J. Fd Hyg. Safety 12(3), 195 - 199(1997)

한국산 식용버섯류의 Tyrosinase 활성 저해 검색 및 그 유효성분 분리

박영현† · 장성근

순천향대학교 자연과학대학 식품영양학과, 화학과

Screening of Inhibitory Effect of Edible Mushrooms on Tyrosinase and Isolation of Active Component

Young-Hyun Park† and Sung-Keun Chang

Department of Food Science and Nutrition, Department of Chemistry
College of Natural Science, Soonchunhyang University, Asan-si 330-090, Korea

ABSTRACT — For the purpose of isolation and screening of tyrosinase inhibitory activity from edible mushrooms, *Pleurotus ostreatus, Auricularia auricula-judae, Umbilicaria esculenta, Agaricus bisporus, Flammuline velutipes, Lentinus edodes, Ganoderma lucidum*, and *Coriolus versicolor* were examined by tracing inhibitory activities against tyrosinase, utilizing L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) as a substrate. Among the eight edible mushrooms tested, *Umbilicaria esculenta* showed potent enzyme inhibitory activities above 78.4% against tyrosinase in ethylacetate (EtOAc) extracts. *Ganoderma lucidum* and *Agaricus bisporus* showed inhibitory activities of 67.3% and 51.5% in water extracts. EtOAc extracts of *Umbilicaria esculenta* was fractionated from silicagel column chromatography and one fraction showed the most inhibitory activity of 60.9%. The three bands (Rf=0.38, 0.27, 0.19) were isolated from preparative TLC of the fraction for purification and identified as mixtures of orsellinate, methyl orsellinate, methyl lecanorate, and methyl gyrophorate by high pressure liquid chromatography (HPLC), ultravisible spectrophotometer (UV), mass spectrophotometer (Mass), nuclear magnetic resonance spectrometer (NMR).

Key words □ tyrosinase, mushrooms, *Umbilicaria esculenta*, methyl orsellinate, methyl lecanorate

버섯은 지구상에 수천종이 있지만 우리나라에서 식용이 가능한 것으로 328종이 알려져 있다.[1] 버섯은 특유한 풍미와 향기 뿐만 아니라 단백질, 다당류, 무기질, 비타민 등 저칼로리의 영양식품으로서 가치가 높고, 최근에는 생체방어, 항상성의 유지, 질병회복능 뿐만 아니라 암, 뇌졸증, 심장병 등의 성인병에 대한 예방과 개선효과가 있는 것으로 알려져 기능성 식품소재로서의 응용이 기대되고 있다.[2,3] 이와 같이 버섯에 대한 관심이 증가되면서 버섯의 성분이나 생리활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들면, 영지버섯은 항종양활성, 면역증강, 항염증작용, 혈당강하작용, 항혈전작용, 간보호작용 등을 나타내는 생리활성물질이 있는 것으로 알려지고 있다.[4-7]

Tyrosinase는 Cu와 결합한 효소로 동 · 식물, 미생물 및 사람 등에 넓게 분포되어 있고, monohydroxy- 또는 dihydroxy-phenylalanine(DOPA)의 phenol 화합물에 호기적 산화를 촉진시키고 자외선이 심하게 노출된 피부에 melanin 색소가 침착되어 피부노화나 피부손상을 초래하게 되고, 야채 또는 과실류에도 tyrosinase 등과 같은 polyphenol oxidase에 의해서 갈변화 현상이 일어난다고 한다.[8-18]

본 연구는 피부 노화 및 갈변화에 관련된 tyrosinase 활성을 저해하는 유효성분을 찾고자 최근 기능성 식품소재로 기대되는 한국산 식용버섯 8종을 용매추출 및 칼럼분획하여 tyrosinase 효소활성 저해 검색하고 그 유효성분을 분리하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 식용버섯은 국내산으로 느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus*), 목이버섯(*Auricularia auricula-judae*),

† Author to whom correspondence should be addressed.

석이버섯(*Umbilicaria esculenta*), 양송이버섯(*Agaricus bisporus*), 팽이버섯(*Flammuline velutipes*) 그리고 표고버섯(*Lentinus edodes*) 등을 경동시장에서, 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)과 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 등은 한국식품위생연구원에서 각각 구하여 음건한 후에 사용하였다.

