

몇 가지 주요 식용버섯의 생리기능성 물질 탐색과 파골세포 분화 저해물질의 생산

장인택¹ · 김영헌¹ · 김정한² · 이윤혜² · 주영철² · 이종수^{1*}

¹배재대학교 바이오 · 의생명공학과, ²경기도 농업기술원 버섯연구소

Screening of Bioactive Compounds from Edible Mushroom and Production of Anti-osteoporosis Osteoclast Differentiation Inhibitor

In-Taek Jang¹, Young-Hun Kim¹, Jeong-Han Kim², Yun-Hae Lee², Young-Cheoul Ju²
and Jong-Soo Lee^{1*}

¹Department of Biomedical Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea

²Mushroom Research Station, Gyeonggi-do Agricultural Research and Extension Services, Kwangju 464-873, Korea

(Received May 1, 2012. Accepted June 1, 2012)

ABSTRACT: For development of new bioactive compounds from main edible mushrooms, we determined some physiological functionalities of water extracts from mushrooms. Among water extracts from some mushroom fruiting bodies, water extracts from *Pleurotus ostreatus* showed 73.2% of anti-hypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and 73.3% of anti-gout xanthine oxidase inhibitory activity, respectively. Fibrinolytic activity was also showed 21.5 mm of clear zone in water extract of *Lyophyllum cinerascens*. However, the other physiological functionalities were very weak except 40.3% of antioxidant activity in *Lentinus lepideus*. Furthermore, the water extracts of *Pleurotus eryngii* and *Lyophyllum cinerascens* showed high anti-osteoporosis osteoclast differentiation inhibitory activity. However, the water extract from *Lentinus lepideus* and *Pleurotus ostreatus* were not detected any osteoclast differentiation inhibitory activity.

KEYWORDS : Bioactive compounds, Mushrooms, Osteoclast differentiation inhibitor

서 론

지금까지 버섯은 몇 가지 약용버섯을 제외하고는 대부분이 식용으로 이용되고 있다. 그러나 최근 국민들의 건강에 관심이 크게 증가하고 평균 수명이 길어짐에 따라 일반 식용버섯들로부터 새로운 건강 기능성 소재를 개발하려는 연구가 점점 활발해 지고 있다.

필자등은 왕송이버섯(Lee *et al.*, 2004), 비늘버섯(Koo *et al.*, 2006), 노랑느타리버섯(Jang *et al.*, 2011), 백색 느티만가닥버섯(Zanabaatar *et al.*, 2011) 등으로부터 올리고 펩타이드 계통의 항고혈압활성 물질을 추출, 정제하여 특성을 보고 하였고 차가버섯에서 혈소판 응집 억제물질(Hyun *et al.*, 2006), 상황버섯에서 항비만성 lipase 저해물질(Lee *et al.*, 2010), 신령버섯 등에서 항통풍성 물질(Zanabaatar *et al.*, 2010), 능이버섯에서 항고혈압 활성과 항통풍활성물질(Kang *et al.*, 2011), 비늘버섯으로부터 항고지혈성 HMG-CoA reductase 저해물질(Yu *et al.*, 2007), 표고버섯의 항치매성 β -secretase 저해물질(Seo *et al.*,

2008), 석이버섯의 항치매성 acetylcholinesterase 저해물질(Lee *et al.*, 2009)등을 보고 한바 있다.

한편, 최근 고령화시대가 시작됨에 따라 파골세포 분화에 의한 골다공증 환자가 크게 증가하고 있다(Boyle *et al.*, 2003). 조골세포와 파골세포의 균형은 골 밀도와 관련이 커서 조골세포 활성이 증가하면 뼈 섬유주의 부식과 뼈를 가늘게 유도여 뼈를 약하게 한다. 파골세포는 뼈의 재흡수활성을 통해 골다공증, 류마티스 관절염, 그리고 치주의 뼈 침식 같은 질병과 뼈 재생에 중요한 영향을 미치게 한다(Boyle *et al.*, 2003).

