목적으로 탄수화물 분해효소인 α -glucosidase의 저해제에 관한 많은 연구가 이루어고 있다.

오래전부터 약용과 식용으로 사용되고 있는 노루궁뎅이버섯(*H. erinaceus*)은 담자균강, 민주름버섯목, 산호침버

*Corresponding author <E-mail : jhokim@sangji.ac.kr>

섯과에 속하며 가을철 활엽수의 나무줄기에 자생하는 버섯으로 중국에서는 후두버섯, 원송이머리 버섯이라고 부르며, 일본에서는 Yamabushitake라고 부른다. 노루궁뎅이버섯은 탄수화물, 단백질, 아미노산, 효소, 무기염류, 비타민 등이 풍부하며, 자실체가 순백의 색을 띠며 맛이 좋은 버섯으로 다양한 식품재료로 사용되고 있으며, 항암효과와 면역증강효과(Mizuno *et al.*, 1992), 항산화효과(Ryu *et al.*, 2009), 중추신경 재생과 치매치료의 효능 등 다양한 가능성을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(Kawagishi *et al.*, 1996).

본 논문은 성인병과 관련된 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 알려진 노루궁뎅이버섯을 이용하여 성인병 예방을 위한 제약과 기능성 식품을 개발하기 위한 기초 자료를 얻기 위하여 노루궁뎅이버섯 물 추출물과 물 추출물을 유기용매로 분획하여 얻은 분획물들의 항산화효과, 혈전용해효과, 트롬빈저해효과, 혈당강하효과를 측정하고 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

노루궁뎅이버섯과 시약

본 실험에 사용한 노루궁뎅이버섯(*H. erinaceus*)은 영농조합법인 저강(경기도 여주군 가남면 신해리)에서 구입하여 동결 건조시켜 분말 상태로 냉동고에 저장 하면서 사용하였으며, 생리활성 측정에 사용한 시약류 중 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), α -glucosidase, p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, thrombin, fibrinogen 등은 Sigma사 제품이고, H-D-phenylalanine-L-pipecolyl-L-arginine-paranitroaniline dihydrochloride (Chromogenix S-2238, Orangeburg, New York, USA)는 Chromogenix 사 제품이었으며, 나머지 시약은 모두 일등급 시약을 사용하였다.

물 추출물과 유기용매 분획물

노루궁뎅이버섯 자실체 분말의 일정량에 20배의 증류수를 가하고 30°C에서 24시간 동안 진탕 추출하였다. 이 추출액을 5,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 후 상등액을 Whatman No.2로 여과하고 동결 건조한 다음 물 추출물 시료로 사용하였다. 유기용매 분획물은 위의 Whatman No.2 여과지로 여과하여 얻은 여과액을 같은 부피의 헥산(hexane), 클로로포름(CHCl_3), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol)로 3번씩 추출 후 각각의 추출물을 농축시키고, 동결 건조하여 분획물을 얻었다. 실험에 사용한 물 추출물(100 mg/ml)과 함께 준비한 분획별 시료는 50% DMSO와 증류수에 100 mg/ml로 준비하여 항산화활성과 혈전용해 활성 실험에 사용하였으며, 50% DMSO에 10 mg/ml의 농도로 준비하여 트롬빈 저해활성과 α -glucosidase 저해활성 측정에 사용하였다.

전자공여능 측정

Blois(1958) 및 Kim 등(1997)의 방법에 따라 준비한 노루궁뎅이버섯 물 추출물이나 유기용매 분획물 적정 희석액 0.4 ml를 시험관에 넣고, 1×10^{-4} M의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) ethanol 용액 5.6 ml를 가하여 6 ml이 되도록 하였다. 이 혼합액을 4분간 반응시키고 다시 여과한 다음, 총 반응시간이 10분이 되면 525 nm에서 흡광도를 측정하였다(UV-1201, Shimadzu Co., Japan). 전자공여능은 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{전자공여능} = \{1 - (\text{O.D.}_{\text{시료}} / \text{O.D.}_{\text{증류수}})\} \times 100$$