버섯의 용매추출

각 버섯시료를 잘게 잘라서 methanol(MeOH)로 실온에서 3회 추출하였다. 추출액을 37°C 이하에서 감압 농축하여 얻은 MeOH extract를 증류수에 현탁시킨 후 n-hexane, chloroform($CHCl_3$), ethylacetate(EtOAc), n-buthanol(n-BuOH) 및 H_2O 용매순서로 추출하였다.

Tyrosinase효소 저해활성 검색

Mushroom tyrosinase(Sigma, EC 1.14.18.1)는 276 units/m*l*가 되도록 1/15M phosphate buffer(pH 6.8)에 녹여 냉동고에 동결 보관한 후 사용시 빙상에서 녹여 효소원으로 사용하였다. L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)는 차광병에서 1/15M phosphate buffer에 녹인 후 사용하였으며, 이 용액은 사용직전에 조제하였다. 저해활성은 Kubo와 Masamoto방법[19,20]을 변형하여 tyrosinase(13.8 units/m*l*) 0.15 m*l*, 1/15 M phosphate buffer을 넣은 후 25°C에서 5분간 preincubation시키고 L-DOPA를 넣은 후 475 nm에서 5분간의 흡광도를 측정하였다. 즉, tyrosinase 효소와 버섯의 용매 추출물 또는 분획물을 모두 넣은 시료군(C), 시료 대신 동량의 1/15 M phosphate buffer을 넣은 대조군(A), 효소 대신 1/15 M phosphate buffer을 넣은 효소 대조군(D), 그리고 효소 및 시료 대신 1/15 M phosphate buffer을 넣은 공시험군(B)으로 실행하였다. 각 군은 모두 triplicate로 실행하였고, 아래의 수식으로부터 효소 저해율(%)을 산출하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A-B)-(C-D)}{A-B} \times 100$$

A: Absorbance at 475 nm in the absence of test sample and in the presence of enzyme

B: Absorbance at 475 nm in the absence of test sample and enzyme

C: Absorbance at 475 nm in the presence of test sample and enzyme

D: Absorbance at 475 nm in the presence of test sample and in the abesence of enzyme

석이버섯 EtOAc추출물의 칼럼 분획 및 preparative TLC와 HPLC 분석

석이버섯 EtOAc추출물을 silicagel column(70~230 mesh)에서 n-Hexane, EtOAc, $CHCl_3$, MeOH 용매순으로 용출하여 6개의 분획물(fraction)로 농축하였다. 활성이 가장 높은 분획물을 preparative TLC(전개용매 n-Hexane:EtOAc=2:1, v/v)로 전개하여 5% 황산으로 발색하여 3개의 bands(Rf=0.38, 0.27, 0.19)를 확인하였다. 각 band를 분취하여 MeOH로 추출 농축한 추출물(A, B, C)을 100 μg/m*l*의 농도로 희석하여 tyrosinase 저해활성을 검색하였다. 각 band의 추출물을 HPLC (Shimazu SCL-10A)를 사용하였다. 분리 조건은 이동상 80% MeOH용매, 유속 1 m*l*/min, 분석파장 220 nm, 칼럼 Shimpack ODS(6×150 mm) 등으로 분석하였다. 각 band 추출물을 재결정하였다. UV(Shimazu UV 1320pc), Mass (JMS-AX505H), NMR(avance DPX200) 등의 spectrum으로부터 화학구조를 확인하였다.

결과 및 고찰

버섯류의 용매분획별 회수율

버섯류 8종(느타리, 목이, 석이, 양송이, 팽이, 표고, 영지, 운지)을 각 100 g씩 실온에서 methanol로 3회 추출하여 감압농축하였다. 이 농축액을 hexane, chloroform, ethylacetate, n-buthanol 및 H_2O 용매순서로 농축하여 얻은 각 용매별 회수율을 Table 1에 나타내었다. 회수율은 버섯시료의 건조중량 대한 추출물 함량의 백분비로 하였다 MeOH 추출물의 수율은 양송이버섯>팽이버섯>표고버섯 순으로, hexane 추출물의 수율은 팽이버섯>목이버섯>석이버섯 순으로, $CHCl_3$ 추출물의 수율은 양송이버섯>팽이버섯>석이버섯 순으로, EtOAc 추출물의 수율은 석이버섯>양송이버섯>영지버섯 순으로, n-BuOH 추출물의 수율은 표고버섯>석이버섯>목이버섯 순이다. 물 추출물의 수율은 양송이버섯>표고버섯>팽이버섯 순으로 수용성인 다당체의 함량이 높기 때문에 다른 유기용매에 비교해서 수율이 높다고 하겠다.