지금까지 연구, 개발된 항골다공증 관련 천연물질들은 *Coptidis rhizoma*로부터 berberine과 *Silybum marianum*로부터 Silibinin등 이 보고 되어 있으나(Han *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Miyamoto *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2007; Teitelbaum, 2000) 파골세포 분화억제에 대한 버섯추출물의 효과는 아직까지 거의 보고되지 않았다.

따라서, 본 연구에서는 식용버섯으로부터 새로운 약리 기능성 소재를 개발하기 위해 몇 종의 주요 식용 버섯 자실체의 물 추출물 들을 제조한 후 파골세포 분화 저해활

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

성등 이들의 몇 가지 생리기능성들을 측정하였다.

재료 및 방법

시료버섯 및 추출물 제조

버섯은 경기도 농업기술원 버섯연구소에서 제공 받았고, 모든 세포 배양매체들은 Hyclone(USA)로부터 구입하였다.

건조 버섯의 자실체를 증류수에 1:4로 첨가하여 30°C에서 24시간 교반한 후, 물 추출물을 원심분리기로 5,000 rpm으로 30분간 원심분리하고 다시, 0.45 µm필터로 여과한 후 즉시 분말상태로 동결건조 하여 물 추출물을 제조하였다.

생리기능성 측정

항고혈압성 안지오텐신 전환효소(ACE) 저해활성과 혈전 용해활성은 다음과 같이 측정하였다(Lee *et al.*, 2004). 100 mM sodium borate buffer (pH 8.3)에 300 mM NaCl과 ACE 3 unit을 버섯 물 추출물을 혼합하여 37°C 에서 10분간 preincubation시켰다. 5 mM Hip-His-Leu 50 µL를 첨가하여 30분 반응 후 1.0 N HCl로 반응을 정지시켰다. 다시, 생성된 hippuric acid는 ethyl acetate 1 mL로 추출 하였고 추출물 0.8 mL을 Speed Vac Concentrator (EYELA, Tokyo, Japan)로 건조한 후 잔여 물을 sodium borate buffer 1 mL로 용해시키고 228 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 hippuric acid양을 정량하여 저해율을 계산하였다.

혈전용해활성은 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 제조한 0.5% (w/v) human plasminogen-free fibrinogen 용액 10 mL을 petri dish(100 × 15 mm)에 넣고 bovine thrombin (20 unit)을 섞어 상온에서 30분 동안 배양하였다. 다시 5 mm paper disc를 위에서 제조한 fibrin plate에 올려놓고 시료 10 µL를 점적하여 37°C에서 12시간 배양한 후 형성되는 투멍환의 크기를 측정하여 혈전용해활성으로 하였다(Jang *et al.*, 2011).

Xanthine oxidase 저해활성 측정은 먼저 Xanthine oxidase (0.2 U/mL) 100 µL를 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)와 시료 (10 mg/mL) 100 µL, 1 mM xanthine 200 µL혼합액에 첨가한 후 37°C에서 5분간 반응시키고 1 N HCl 200 µL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 다시 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 단백질을 제거시키고 292 nm에서 흡광도를 측정하여 uric acid양을 정량한 후 저해활성을 계산하였다(Kang *et al.*, 2011).

항산화 활성은 DPPH에 대한 환원력(전자공여능)을 이용하는 방법으로 먼저 시료 0.2 mL에 DPPH 용액(DPPH 12.5 mg을 EtOH 100 mL에 용해) 0.8 mL를 가한 후 10분간 반응시키고 525 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 무첨가 대조구의 값과 비교하여 활성을 계산하였다(Zanabaatar

et al., 2011). SOD-유사활성은 시료 20 mL에 55 mM Tris-cacodylic acid 완충용액(TCB, pH 8.2)를 가하여 균질화하고 원심분리하여 얻은 상등액을 pH 8.2로 조정한 후 TCB를 사용하여 50 mL로 조정하여 시료액으로 사용하였다. 시료액 950 µL에 50 µL 2 mM pyrogallol을 첨가하여 420 nm에서 초기 2분간의 흡광도 증가율을 측정하여 시료액 무첨가 대조구와 비교하여 활성을 계산하였다(Zanabaatar *et al.*, 2011).

