

상항버섯 자실체로부터 항비만성 라이페이스 저해물질의 정제

이종국¹ · 송정화² · 이종수^{2*}

¹충남농업기술원, ²배재대학교 생명유전공학과

Purification of Anti-obesity Lipase Inhibitor from the Fruiting Body of *Phellinus linteus*

Jong-Kuk Lee¹, Jung-Hwa Song² and Jong-Soo Lee^{2*}

¹Chungnam Agricultural Research & Extension Services, Yesan 340-861, Korea

²Dept. of Life Science and Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea

(Received June 9, 2010. Accepted June 12, 2010)

ABSTRACTS: For development of anti-obesity nutraceuticals from mushrooms, new anti-obesity lipase inhibitor from *Phellinus linteus* was purified by systematic solvent extraction, TLC and HPLC and characterized. Methanol extract from *P. linteus* most effectively inhibited(72.5%) porcine pancreatic lipase and ethyl acetate fraction showed the highest inhibitory activity in the systematic solvent extraction. A lipase inhibitor from the ethyl acetate fraction was purified through following steps including 3 times silica gel chromatography and preparative HPLC. The purified lipase inhibitor was a yellowish green powder and its IC₅₀ value was 175 ng. Its molecular weight by MALDI-TOF-MS was 523.06 Da and showed maximal absorption spectrum at 225.1 nm.

KEYWORDS : Anti-obesity, Lipase inhibitor, *Phellinus linteus*, Purification

체중과다와 비만은 오래 전부터 심혈관 질환, 당뇨, 암, 간 질환 등 여러 가지 만성질환과 밀접하게 연관되어 있는 것으로 알려져 왔으며, 수술이나 임신에 대한 위험을 증가시킨다고 보고 되었고(Levinson, 1997), 따라서 21세기 인류의 건강과 복지를 위협하는 가장 큰 위험 요인으로 대두되고 있다(Taubes, 2000).

비만은 에너지 섭취와 소모의 불균형에서 발생한다(Bray, 1998). 비만에 대한 약물 치료는 식이 섭취를 감소시키고 대사 작용을 변형시키며 그와 병행해서 에너지 소비를 증가시킬 수도 있다. 그러나 이러한 약물 치료에 있어서 여러 심각한 부작용들이 발생하며(Bray, 1998) 특히, amphetamine의 중독성 때문에 그 문제점들이 널리 알려지게 되었다(Bray, 1993; Bray *et al.*, 1995; Bray *et al.*, 1999). Amphetamine은 α -methyl- β -phenethylamine으로 음식의 섭취를 감소시키는 중독성 β -phenethylamine 성분이며, 중독성은 아마도 도파민 신경전달계와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 이 약물 유도체들은 미국연방 마약국에 의해 사용이 제한되었다(Bray, 1993, 1998; Bray and Greenway, 1999).

지금까지 개발된 항비만제의 종류는 많으나, 현재 FDA에 승인되어 시판되고 있는 항비만제는 sibutramine(serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor)과 orlistat(xenical) 2종이다 또한, 국외에서는 *Garcinia cambogia* 열매로부터 추출한