버섯류의 Tyrosinase 저해활성 검색

식생활에 널리 이용되는 식용버섯류 중 느타리, 목이, 석이, 양송이, 팽이, 표고 6종의 버섯과 한방 및 민간에서 성인병의 예방 및 치료로 이용되는 약용버섯류 중 영지, 운지 2종의 버섯을 대상으로 용매추출물을 1 mg/m*l*의 농도로 희석하여 tyrosinase 저해활성을 검색하였다(Table 2). 느타리버섯은 추출용매중에 물 추출물이 40.2%로 가장 높은 저해율을 나타내고, 목이버섯은 추출용매중에 EtOAc 추출물이 40.8%로 가장 높은 저해율을 나타내고, 석이버섯은 추출용매중에 EtOAc 추출물이 78.42%로 가장 높은 저해율을 나타내고, 양송이버섯은 추출용매중에 물 추출물이

Table 1. The yields of solvent extraction for eight kinds of edible mushrooms

Mushroom (dry weight 100 g)	Solvent extractions (%)					
	MeOH	Hexane	$CHCl_3$	EtOAc	n-BuOH	H_2O
Pleurotus ostreatus	5.3	0.3	0.1	0.1	0.6	3.8
Auricularia auricula-judae	4.1	1.0	0.1	0.3	0.9	1.9
Umbilicaria esculenta	7.3	0.7	0.2	1.0	1.2	3.3
Agaricus bisporus	12.8	0.2	0.7	0.9	0.6	8.1
Flammuline velutipes	10.0	1.7	0.5	0.8	0.7	5.2
Lentinus edodes	8.9	0.1	0.1	0.2	2.0	6.5
Ganoderma lucidum	2.9	0.5	0.1	0.9	0.3	0.5
Coriolus versicolor	3.1	0.6	0.1	0.1	0.6	1.3

Table 2. Inhibition of solvent extractions of eight kinds of edible mushrooms on tyrosinase

Mushrooms	Inhibition (%)					
	MeOH[1)]	Hexane	$CHCl_3$	EtOAc	n-BuOH	H_2O
Pleurotus ostreatus	1.9	7.0	10.1	28.0	35.5	40.2
Auricularia auricula-judae	17.8	14.9	25.5	40.8	0.0	6.4
Umbilicaria esculenta	10.0	7.6	12.8	78.4	0.0	7.5
Agaricus bisporus	12.0	18.8	33.7	39.3	0.0	51.5
Flammuline velutipes	3.1	22.1	10.5	8.1	7.1	23.2
Lentinus edodes	40.5	26.9	22.5	27.5	12.2	16.1
Ganoderma lucidum	12.2	7.6	14.3	33.9	4.1	67.3
Coriolus versicolor	8.6	24.3	27.9	45.0	25.0	48.0

[1)] Each fraction obtained from 100 g of mushrooms was taken 10 mg of each extraction and dilulated with distilled water to make 10 mL of test solution. Final concentration (1 mg/m*l*) was assayed for examining tyrosinase inhibitory activity as described in the experimental method.

51.5%로 가장 높은 저해율을 나타내고, 팽이버섯은 추출용매중에 물 추출물이 23.1%로 가장 높은 저해율을 나타내고, 표고버섯은 추출용매중에 MeOH 추출물이 40.5%로 가장 높은 저해율을 나타내고, 영지버섯은 추출용매중에 물 추출물이 67.3%로 가장 높은 저해율을 나타내고, 운지버섯은 추출용매중에 물 추출물이 48.0%로 가장 높은 저해율을 나타내었다. 이와같이 버섯 5종의 물 추출물이 비교적 저해활성 높은 것은 수용성인 다당체와 관련성이 사료된다. 버섯 8종의 용매추출물중에서 석이버섯 EtOAc 추출물>영지버섯 물 추출물>양송이버섯 물 추출물>운지버섯 물 추출물의 순서로 석이버섯의 EtOAc 추출물이 78.4%로 가장 높은 저해율을 나타내어 저해물질의 분리 정제가 기대되었다. 석이버섯의 생리활성으로 phenolic carboxylic acid 중합체가 간장중의 cholesterol치를 저하한다는 보고가 있다.[21)] 석이버섯은 분류학상 지의류(lichen)에 속하며 조류와 진균류가 공생하는 독특한 생물체이다.[22)] 최근 지의류에 관한 연구로 phenolic carboxylic acid 기본골격으로 하는 mono-, di-, tri-, tetra-중합체로 생합성대사경로, 2차 대사물질의 분리 및 화학구조, 생리활성 등에 관심이 집중되고 있다.[22,23)]