Tyrosinase 저해활성은 시료 500 µL에 5 mM L-DOPA 0.2 mL, 0.1 M sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)를 혼합한 후 tyrosinase 11 U를 첨가하여 35°C에서 2분간 반응시킨 다음 475 nm에서 흡광도를 측정하여 시료액 무첨가 대조구의 값과 비교하여 활성을 계산하였다(Zanabaatar *et al.*, 2011). α-Glucosidase에 대한 저해활성측정은 Watanabe 등(1997)의 실험 방법을 이용하였다. 100 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 α-Glucosidase (0.7 U, Sigma)와 p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (5 mM)를 용해시켜 각각 효소와 기질 용액을 만든 다음 효소 용액 50 µL, 시료용액 10 µL 및 완충용액 890 µL을 넣고 섞은 다음 5분 동안 실온에서 preincubation하고, 기질용액 50 µL를 가하고 다시 5분 동안 incubation시킨 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 α-Glucosidase 활성 저해율을 계산하였다(Kim, 2011).

파골세포분화 저해활성 측정

파골세포분화 저해활성은 골수세포를 이용하여 다음과 같이 측정 하였다(Li *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007). 먼저 6-8주된 ICR 마우스의 경골과 대퇴골에서 추출한 골수세포는 α-MEM를 3일 동안 10% FBS의 M-CSF(60 ng/mL)에서 배양했다. 유도세포를 제거하고, 부착세포(골수-유도 대식세포[BMMs])는 파골세포 전구물질로 사용했다. 파골세포를 생성하기위해 BMMs를 버섯 물 추출물들을 다양한 농도로 첨가한 M-CSF(60 ng/mL)와 RANKL (100 ng/mL)에서 3일동안 배양하였다. 이들 세포들을 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)에 고정시켜 염색시킨 후 ELISA 리더로 450 nm 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 3반복으로 실행하였고, 모든 결과들은 평균 ±표준 편차 값으로 표현하였다.

결과 및 고찰

주요 버섯 추출물들의 생리기능성

시료버섯들의 자실체 물 추출물들의 심혈관질환 예방 등 몇 가지 생리기능성을 조사하였다(Table 1). 느타리버섯의 물 추출물은 항고혈압성 안지오텐신전환효소(ACE) 저해활성이 73.2%를 보여 제일 높았고 만가닥버섯도 비교적 높은 65.3%를 보였으며 여타의 식용버섯들도 60% 이상의 ACE 저해활성을 보였다.

Table 1. Physiological functionality of water extracts from some mushrooms

Mushroom	ACE inhibitory activity(%)	Fibrinolytic activity (clear zone: mm)	XOD inhibitory activity(%)	Antioxidant activity(%)	SOD-like activity(%)	α -Glucosidase inhibitory activity(%)	Tyrosinase inhibitory activity(%)
<i>Lentinus lepideus</i>	61.4($\pm$ 0.8) ^a	n.d	13.6($\pm$ 1.0)	40.3($\pm$ 0.8)	n.d	n.d	18.1($\pm$ 0.2)
<i>Pleurotus eryngii</i>	62.5($\pm$ 0.6)	n.d	33.4($\pm$ 0.2)	11.4($\pm$ 0.1)	n.d	n.d	16.7($\pm$ 0.2)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	73.2($\pm$ 0.3)	14.0	73.3($\pm$ 0.7)	17.0($\pm$ 0.2)	1.0($\pm$ 0.3)	n.d	23.5($\pm$ 0.1)
<i>Lyophyllum cinerascens</i>	65.3($\pm$ 0.5)	21.5	10.3($\pm$ 0.4)	9.5($\pm$ 0.2)	n.d	n.d	13.0($\pm$ 0.1)

ACE : angiotensin I-converting enzyme, XOD: xanthine oxidase

^aWater extract was prepared by freeze-drying after shaking at 30°C for 24 h.