혈전용해 활성 측정

Fibrin 분해활성은 Haverkate and Traas(1974)의 방법에 따라 0.5% (w/v) fibrinogen을 함유하는 2% gelatin 용액 10 ml와 50 mM barbital buffer(pH 7.5)에 녹인 thrombin(100 NIH units) 50 μ l를 잘 섞고 petri-dish에 부어 fibrin 막을 만들었다. 준비한 노루궁뎅이버섯 물 추출물과 유기용매 분획물 20 μ l씩을 fibrin plate위에 점적하고 36°C에서 18시간 방치한 후 용해면적을 측정하였다. 대조구로는 플라스민(1.0 plasmin unit/ml)을 사용하였으며, 추출액의 혈전용해 활성은 대조구의 용해 면적에 대한 시료의 용해면적의 상대적인 비율로 환산하여 계산하였다.

트롬빈 저해활성 측정

트롬빈에 대한 저해활성은 Doljak 등(2001)의 실험 방법을 이용하였다. 즉, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin을 포함하는 HBSA 완충용액(pH 7.5) 40 μ l에 트롬빈용액(0.5 NIH units/mL) 50 μ l를 첨가하고 섞는다. 준비한 노루궁뎅이버섯 물 추출물이나 유기용매 분획물(10 mg/ml) 10 μ l를 첨가하고 실온에서 15분간 incubation 후, H-D-phenylalanine-L-pipecolyl-L-arginine-paranitroaniline dihydrochloride를 이용하여 준비한 기질 용액(0.5 mM) 50 μ l를 가하고 5분 동안 incubation시킨 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다(UV-1601PC, Shimadzu, Japan). thrombin 활성 저해율은 다음 식에 의해 산출하였으며, 사용한 흡광도는 대조구의 흡광도를 제외한 수치를 이용하였다.

$$\text{저해율}(\%) = [1 - (\text{시료 첨가구의 흡광도}) / (\text{시료 무첨가구의 흡광도})] \times 100$$

α -glucosidase 저해활성 측정

α -glucosidase에 대한 저해활성은 Watanabe 등(1997)의 실험 방법을 이용하였다. 즉, 100 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 α -glucosidase(0.7 U, sigma St, Louis, USA)와 p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside(5 mM)를 용해시

켜 각각 효소와 기질 용액을 만든 다음 효소 용액 50 μ l, 준비한 노루궁뎅이버섯 물 추출물이나 유기용매 분획물 (10 mg/ml) 10 μ l 및 완충용액 890 μ l을 넣고 섞은 다음 5 분 동안 실온에서 preincubation하고, 준비한 기질 용액 50 μ l을 가하고 다시 5분 동안 incubation시킨 후 405 nm 에서 흡광도 변화를 측정하였다(UV-1601PC, Shimadzu, Japan). α -glucosidase 활성 저해율은 다음 식에 의해 산출하였으며, 사용한 흡광도는 대조구의 흡광도를 제외한 수치를 이용하였다.

$$\text{저해율(\%)} = [1 - (\text{시료 첨가구의 흡광도}) / (\text{시료 무첨가구의 흡광도})] \times 100$$

결과 및 고찰

용매별 분획물의 수율

노루궁뎅이버섯 830 g을 동결 건조한 결과 82 g의 건조물을 얻었다. 이 건조물을 물 추출 후 여러 종류의 유기용매를 이용하여 추출한 분획물의 수율을 측정한 결과 핵산 분획물이 0.09%, 클로로포름 분획물 0.39%, 에틸아세테이트 분획물 1.05%, 부탄올 분획물 12.07%, 물 분획물 35.68%로 물 분획물의 수율이 가장 높았다(Table 1).

항산화효과

물 추출물과 유기용매 분획물의 항산화능을 측정하기 위해 전자공여능 측정 방법으로 DPPH radical 소거능을 측정하였다. 측정한 결과 물 추출물은 87.78%의 항산화 활성을 함유하고 있었으며, 핵산 분획물 13.26%, 클로로포름 분획물 18.24%, 에틸아세테이트 분획물 35.66%, 부탄올 분획물 87.91%, 물 분획물은 92.27%의 항산화활성을 나타냈다(Fig. 1). 버섯의 비타민C와 비타민E는 높은 항산화 효과를 나타내며(Hong *et al.*, 2004), 노루궁뎅이버섯에는 항산화물질인 ergothioneine(ERG)와 페놀성 화합물의 함량이 높은 것으로 알려져 있어 높은 항산화 효과가 기대되었다(Ryu *et al.*, 2009). 극성용매인 부탄올과 물 분획물의 항산화활성이 높게 나타나 노루궁뎅이버섯이 포함하고 있는 항산화물질들이 극성물질로 추정된다.