석이버섯 EtOAc추출물의 정제와 얻어진 분획물의 활성

석이버섯 EtOAc추출물을 silicagel column(70~230 mesh)에서 n-Hexane, EtOAc, $CHCl_3$, MeOH 용매순으로 용출하여 6개의 분획물(fractions)로 분획하였다. 각 분획물을 100 μg/m*l*의 농도로 첨가하여 tyrosinase 활성 저해를 검색하였다(Table 3).

각 분획물의 저해율은 Fr. 4>Fr. 5>Fr. 3>Fr. 1>Fr. 2>Fr. 6의 순이다. Table 3에서 처럼 60.9%의 가장 높은 저해율을 나타내는 Fr. 4 분획물을 preparative TLC(전개용매 n-Hexane:EtOAc=2:1, v/v)로 전개하여 5% 황산으로 발색하

Table 3. Inhibition of each fractions from EtOAc extract of *Umbilicaria esculenta* on tyrosinase

Fractional numbers of *Umbilicaria esculenta*	Concentration (μg/m*l*)	Inhibition (%)
1	100	37.7
2	100	10.1
3	100	47.1
4	100	60.9
5	100	54.1
6	100	2.9

Table 4. Preparative TLC bands of the most active column fraction from *Umbilicaria esculenta* and their inhibition on tyrosinase

Preparative TLC bands	Rf value[1)]	Concentration (μg/m*l*)	Inhibition (%)
A	0.38	100	15.6
B	0.27	100	27.0
C	0.19	100	32.9

[1)] Rf value was TLC band developed with solevents(n-hexane: ethylacetate=2:1)

여 3개의 bands(Rf=0.38, 0.27, 0.19)를 확인하였다. 각 band의 추출물(A, B, C)에 대한 100 μg/m*l*의 농도로 첨가하여 tyrosinase 활성 저해를 검색하였다(Table 4).

각 band의 저해율은 C>B>A의 순서로 각각 32.9%, 27.0%, 15.6%로 나타내었다. A, B, C추출물을 HPLC로 분석시 Fig. 1과 같이 4개 peak로 분리되었다. Fr. 4 분획물의 분취한 A, B, C는 retention time이 각 6.8분, 7.9분, 9.4분, 16.3분의 4개 peak로 보아 일부 혼합물이 있음을 확인하였다. 분취한 A band는 9.4분의 peak가 가장 크고, 분취한 B band는 16.1분의 peak가 가장 크고, 분취한 C band는 6.8분의 peak가 가장 크다.

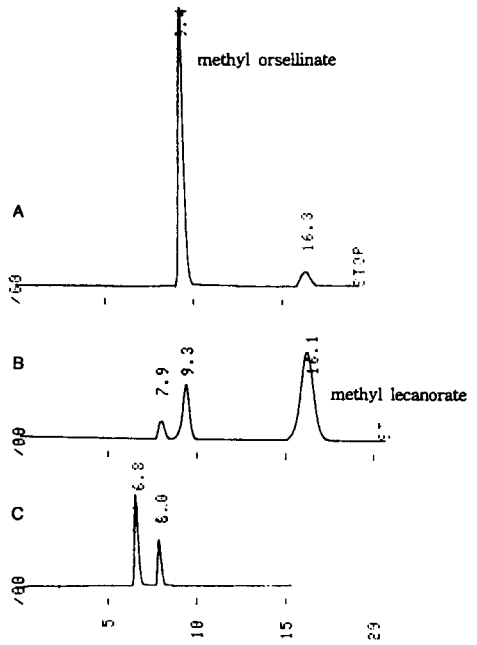

Fig. 1. HPLC patterns of preparative TLC bands (A: Rf= 0.38, B: Rf=0.27, and C: Rf=0.19).