hydroxycitric acid를 이용하여 식품섭취를 줄이거나 뇌의 섭식중추에 작용하여 식욕을 억제하는 sibutramine등을 이용하는 방법과 대사를 조절하는 방법으로 탄수화물분해효소나 췌장 lipase를 저해하는 방법이 있는데, 췌장 lipase 저해제로서는 orlistat가 개발되어 있으며, 탄수화물분해효소 저해제인 acarbose가 비만을 효과적으로 억제하는 것 등이 보고되었다(김 등 2004; Hackman, 1997; Vedula *et al.*, 1991). 국내에서 비만억제효능을 갖는 소재 또는 물질의 탐색 및 제품개발이 최근 들어 더욱 활발하게 진행되고 있는데(김 등 2006; 김 등 2004; 홍과 권, 1998), 고추의 매운 맛 성분인 capsaicin의 대사조절 효능을 응용한 제품, 난소화성 다당체(식이섬유)를 이용한 제품, α -glucosidase 저해제를 함유한 음료 등이 출시되거나 개발되어 있다(김, 1999; 홍과 권, 1998). 또한 버섯추출물, 한약재 추출물, 산채류, flavonoids 등에 대한 탄수화물소화효소 α -glucosidase의 저해활성을 탐색한 바 있으며, 활성성분으로 luteolin 등을 확인하였다(Kim *et al.*, 2000). 또한, lipase 저해제로는 phosphatidyl choline, 콩의 단백질과 여러 곡물, tannin 같은 천연 물질 그리고 버섯 등의 미생물에서 알려지고 있다(Bitou *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2010; Shimura *et al.*, 1992). 또한 미생물 기원의 lipase 저해제로는 *Streptomyces toxytricini*에 의해 생산해 낸 xenical(olista)이 보고되었으며, 다양한 임상실험 결과 lipase 저해활성이 인정되어 비만 치료제로써 응용되고 있다(Bray and Greenway, 1999). 그러나 위와 같이 다양한 lipase 저해제가 식물이나

*Corresponding author <E-mail : biotech8@pcu.ac.kr>

미생물들로부터 생산되고 있으나 수율이 낮고 효능이 높지 않아 산업화가 미미한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 새로운 항비만 치료(예방) 효과를 갖는 건강식품이나 의약품 소재를 개발하고자 전보(Lee *et al.*, 2010)에서는 447종의 국내 버섯류의 메탄올 추출물을 제조한 후 이들의 lipase 저해 활성을 측정하여 lipase 저해 활성이 높은 상황버섯(*Phellinus linteus*)을 최종 선발하였다. 또한, 이들의 대량 추출조건을 검토하여 추출물의 특성을 조사하여 보고 하였다. 본 연구에서는 상황버섯 자실체에 함유되어있는 lipase 저해 물질을 각종 크로마토그래피로 정제한 후 성질을 조사하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용한 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 2008년 도에 부여 백마영농법인에서 배양한 자실체를 분양받아 동결 건조한 후 잘게 잘라서 분쇄기에 넣고 분쇄하여 20 mesh 표준체로 쳐서 사용하였다(Lee *et al.*, 2010).

시약 및 기기

Lipase 저해활성 측정에는 효소로 porcine pancreatic lipase (Type II, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였고, 기질로는 triolein (Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였다. TES(*N*-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid), taurocholic acid, gum arabia (Sigma-Aldrich Co.)를 완충용액 제조에 사용하였고, 발색시약으로는 bathocuproine(2-9-dimethyl-4-7-diphenyl-1, 10-phenanthroline, Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였다. Preparative HPLC와 analytical HPLC에 사용한 용매는 Burdick & Jackson(Muskegon, USA)사 제품을 사용하였고 그 외의 유기용매는 덕산 약품공업(주)의 특급 제품을 사용하였다.

Silica gel column으로는 SnapCartridge KP-SIL column (Biotage Co., USA)을 사용하였고, reverse column은 Snap Cartridge KP-C₁₈-HS column, 분취용 HPLC 컬럼으로는 역상컬럼인 Optimapak C₁₈ column(250 × 21.2 mm)을 사용하였으며, 분석용 HPLC 컬럼은 Xbidge C₁₈ column(Waters. Co)을 사용하였다. 박층 크로마토그래피(TLC)에는 Merk사(Darmstadt, Germany) 제품의 precoated silica gel plates 60 F₂₅₄(0.25 mm)와 ODS RP-18 F_{254s} (25DC-Platten 5 × 10 cm)를 사용하였다.

HPLC로는 Waters 사(U.S.A)의 분취용 액체크로마토그래프(Water Delta 600, 2987 UV detector)와 분석용 액체크로마토그래프(Alliance 2695 & 2998 PDA detector)를 사용하였고, 정제물질의 확인에는 MALDI/TOF/MS(Bruker Ultraflex III, U.S.A.)를 사용하였다.