혈전용해 활성

혈전용해제로의 사용 가능성을 확인하기위해 혈전의 주 성분인 피브린을 이용한 fibrin plate 방법으로 혈전용해 활성을 측정하였다. 측정 결과, 물 추출물, 핵산 분획물, 클로로포름 분획물, 물 분획물에서는 활성을 나타내지 않

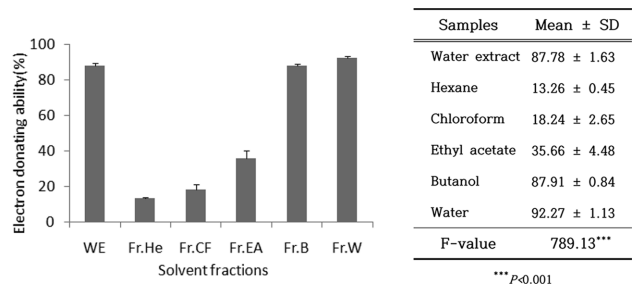


Fig. 1. Electron donating activity of solvent fractions obtained from a *H. erinaceus* water extract by DPPH assay. WE, Water extract; Fr.He, Hexane fraction; Fr.CF, Chloroform fraction; Fr.EA, Ethyl acetate fraction; Fr.B, Butanol fraction; Fr.W, H₂O fraction; We used 100 mg/ml of samples.

고 에틸아세테이트 분획물에서 2.96 plasmin unit의 큰 활성을 나타내고 부탄올 분획물에서 작은 흔적을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 준비된 유기용매 분획물에서 활성을 나타내는 이 물질은 효소 보다는 flavonoid나 페놀유도체 화합물로 예상할 수 있다(Oh and Kim, 2007). 반면 인공 재배된 노루궁뎅이버섯 자실체에서 작은 혈전분해효소의 활성이 보고되기도 하였다(Choi *et al.*, 2005).

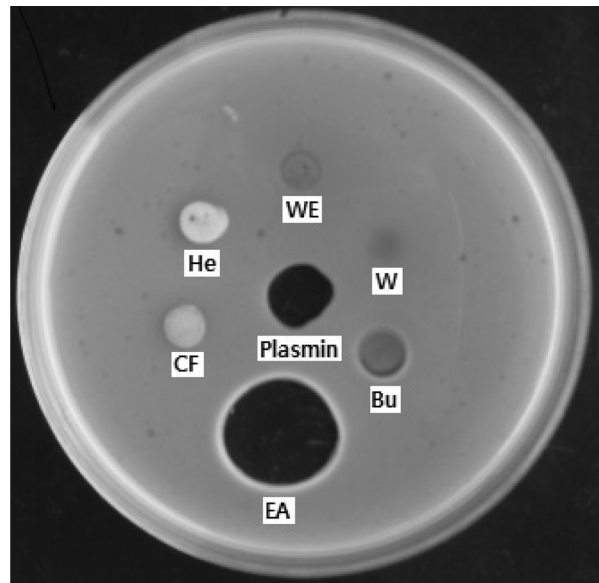


Fig. 2. Fibrinolytic activity of solvent fractions obtained from a *H. erinaceus* water extract by fibrin plate method. WE, Water extract; He, Hexane fraction; CF, Chloroform fraction; EA, Ethyl acetate fraction; Bu, Butanol fraction; W, H₂O fraction; Plasmin, 1.0 plasmin units/ml. We used 100 mg/ml of samples.

Table 1. The fraction yields of a *H. erinaceus* water extract

	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol	Water
Yield(%)	0.09	0.39	1.05	12.07	35.68

Fraction yields were described as the percent of dry substance of fractions based on the dry substance *H. erinaceus*.