분취한 각 Band의 구조확인

분취한 A band 추출물을 재결정하여 얻은 흰색결정은 mass spectrum에서 m/z 182 peak의 M^+(molecular ion peak)와 혼합물인 158 peak도 나타났다. Fragmentation에 의해 151(M^+-OCH_3), 150(M^+-CH_3OH)에서의 peak는 phenolic carboxylic acid 기본골격을 갖는 monomer이다. ^{1}H NMR spectrum에서 2개 methyl기의 protons(δ 2.49, 3.93, singlet), benzene에서의 2개 protons(δ 6.28, 6.23, doublet 3Hz), hydroxy에서의 proton(δ 11.7)들이다. ^{13}C NMR spectrum에서 2개의 methyl기 탄소(δ 24.9, 51.9), 2개의 methine기 탄소(δ 101.3, 111.4), 5개의 4급탄소(δ 105.7, 144.0, 160.3, 165.3, 172.1)들이다. UV spectrum은 299, 262 nm에서 극대흡수파장을 나타낸다. 이 흰색결정은 monomer인 methyl orsellinate ($C_9H_{10}O_4$)와 orsellinate($C_8H_8O_4$)의 혼합물로 추정하였다. 분취한 B band 추출물을 재결정하여 얻은 흰색결정은 mass spectrum에서 m/z 332 peak의 M^+(molecular ion peak)와 혼합물인 182 peak도 나타났다. ^{1}H NMR spectrum에서 3개 methyl기의 protons(δ 2.57, 2.61, 3.98, singlet), benzene에서의 3개 protons(δ 6.31 singlet, 6.58, 6.70, doublet 2Hz)들이다. HPLC 분석(Fig. 1)에서 처럼 dimer인 methyl lecanorate와 일부 혼합물(methyl orsellinate와 orsellinate)로 추정하였다. 분취한 C band 추출물을 재결정하여 얻은 흰색결정은 mass spectrum에서 m/z 482 peak의 존재로 trimer인 methyl gyrophorate로 추정하였지만 phenolic carboxylic acid유도체의 mono-, di-혼합물로 인하여 methylation 등의 정확한 구조는 확실하지 않다. 석이버섯 EtOAc 추출물의 유효성분은 phenolic carboxylic acid 기본골격을 갖는 mono-, di-, trimer인 methyl orsellinate와 orsellinate, methyl lecanorate, methyl gyrophorate 물질로 사료되며 Table 4에서 처럼 tyrosinase 저해율은 C>B>A의 순서로 보면 tri->di->monomer 중합체 순서로 활성 저해율이 높아진다고 사료된다.

국문요약

피부 노화 및 갈변화에 관련된 tyrosinase 활성을 저해하는 유효성분을 찾고자 최근 기능성 식품소재로 기대되는 한국산 식용버섯 8종을 용매추출 및 칼럼분획하여 tyrosinase 효소활성 저해 검색하고 그 유효성분을 분리하

고자 한다. 8종의 식용버섯은 methanol, n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-buthanol 용매 및 물 추출에서 methanol과 물 추출물의 회수율이 양송이버섯, 팽이버섯, 표고버섯에서 높았다. 각 용매 추출물(1 mg/ml)의 tyrosinase 활성 저해율은 석이버섯 EtOAc 추출물, 영지버섯 물 추출물, 양송이버섯 물 추출물의 순서로 78.4%, 67.3%, 51.5%로 검색되었다. 가장 저해율이 높은 석이버섯 EtOAc 추출물을 silicagel칼럼 분획하였고, 100 μg/ml의 농도에서 60.9%의 가장 활성이 높은 분획물을 TLC로 전개하여 Rf 값이 0.38, 0.27, 0.19의 3개 band를 분취하였고 그 분취물의 저해율은 15.6%, 27.0%, 32.9%로 검색되었다. 석이버섯에서의 유효성분은 HPLC, UV, Mass, NMR 등의 기기분석에 의해 orsellinate, methyl orsellinate, methyl lecanorate, methyl gyrophorate의 혼합물질로 확인하였다.