추출물의 제조

상황버섯(*Phellinus linteus*) 자실체 건조분말 2 kg을 95% 메탄올 16 l로 24시간 동안 2회 추출한 후 여지(Whatman

No. 2)로 여과하고 감압 농축하여 추출물 72.4 g을 제조하여 정제에 사용하였다(Lee *et al.*, 2010).

Lipase 저해활성 측정

Lipase의 저해활성은 전보(Lee *et al.*, 2010)와 같이 Bitou *et al.*(1999)의 방법을 일부 변형시켜 triolein로부터 생성되는 oleic acid를 측정하여 저해활성을 산출하였다. 0.1 M NaCl 이 첨가된 0.1N TES(*N*-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid) buffer(pH 7.0) 9 ml에 triolein (120 mg), gum arabic(90 mg), taurocholic acid(10.16 mg)을 넣고 5분간 sonication하여 기질용액을 제조하였다. Lipase 활성측정을 위한 반응용액은 효소용액(pancreatic lipase, 500 U/ml) 50 μ l, 시료추출물 50 μ l(4 mg/ml), 기질용액 300 μ l를 첨가하여 최종부피가 400 μ l가 되도록 제조한 후, 37°C에서 30분간 반응시켰다. 효소반응 후 생성된 oleic acid의 함량을 Zapf *et al.*(1981)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 효소 반응 후 반응용액(incubation mixture) 0.4 ml에 2%(v/v) ethanol이 포함된 chloroform/n-hexane(1 : 1)용액 3 ml를 첨가하여 10분 동안 교반한 후 원심분리(2,000 ×g)하여 수층을 제거하였다. 여기에 copper 반응액 1.0 ml를 첨가하여 다시 10분 동안 shaking 한 후, 10분간 원심분리(2,000 ×g)하고, 추출된 유리 지방산의 copper salts가 함유되어 있는 organic phase 1.0 ml를 취하여 0.05%(W/V) 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole 이 포함된 0.1%(W/V) bathocuproine-chloroform용액 0.5 ml를 혼합하여 10분간 반응 후 480 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Inhibition activity(\%)} = (A - B)/A \times 100$$

A: enzyme activity without inhibitor

B: enzyme activity with inhibitor

Lipase 저해물질의 정제

용매 계통 추출

상황버섯의 메탄올추출물을 증류수에 현탁시킨 후 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 물로 극성에 따라 극성이 낮은 용매에서부터 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통분획 하였다.

Silica gel column chromatography와 HPLC

용매 계통추출에서 lipase 저해활성이 가장 높은 ethyl acetate 층을 감압 농축하고 이 농축물을 hexane : chloroform = 3 : 2 용매로 녹인 다음 silica gel 35 g을 넣고 다시 감압 농축하고 용매를 완전히 제거한 후 컬럼크로마토그래피에 사용하였다.

1차 silica gel column chromatography는 SnapCartridge KP-SIL column (71 × 252 mm)에 hexane : chloroform = 3 : 2 혼합 용매로 평형시킨 후 35 g의 silica gel에 흡착시킨 시료를 loading하여 (hexane : chloroform = 3 : 2)-methanol 용매계로

18 ml/min 유속으로 methanol의 농도를 0~100%까지 stepwise로 용출시켜 18 ml씩 60개의 분획을 얻었다. 각각의 분획에서 1 ml씩 취하여 질소를 불어넣어 건조 한 후 80% methanol 1 ml로 용해하여 lipase 활성을 측정하였고, 또한 활성분획을 0~100%으로 2차 silica gel column chromatography(Snap Cartridge Kp-sil 50 g, 31 × 130 mm, Biotage)로 분획하여 30개의 fractions를 얻어 각각의 활성을 조사하였다. 2차 silica gel column chromatography로 분리된 활성분획을 모아 감압농축한 후 3차 silica gel column chromatography(Snap Cartridge Kp-sil 10 g, 11 × 98.5 mm, Biotage)를 이용하여 (hexane : chloroform = 3 : 2)-methanol 용매계로 methanol의 농도를 10~100%로 gradient로 용출하여 30개의 fractions를 얻어 각각의 활성을 조사하였다(Table 1).