항통풍성 잔틴 산화효소(XOD) 저해활성도 느타리버섯의 물 추출물에서 비교적 높은 73.3%보였고 큰느타리버섯이 33.4%을 보였으나 여타의 버섯들은 10%미만을 보였다. 혈전용해활성은 만가닥버섯과 느타리버섯의 물 추출물들에서 각각 21.5 mm투명환과 14.0 mm투명환을 보여 비교적 우수하였다. 항산화 활성은 잣버섯의 물추출이 40.3%을 보였으나 여타의 버섯들은 10%미만의 낮은 활성이었고 SOD 유사활성은 없었다. 미백에 관련된 tyrosinase 저해활성은 13.0~23.5%로 미약 하였고 α -Glucosidase 저해활성 역시 시료 버섯 추출물에서 없었다.

본 연구의 느타리버섯과 만가닥버섯들의 ACE 저해활성과 혈전용해활성은 지금까지 보고된 노랑느타리버섯, 비늘버섯, 왕송이버섯, 백색 느티만가닥버섯들의 항고혈압활성과 혈전용해활성과 비슷하거나 다소 높았다(Jang *et al.*, 2011; Koo *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2004; Zannabaatar *et al.*, 2011). 그러나 지금까지 버섯 자실체중의 항통풍성 XOD 저해물질 탐색 연구는 매우 미흡하여 신령버섯(Zannabaatar *et al.*, 2010)과 능이버섯(Kang *et al.*, 2011) 추출물들의 XOD 저해물질 탐색 연구만이 보고되어 있을 뿐이고, 본 연구의 느타리버섯의 XOD 저해활성(73.3%)은 이들중 신령버섯(72.9%)(Zannabaatar *et al.*, 2010)과는 비슷하였으나 능이버섯(59.6%)(Kang *et al.*, 2011)보

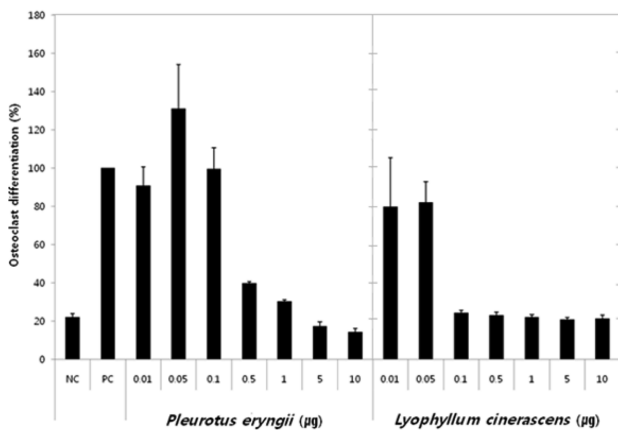
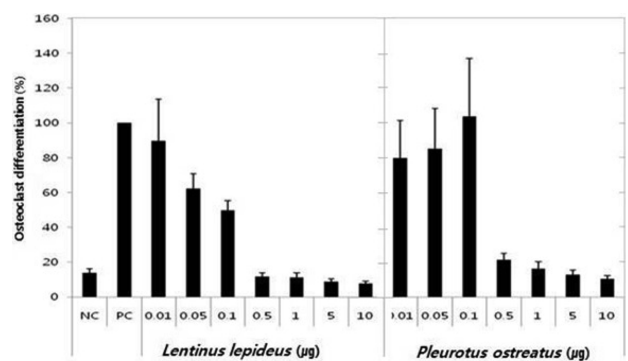
다는 높았다. 따라서 본 연구의 느타리버섯중의 항통풍성 XOD 저해물질은 통증예방 의약소재나 건강식품의 부원료로 매우 산업적 가치가 있을것으로 사료되어 현재 느타리버섯으로부터 XOD 저해물질의 대량추출과 정제를 통한 물질 특성 규명 연구를 진행하고 있다.