참고문헌

1. Lee, T.S.: The full list of recorded mushroom in Korea, *Kor. J. Mycol.*, **18**, 233 (1990).
2. 水野 卓, 川合正允: キノコの化學 · 生化學, 新日本印刷株式會社, 東京, 日本, (1992).
3. Papaparaskeva Petrides, C., Ioannides, C. and Walker, R.: Contribution of phenolic and quinonoid structures in the mutagenicity of the edible mushroom *Agaricus bisporus*, *Food Chem. Toxic.*, **31**, 561 (1993).
4. Hikino, H., Ishiyama, M., Suzuki, Y. and Kono, C.: Mechanisms of hypoglycemic activity of ganoderan B: A glycon *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Medica*, **55**, 157 (1989).
5. Kubo, M., Matsuda, H., Nogami, M., Arichi, S. and Takalashi, T.: Studies on *Ganoderma lucidum*. IV. Effects on disseminated intravascular coagulation. *Yakugaku Zasshi*, **103**(8), 871 (1983).
6. Shimizu, A., Yano, T., Saito, Y. and Inada, Y.: Isolation of an Inhibitor of platelet aggregation from a fungus, *Ganoderma lucidum*, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**(7), 3012 (1985).
7. Komoda, Y., Shimizu, M., Sonoda, Y. and Sato, Y.: Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitor. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**(2), 531 (1989).
8. Gunata, Y.Z., Sapis, J. and Moutounet, M.: Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenoloxidase, *Phytochemistry*, **26**, 1573 (1987).
9. Huang, S., Hart, H and Wicker, L.: Enzymatic and color changes during post-harvest storage of lychee fruit, *J. Food Sci.*, **55**, 1762 (1990).
10. Pifferi, P.G. and Cultera, A.: Enzymatic degradation of antocyanins: The role of sweet cherry polyphenol oxidase, *J. Food Sci.*, **39**, 786 (1974).
11. Tan, B.K. and Harris, N.D.: Maillard reaction products inhibit apple polyphenoloxidase, *Food Chem.*, **53**, 267 (1995).
12. Kahn, V., Schved, F. and Lindner, P.: Effect of maltol on the oxidation of *o*-dihy droxyphenols by mushroom tyrosinase and by sodium periodate, *J. Food Biochem.*, **17**, 217 (1993).
13. Hashiguchi, H. and Takahashi, H.: Inhibition of two copper containing enzymes, tyrosinase and dopamine β-hydroxylase, by L-Mimosine, *Molecular Pharmacology*, **13**, 362 (1976).
14. Tripathi, R.K., Hearing, V.J., Urabe, K., Aroca, P. and Spritz, R.A.: Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase, *J. Bio. Chem.*, **267**, 23707 (1992).
15. Byfield, S.N. and Riley, P.A.: Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase, *J. Biochem.*, **288**, 63 (1992).
16. Canovas, F.G., Carmona, F.G., Sanchez, J.V., Pastor, J.L. I. and Teruel, J.A.L.: The role of pH in the melanin biosynthesis pathway, *J. Biol. Chem.*, **257**, 8738 (1982).
17. Graham, D.G. and Jeffs, P.W.: The role of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine in melanin biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, **252**, 5729 (1977).
18. Lopez, J.N.R., Tudela, J., Varon R., Carmona, F.G. and Canovas, F.G.: Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway, *J. Biol. Chem.*, **267**, 3801 (1992).
19. Kubo, I., Hori, I.K. and Yokokwa, Y.: Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruit, *J. Nut. Products*, **57**, 545 (1994).
20. Masamoto, Y. and Kubo, S.L.M.: Inhibitory effect of chinese crude drugs on tyrosinase, *Planta medica*, **40**, 361 (1980).
21. Kim, C.H.: Studies on the substances contained in *Gyrophora esculanta* lowering plasma and liver cholesterol levels. *Korean J. Nutr*, **19**, 155 (1986).
22. Culberson, C.F.: Chemical and botanical guide to lichen products, The american bryological and lichenological society, USA (1977).
23. Higuchi, M., Miura, Y., Boohene, J., Kinoshita, Y., Yamamoto, Y., Yoshimura, and Yamada, Y.: Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts, *Planta Medica*, **59**, 253 (1993).