3차에 걸친 silica gel column chromatography로 분리한 활성분획을 모아 감압농축한 후, preparative HPLC(Optimapak C18, 250 × 21.1 mm)를 실시하였고, water-acetonitrile 용매계로 acetonitrile의 농도를 0~40%까지 gradient로 용출하며 분획하였고, 각각의 분획에 대한 lipase 저해활성 측정과 HPLC로 분석하여 확인하는 작업을 반복적으로 수행하여, 단일 물질을 얻었다. 순도확인에는 HPLC(Xbridge RP₁₈, 4 μ m, 15 × 150 mm)로 분석하였고, 이동상은 water-acetonitrile 용매계로 acetonitrile의 농도를 5~90%까지 gradient로 사용하였으며, 유속은 1 ml/min의 유속으로 분획한 후 lipase 저해활성 성분을 확인하였다(Table 2).

Lipase 저해물질의 동정

MALDI-TOF Mass spectrometer(Bruker Ultraflex III, U.S.A, Matrix: CHCA)를 이용하여 정제물질의 분자량을 측정하였다.

결과 및 고찰

Lipase 저해물질의 분리 및 정제

상항버섯(*Phellinus linteus*) 2 kg을 methanol로 추출하여 고

Table 1. Operating conditions of the silica gel column chromatography

Requester	Condition
Instrument	Waters Associates (Waters 510)
Column	1st: SnapCartridge Kp-sil 340 g (71 × 252 mm, silica) 2nd: SnapCartridge Kp-sil 50 g (31 × 130 mm, silica) 3rd: SnapCartridge Kp-sil 10 g (11 × 98.5 mm, silica)
Temp(column)	Room temp.
Eluent	(Hexane:chloroform = 3 : 2)-Methanol = 100 : 0 → 0 : 100 (1 st) 90 : 10 → 0 : 100 (2 nd , 3 rd)
Wave length	254/298 nm
Detector	UV (Waters 2987)
Flow rate	30 ml/min(1 st), 18 ml/min(2 nd), 12 ml/min(3 rd)

Table 2. Operating conditions of analytical HPLC

Requester	Condition
Instrument	Waters Associates(Waters 2695)
Column	Xbridge RP ₁₈ , 4 μ m, 15 × 150 mm)
Temp(Column)	35°C
Eluent	Waters : acetonitrile = 95 : 5 → 10 : 90
Wave length	254/298/312 nm
Detector	PDA (Waters 2998)
Flow rate	1.0 ml/min
Injection volume	20 μ l

형분 72.4 g을 얻었고, 이 속에 함유되어 있는 lipase 저해활성 물질을 분리, 정제하기 위해, 용매 계통추출을 실시한 결과, 수율은 물 층이 53.9%로 가장 높았으며, 그 다음은 ethyl acetate 층이 25.3%를 보였다(Table 3). 또한, 용매 분획 층의 lipase 저해활성은 ethyl acetate 층이 77.2%로 가장 높았고, 다음은 hexane 층으로 73.4%의 lipase 저해활성을 나타내었다(Table 3). 따라서 lipase 저해 활성이 가장 우수하고, 회수율도 비교적 높은 ethyl acetate층을 농축하여, 1차 silica gel column chromatography를 실시하였다. 즉, hexane : chloroform = 3 : 2 용매로 활성분획을 녹인 후 SnapCartridge Kp-sil 340 g silica gel column에 loading하여 30 ml/min 유속으로 (hexane : chloroform = 3 : 2)-methanol 용매를 사용하여 methanol의 농도를 5~95%까지 stepwise 용출하여 UV 254 nm에서 300 ml씩 30개 분획을 얻었다. 이들 30개의 분획에 대한 lipase 활성을 측정한 결과 3번 분획부터 15번 분획까지 13개의 분획이 높은 lipase 저해활성을 나타내었다.