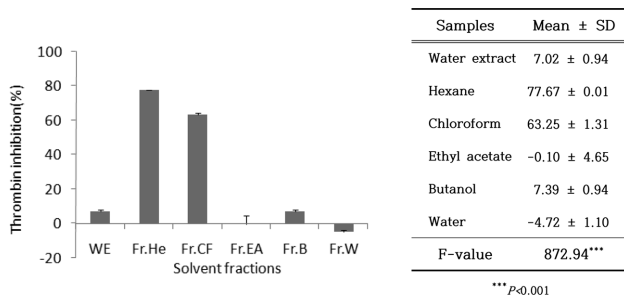


Fig. 3. Thrombin inhibitory activity of solvent fractions obtained from a *H. erinaceus* water extract. WE, Water extract; Fr.He, Hexane fraction; Fr.CF, Chloroform fraction; Fr.EA, Ethyl acetate fraction; Fr.B, Butanol fraction; Fr.W, H₂O fraction. We used 10-fold diluent (10 mg/ml) of samples because of their high thrombin inhibitory activity.

트롬빈 저해활성

혈소판과 섬유소원의 집합체에 트롬빈이 작용하여 섬유소원을 섬유소로 변화시켜 혈소판과 섬유소로 이루어진 불용성의 혈전을 형성한다. 이 혈전형성에 트롬빈은 필수 효소로 작용하기 때문에 트롬빈의 작용을 억제하면 혈전의 형성을 억제할 수 있다. 따라서 트롬빈 저해물질로 사용 가능성을 확인하기 위해 트롬빈 저해활성을 측정하였다. 측정된 결과 물 추출액이 7.02%의 매우 낮은 트롬빈 저해효과를 나타냈지만, hexan 분획물이 77.67%, 클로로포름 분획물 63.25%, 에틸아세테이트 분획물 -0.10%, 부탄올 분획물 7.39%, 물 분획물 -4.72%로 hexan 분획물이 가장 높은 저해활성을 나타냈다(Fig. 3).

α-glucosidase 저해활성

α-glucosidase 저해제는 탄수화물이 소화되는 과정을 지연시킴으로써 혈당조절을 유도한다. α-glucosidase 저해제로 사용 가능성을 확인하기 위해 혈당강하효과를 측정된 결과 물 추출물은 11.36%의 낮은 저해활성을 나타냈지만, hexan 분획물 90.53%, 클로로포름 분획물 28.02%,

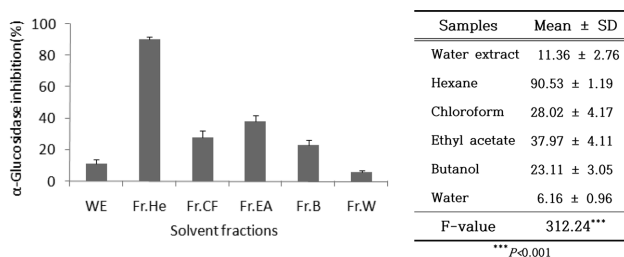


Fig. 4. α-Glucosidase inhibitory activity of solvent fractions obtained from a *H. erinaceus* water extract. WE, Water extract; Fr.He, Hexane fraction; Fr.CF, Chloroform fraction; Fr.EA, Ethyl acetate fraction; Fr.B, Butanol fraction; Fr.W, H₂O fraction. We used 10-fold diluent (10 mg/ml) of samples because of their high thrombin inhibitory activity.

에틸아세테이트 분획물 37.97%, 부탄올 분획물 23.11%, 물 분획물 6.16%로 hexan 분획물이 가장 높은 저해활성을 나타냈다(Fig. 4).