버섯추출물들의 파골세포 분화저해 활성

몇 종의 식용 버섯 자실체들의 물 추출물들의 파골세포 분화 저해활성을 조사한 결과 Fig. 1, 2와같이 큰느타리버섯과 만가닥버섯들의 물 추출물들이 비교적 높은 저해활성을 보였다. 그러나 잣버섯과 느타리버섯의 물 추출물에서는 파골세포 분화 저해활성이 없었다.

이러한 큰느타리버섯과 만가닥버섯의 물 추출물들의 파골세포 분화 저해활성은 기발표된 영지버섯의 메탄올 추출물(Miyamoto *et al.*, 2009)과 새송이버섯(Kim *et al.*, 2006)의 물 추출물과 매우 비슷한 결과 이었으며 이들 큰느타리버섯과 만가닥버섯들은 앞으로 골다공증을 예방(치료) 하기위한 건강기능성소재로 매우 유용 할것이고 따라서 이들의 파골세포 분화 저해물질의 특성규명에 대한 추가의 연구가 필요하다고 사료된다.

한편 큰느타리버섯과 만가닥버섯의 파골세포 분화 저해물질의 추출 최적온도는 각각 30°C와 50°C이었고 30°C에서 48시간 추출 하였을 때 모두 가장 높은 파골세포 분화 저해활성을 보였다(data not shown).

**Fig 1.** Effect of water extracts from *Pleurotus eryngii* and *Lyophyllum cinerascens* on RANKL-induced osteoclast differentiation. NC: addition of MCS-F, PC: addition of MCS-F and RANKL.**Fig 2.** Effect of water extracts from *Lentinus lepideus* and *Pleurotus ostreatus* on RANKL-induced osteoclast differentiation. NC : addition of MCS-F, PC: addition of MCS-F and RANKL

적 요

버섯으로부터 새로운 생리기능성 물질을 개발을 위해 몇가지 식용 버섯들의 물 추출물들을 제조한 후 이들 추출물들의 파골세포 분화 저해활성등의 생리기능성을 측정하였다. 시료 버섯자실체들의 물 추출물 중, 느타리버섯의 물 추출물은 73.2%, 만가닥버섯은 65.3%의 비교적 높은 항고혈압성 안지오텐신 전환효소 저해활성을 보였고 느타리버섯의 물 추출물은 73.3%의 높은 항통풍성 잔틴 산화효소 저해활성을 나타내었다. 또한 만가닥버섯의 물 추출물이 21.5 mm투명환의 높은 혈전용해 활성을 보였고 잣버섯 물 추출물 역시 40.3%의 항산화 활성을 보였으나 여타의 생리기능성은 매우 미약 하였다. 또한 큰느타리버섯과 만가닥버섯의 물 추출물들은 파골세포 분화 저해활성이 높았으나, 잣버섯과 느타리버섯의 물 추출물에서는 파골세포 분화 저해활성이 없었다.