이어서, lipase 저해활성이 높은 13개 분획을 모아 감압농축한 후, 2차 silica gel column chromatography를 실시하였다. (Hexane : chloroform = 3 : 2)-methanol 용매계를 사용하여 methanol의 농도를 10~100% gradient로 UV 254 nm와 312 nm에서 6개의 peak (F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, F₆)를 얻어 각각의 lipase 저해활성을 조사한 결과, F₅ 분획이 78.2%로 가장 높은 lipase 저해활성을 보였다. 따라서 가장 높은 활성을 보인 F₅ 분획을 모아 감압농축한 후 3차 silica gel column chromatography를 실시하였다. (Hexane : chloroform = 3 : 2)-methanol 용매계로

Table 3. Yield(g) and lipase inhibitory activity(%) of various extracts from systematic solvents extraction

	Hexane extract	Chloroform extract	Ethyl acetate extract	Butanol extract	Aqueous extract
Yield	1.2 ± 0.02 (1.4%)	3.3 ± 0.12 (3.9%)	21.2 ± 1.57 (25.3%)	13.1 ± 0.75 (15.5%)	45.4 ± 3.6 (53.9%)
Lipase inhibitory activity(%)	73.4 ± 6.2	20.6 ± 1.3	77.2 ± 3.3	33.7 ± 2.8	21.4 ± 1.2

methanol의 농도를 0~100%으로 gradient로 용출하여 30개의 fractions를 얻어 각각의 활성을 조사하였다. 30개의 분획 중 lipase 저해활성이 높은 분획을 모아 분취용 HPLC를 실시하였고, water-acetonitrile 용매계로 acetonitrile의 농도를 0~40%로 gradient 용출하여 30개의 분획을 얻은 후 UV 254 nm로 검출한 결과 3개의 peak(H_1 , H_2 , H_3)를 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

3개의 peak 분획을 감압 농축한 후 각 peak에 대한 lipase 저해활성을 조사한 결과, H_1 분획이 83.5%로 가장 높은 lipase 저해활성을 보였고 H_2 21.5%, H_3 63.8% 이었다. 따라서 가장 높은 활성을 보인 H_1 분획을 3차례 분취용 HPLC를 반복 실시하여, 최종적으로 IC_{50} 값이 175 ng의 저해활성을 보이는 순수 정제된 lipase저해 물질을 얻었다. 이상의 정제 결과를 요약하면 상황버섯(*Phellinus linteus*)의 메탄을 추출물(72.4 g, lipase 저해 활성: 3365 ng, IC_{50})로부터 19.2배 정제된 lipase 저해 물질을 0.25%(181 mg) 수율로 얻었다.

Lipase 저해 물질의 특성

*Phellinus linteus*으로부터 정제된 lipase 저해 물질의 순도를 HPLC로 확인한 결과 Fig. 2와 같이 RT 6.98(min)의 순수한 단일 물질임을 확인하였고 thin layer chromatography로 분석한 결과, R_f값이 0.53인 단일 물질임을 확인하였다 (data not shown).

상황버섯 자실체로부터 얻은 정제된 lipase 저해물질은 연한 연두색 분말로 물과 메탄올에 잘 녹았다. 또한, 정제된 lipase 저해물질을 MALDI-TOF-MS(Matrix:CHCA)로 분석한 결과, 분자량은 523.06 Da으로 추정되었다(Fig. 3).

상황버섯으로부터 분리, 정제한 lipase 저해물질에 대한 UV 220 nm에서 400 nm까지 흡수 파장을 측정하여 UV 최대 흡수 파장을 조사한 결과, 225.1 nm에서 최대 흡수 파장을 보였고, 254.7 nm와 358.1 nm에서도 높은 파장 값을 가지는 spectrum을 나타내었다.