적 요

노루궁뎅이버섯을 이용하여 성인병 치료와 예방을 위한 기능성식품 개발을 위한 기초자료를 얻기 위해 노루궁뎅이버섯 물 추출물과 유기용매 분획물을 이용하여 성인병 관련 생리활성을 확인하였다. 노루궁뎅이버섯 물 추출물은 87.78%의 항산화활성을 나타냈으며, 부탄올 분획물과 물 분획물은 87.91%와 92.27%의 높은 활성을 나타냈다. 에틸 아세테이트 분획물은 2.96 plasmin unit의 높은 혈전용해 활성을 보였다. hexan 분획물로부터 77.67%와 90.53%의 높은 트롬빈 저해활성과 α-glucosidase 저해활성을 확인하였다. 실험 결과로부터 노루궁뎅이버섯 에틸아세테이트 분획물의 높은 혈전용해 활성과 hexan 분획물의 높은 트롬빈 저해활성과 α-glucosidase 저해활성은 혈관계질환 치료나 예방을 위한 기능성식품 개발에 이용 가능할 것으로 기대된다.

참고문헌

Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stale free radical. *Nature* 181:1199-1120.

Choi, H. J., Kim, N. J. and Kim, D. H. 2000. Hypoglycemic effect of GE974 isolated from *Gyrophora esculenta* in normal and diabetic mice. *Kor. J. pharmacogn.* 31(3):268-272.

Choi, H. S., Kim, M. K., Park, H. S., Kim, J. S., Shen, M. H. and Kim, S. J. 2005. Screening of fibrinolytic activities from cultured mushrooms. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37(6):1039-1041.

Choi, J. H., Ha, T. M., Kim, Y. H. and Rho, Y. D. 1996. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* 24:214-222.

Doljak, B., Stegnar, M., Urleb, U., Kreft, S., Umek, A., Cigliaric, M., Strukelj, B. and Popovic, T. 2001. Screening for selective thrombin inhibitor in mushrooms. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 12:123-128.

Haverkate, F. and Traas, D. W. 1974. Dose-response curves in the fibrin plate assay. Fibrinolytic activity of protease. *Thromb. Haemost.* 32:356-365.

Hong, K. H., Kim, B. Y. and Kim, H. K. 2004. Analysis of nutritional components in *Pleurotus ferulea*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 36(4):563-567. (in korean).

Hyun, K. W., Jeong, S. C., Lee, D. H., Park, J. S. and Lee, J. S. 2006. Isolation and characterization of a noble platelet aggregation inhibitory peptide from the medicinal mushroom, *Inonotus obliquus*. *Peptides.* 27:1173-1178.

Kang, M. G., Bolormaa, Z., Lee, J. S., Seo, G. S. and Lee, J. S. 2011. Antihypertensive activity and anti-gout activity of mushroom *Sarcodon aspratus*. *Kor. J. Mycol.* 39(1):53-56. (in Korean).

Kawagishi, H., Shimada, A., Hosokawa, S., Mori, H., Sakamoto,

- H., Ishiguro, Y., Sakemi, S., Bordner, J., Kojima, N. and Furukawa, S. 1996. Erinacines E, F and G stimulator of nerve growth factor(NGF)-synthesis from the mycelia of *Hericum erinaceus*. *Tetrahedron Letters*. 37:7399-7402.
- Kim, J. H. and Kim, Y. S. 2001. Characterization of a metallo-enzyme from a wild mushroom, *Tricholoma saponaceum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 65(2):356-362.
- Kim, Y. J., Kim, C. K. and Kwon, Y. J. 1997. Isolation of antioxidative components of *Perillae semen*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 29(1):38-43.
- Mizuno, T., Wasa, T., Ito, H., Suzuki, C. and Ukai, N. 1992. Antitumor active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericum erinaceus*: an edible and medicinal mushroom called Yamabushitake or Houtou. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:347-348.
- Oh, H. S. and Kim, J. H. 2007. Physiological functionalities of hot water extract of *Codonopsis lanceolata* and some medicinal materials, and their mixtures. *Korean J. Community Living Sci.* 18:407-415.
- Ryu, S. R., Lee, W. Y. and Ka, K. H. 2009. Comparative study on the sawdust cultivation and the antioxidant of *Hericum spp.* *Kor. J. Mycol.* 37(1):80-85. (in Korean).
- Shin, H. H. and Choi, H. S. 1998. Purification and partial characterization of a metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *J. Microbiol.* 36:20-25.
- Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann.* 65:557-558
- Watanabe, J., Kawabata, J., Kurihara, H. and Niki, R. 1997. Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61:177-178.