참고문헌

- Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337-342.
- Han, K. Y., Yang, D., Chang, E. J., Lee, Y., Huang, H., Sung, S. H., Lee, Z. H., Kim, Y. C. and Kim, H. H. 2007. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by sauchinone. *Biochem. Pharmacol.* 74:911-923.
- Hyun, K. W., Jeong, S. C., Lee, D. H., Park, J. S. and Lee, J. S. 2006. Isolation and characterization of a novel platelet aggregation inhibitory peptide from the medicinal mushroom, *Inonotus obliquus*. *Peptides*. 27:1173-1178.
- Jang, I. T., Kim, Y. H., Yi, S. H., Lim, S. I. and Lee, J. S. 2011. Screening of a new fibrinolytic substances-producing yeast. *Kor. J. Mycol.* 39:227-228.
- Jang, J. H., Jeong, S. C., Kim, J. H., Lee, Y. H., Ju, Y. C. and Lee, J. S. 2011. Characterisation of a new antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Pleurotus cornucopiae*. *Food Chem.* 127:412-418.
- Kang, M. G., Zanabaatar, B., Lee, J. S., Seo, G. S. and Lee, J. S. 2011. Antihypertensive activity and anti-gout activity of mushroom *Sarcodon aspratus*. *Kor. J. Mycol.* 39:53-56.
- Kim, J. H., Kim, K., Jin, H. M., Song, I. Youn, B. U., Lee, J. and Kim, N. 2009. Silibinin inhibits osteoclast differentiation mediated by TNF family members. *Mol. Cells*. 28:201-207.
- Kim, J. H. 2011. Physiological activities of hot water extract and solvent fractions of *Pleurotus ferulea*. *Kor. J. Mycol.* 39:189-193.
- Kim, S. W., Kim, H. G., Lee, B. E., Hwang, H. H., Baek, D. H. and Ko, S. Y. 2006. Effects of mushroom, *Pleurotus eryngii*, extracts on bone metabolism. *Clin. Nutr.* 25:166-170.
- Koo, K. C., Lee, D. H., Kim, J. H., Yu, H. E., Park, J. S. and Lee, J. S. 2006. Production and characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Pholiota adiposa*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:757-763.
- Lee, D. H., Kim, J. H., Park, J. S., Choi, Y. J. and Lee, J. S. 2004. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom, *Tricholoma giganteum*. *Peptides*. 25:621-627.
- Lee, J. K., Song, J. H. and Lee, J. S. 2010. Optimal extraction conditions of anti-obesity lipase inhibitor from *Phellinus linteus* and nutritional characteristics of the extracts. *Kor. J. Mycobiol.* 38:58-61.
- Lee, J. S., Min, G. H. and Lee, J. S. 2009. Nutritional and physicochemical characteristics of the anti-dementia acetylcholinesterase-inhibiting methanol extracts from *Umbilicaria esculenta*. *Kor. J. Mycobiol.* 37:203-206.
- Li, Y. J., Kim, T. H., Kwak, H. B., Lee, Z. H., Lee, S. Y., and Jhon, G. J. 2007. Chloroform extract of deer antler inhibits osteoclast differentiation and bone resorption. *J. Ethnopharmacol.* 113:191-198.
- Miyamoto, I., Liu, J., Shimizu, K., Sato, M., Kukita, A., Kukita, T., and Kondo, R. 2009. Regulation of osteoclastogenesis by ganoderic acid DM isolated from *Ganoderma lucidum*. *Eur. J. Pharmacol.* 602:1-7.
- Park, C. K., Kim, H. J., Kwak, H. B., Lee, T. H., Bang, M. H., Kim, C. M., Lee, Y., Chung, D. K., Baek, N. I., Lee, Z. H., and Kim, H. H. 2007. Inhibitory effects of *Stewartia koreana* on osteoclast differentiation and bone resorption. *Int. Immunopharmacol.* 7:1507-1516.
- Seo, D. S., Lee, E. N., Seo, G. S. and Lee, J. S. 2008. Screening and optimal extraction of a new antidementia β -secretase inhibitor-containing mushroom. *Kor. J. Mycobiol.* 36:195-197.
- Teitelbaum, S. L. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 289:1504-1508.
- Watanabe, J., Kawabata, J., Kurihara, H., Niki, R. 1997. Isolation and identification of L-glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*) *Biosci Biotechnol Biochem* 61:177-178.
- Yu, H. E., Lee, D. H., Seo, G. S., Cho, S. M. and Lee, J. S. 2007. Characterization of a novel β -hydroxy- β -methyl glutaryl coenzyme A reductase-inhibitor from the mushroom, *Pholiota adiposa*. *Biotechnol. Biopro. Engin.* 12:618-624.
- Zanabaatar, B., Kim, M. K., Seo, G. S., Lee, Y. W. and Lee, J. S. 2011. Screening and physiological functionality of *Hypsizygus marmoreus*(white cultivar) fruiting body. *Kor. J. Mycol.* 39:185-188.
- Zanabaatar, B., Song, J. H., Seo, G. S., Noh, H. J., Yoo, Y. B. and Lee, J. S. 2010. Screening of anti-gout xanthine oxidase inhibitor from mushrooms. *Kor. J. Mycol.* 38:85-87.