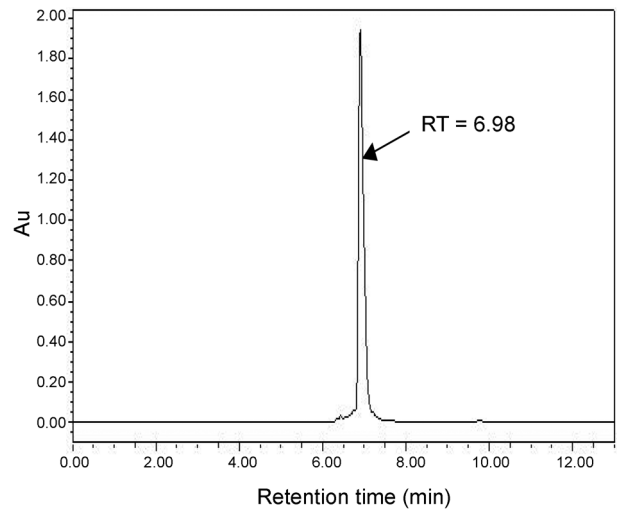


Fig. 2. Analytical HPLC chromatogram of the purified lipase inhibitor from the prep-HPLC.

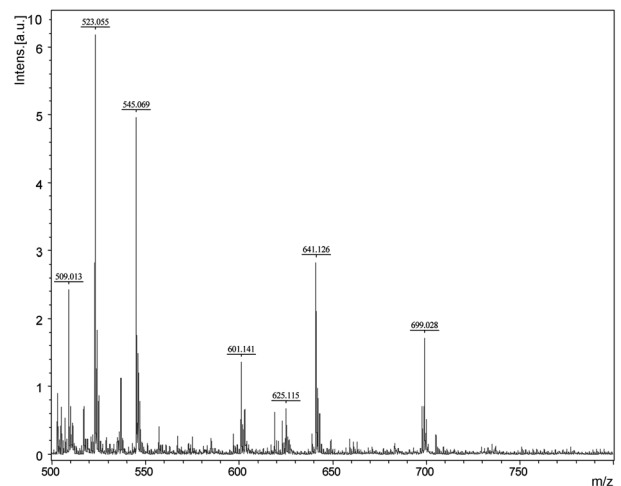


Fig. 3. MALDI-TOF-MS of the lipase inhibitor from *Phellinus linteus*.

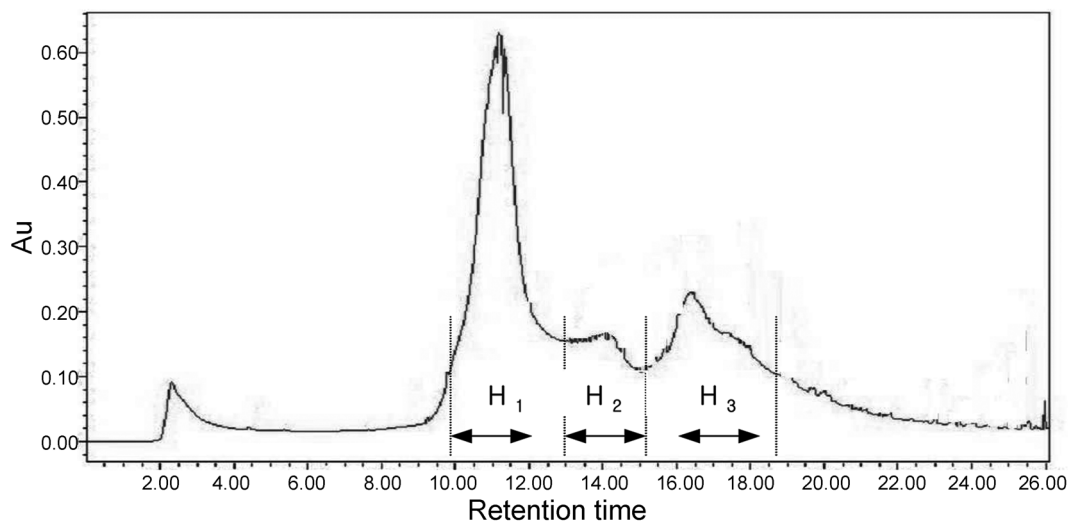


Fig. 1. Preparative HPLC profile of active fractions(F_3) from C_{18} column chromatography.

적요

본 연구에서는 버섯으로부터 새로운 항비만 치료(예방) 효과를 갖는 물질을 추출, 정제하여 그 특성을 규명하고, 이를 기능성식품 개발의 소재로 응용하고자 lipase 저해 활성이 높은 상황버섯(*Phellinus linteus*)의 lipase 저해 물질을 각종 chromatography로 정제 하였다. 먼저 상황버섯(*Phellinus linteus*) 자실체 추출물에 대한 용매 계통분획을 실시하여 저해 활성이 가장 높은 에틸아세테이트 추출물을 얻었고 이를 3차례의 silicas gel column chromatography와 분취용 HPLC를 실시하여 IC₅₀값이 175 ng의 lipase 저해활성을 가진 연한 연두색 분말의 정제된 lipase 저해 물질을 얻었다. 정제한 lipase 저해물질을 일련의 NMR spectrometry를 실시한 결과 분자량이 523.06 Da으로 추정되었고 225.1 nm에서 최대 흡수 파장을 가진 물질이었다.

참고문헌

- 김영진, 김보혜, 이선이, 김민수, 박찬선, 이문수, 이강현, 김동섭. 2006. 항비만 기능성 식품소재 개발을 위한 생약 추출물의 탐색. 한국응용생화학회지 49:221-226.
- 김정상, 임진규, 이정순, 김성희, 임현애, 김정현. 2004. 탄수화물과 지방 소화 억제 소재를 이용한 체중조절용 식품의 개발. 농림부 농림기술과제 보고서.
- 김현복. 1999. 빵잎 아이스크림의 관능적 특성 및 혈당 상승억제효과. 한국잡사학회지 41:140-146.
- Hackman, R. M. 1997. 체중조절용식품의 기능성소재건강보조 식품 심포지움. 한국식품과학회 16:21-39.
- 홍석산, 권석형. 1998. 동아의 생리활성. 식품기술 11:7-10.
- Bitou, N., Nimomiya, M., Tsjita, T. and Okuda, H. 1999. Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids* 34:441-445.
- Bray, G. A. 1993. Use and abuse of appetitie suppressant drugs in the treatment of obesity. *Annals of Internal Medicine* 119:707-713.
- Bray, G. A. 1998. Drug treatment of obesity. *American J. of Clinical Nutrition* 67:1-2.
- Bray, G. A., Atkinson, R. L. and Inous, S. 1995. Pharmacologic treatment of obesity. *Obesity Research* 3:415S-632S.
- Bray, G. A., Blackburn, G. L., Ferguson, J. M., Greenway F. L., Jain, A. K., Mendel, C. M., Mendels, J., Ryan, D., Schwartz S. L., Scheinbaum, M. L. and Seation, T. B. 1999. Sibutramine produces dose-related weight loss. *Obesity Research* 7:189-198.
- Bray, G. A. and Greenway, F. L. 1999. Current and potential drugs for treatment of obesity. *Endocrine Reviews* 20:805-875.
- Kim, J. S., Kwon, C. S. and Son, K. H. 2000. Inhibition of α -glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:2458-2461.
- Levinson, M. L. 1977. Obesity and health. *Prev. Med.* 6:172-80.
- Lee, J. K., Jang, J. H., Lee, J. T. and Lee, J. S. 2010. Extraction and characteristics of anti-obesity lipase inhibitor from *Phellinus linteus*. *Mycobiol.* 38:52-57.
- Shimura, S. W., Tsuzuki, W. S., Kobayashi, S. and Suzuki, T. 1992. Inhibitor effect on lipase activity of extracts from medicinal herbs. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:1478-1479.
- Taubes, G. 2000. Weight increases worldwide. *Science* 280:1368.
- Vedula U., Schnitzer, P. R. and Tulp, O. L. 1991. The effect of acarbose on the food intake, weight gain, and adiposity of LA/N-cp rats. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 100:477-482.
- Zapf, J., Schoenle, E., Waldvogel, M., Sand, M. and Froesch, E. R. 1981. Effect of trypsin treatment of rat adipocyte on biological effects and binding of insulin and insulin-like growth factors. *Eur. J. Biochem.* 133:605-609.