

## 능이버섯(*Sarcodon aspratus*) 추출물의 생리활성

송재환 · 이현숙 · 황진국 · 한정환<sup>1</sup> · 노정근 · 금동혁 · 박기문\*

성균관대학교 생명공학부, <sup>1</sup>약학부

## Physiological Activity of *Sarcodon aspratus* Extracts

Jae-Hwan Song, Hyun-Sook Lee, Jin-Kook Hwang, Jeung-Whan Han<sup>1</sup>, Jeong-Geun Ro,  
Dong-Hyuk Keum and Ki-Moon Park\*

Faculty of Life Science and Technology and <sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Sungkyunkwan University

### Abstract

This study was carried out to find the preventive medical and therapeutic effects of *Sarcodon asparatus* on adult disease by employing several biological and biochemical assays. Nitrate scavenging ability(NSA) of *Sarcodon asparatus* extracts was displayed up to 99.9% at pH 1.2 in a dose-dependent manner. They also had 90.4% electron donating ability(EDA) at the concentration of 0.1 mg/mL. Extracts of *Sarcodon asparatus* were also able to function as a powerful antioxidant at all concentrations(0.01~1.0 mg/mL). Furthermore, we observed that 1 mg/mL concentration of the extracts was more powerful than BHT. With respect to fibrinolytic activity, *Sarcodon asparatus* showed 1,843.8 unit/g, which was higher than streptokinase(1,189 unit/g). The inhibitory effects of the extracts on angiotensin converting enzyme, measured by the normal and pretreatment methods, were 53 and 58%, respectively. We also performed cytotoxicity effect of *Sarcodon asparatus* extracts on a various cancer cell lines. The growth inhibitory effects of the extracts(5.0 mg/mL) on A549, HeLa, AGS, and SK-Hep-1 cells were 78.9, 55.3, 69.0, and 42.5 %, respectively. Interestingly, *Sarcodon asparatus* extracts induced mutation on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 when Ames test was done.

**Key words :** *Sarcodon aspratus*, fibrinolysis, antioxidation, Ames test, cytotoxicity

### 서 론

버섯류의 항암 활성에 대한 최초의 연구는 Lucas와 Ringler(1957)에 의해 *Boletus edulis*의 열수추출물에서 sarcoma 180에 강력한 저지력을 지닌 B-1,3-glucan인 lentinan을 발견하면서 시작되었으며, *Ganoderma lucidum* (Some et al., 1989), *Macrolepiota procera*(Kim et al., 1989), *Grifola frondosa*(Mizuno et al., 1986), *Hypsizigus marmoreus* (Kazun et al., 1990), *Ganoderma applanatum*(Usui et al., 1983) 등의 추출물도 항암효과가 있다고 알려져 있다. 그 외에 *Tricholomopsis decora* 등으로부터 혈전용해성분의 추출과 치료제로

사용가능한 생리활성 물질에 대한 연구 등 버섯류를 대상으로 신 물질 탐색연구가 활발히 진행되고 있다(Choi et al., 1999).

국내 자생버섯으로 예로부터 식용이면서 약리작용이 뛰어난 것으로 알려진 능이버섯(*Sarcodon aspratus*)은 능열, 능혈 또는 향기가 진하여 향 버섯이라 부르고 있으며 담자균류의 민주름버섯목(Aphyllophorales)의 굴뚝버섯과(Telephoraceae)에 속하고, 균근성 버섯으로 참나무 및 박달나무에 공생하고 있다.갓의 크기는 5~40cm로 갈색 내지 암갈색이며 성숙한 것은 깔때기나 나팔모양이고, 갈색 내지 흑갈색의 침상돌기로 덮여있으며,갓 밑에는 굵은 바늘모양의 자실총이 돋아 있고, 표면에 짙은 갈색의 포자가 형성되어 있다(Kang et al., 2000). 지금까지 밝혀진 능이버섯에 관한 연구로 단백질 함량은 약 32%, 다당류의 함량은 53%이며, 육류를 먹고 체했을 때 섭취하면 좋다고 알려진 능이버섯의 protease는 소화

\*Corresponding author : Ki-Moon Park, Department of Food and Life Science, Sungkyunkwan University, 300 Chunchun-dong, Jangan-gu, Suwon 440-746, Kyunggi-do, Korea. Tel: 82-31-290-7806, Fax: 82-31-290-7816, E-mail: kimoon@skku.ac.kr

효소와 비교할 때 50% 이상의 단백소화력을 보여줌으로써 소화 효소제로서의 기능이 확인되어 있다(Eun et al., 1988). 또한 능이버섯은 건조하여 4°C 이하에서 3년간 보관하거나, 정제효소를 4°C에서 6개월간 보관하였을 때도 효소의 활성이 거의 변하지 않는 것으로 나타났다(Min 등, 2002). 능이버섯의 전한 향기의 주성분은 1-octen-3-ol이며, 1-octen-3-one, 3-octanone, 2-octen-1-ol 등의 C<sub>8</sub>화합물과 benzeneaceta-aldehyde 등으로 알려져 있으나, 그 외에 전반적인 생리활성에 대해서는 연구가 미진한 실정이다(Jeong et al., 2001). 따라서, 본 연구에서는 능이버섯 자실체 추출물의 인체 암세포에 대한 세포독성 및 돌연변이원성, fibrin 분해효소에 의한 항 혈전성, polyphenol 등 항산화물질에 의한 항산화작용, angiotensin converting enzyme(ACE) 저해성분에 의한 항고 혈압성 등을 확인하여 생활습관병의 예방 및 치료보조제로서의 활용 여부를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 시료

식용 및 약용버섯으로 알려진 *Sarcodon aspratus*(능이버섯, 강원도산)을 건조하여 사용하였다. 능이버섯 추출물은 자실체 각 100 g를 조분쇄하고 20배의 40% ethanol을 첨가하여 40°C에서 48시간 환류 추출, 여과한 후 50°C에서 감압 농축하여 100 g으로 제조하였으며 0.22 μm membrane filter로 제균한 후 -20°C 이하에서 보관하면서 사용하였다.

### Nitrite 제거활성

Kato 등(1987)의 방법에 따라 1 mM NaNO<sub>2</sub> 1 mL에 시료 0.6 mL를 첨가하고 0.1 N HCl를 사용하여, pH 1.2로 조정한 후 10 mL로 하였다. 37°C에서 1시간 반응시킨 반응액을 1 mL씩 취하고 2% acetic acid 5 mL, 30% acetic acid로 제조한 Griess시약 0.4 mL를 가하여 혼합 후 상온에서 15분 반응시킨 다음 520 nm에서 분광광도계(Ultrospec 1000, Phamacia Biotech., England)로 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Nitrite scavenging activity (\%)} = 1 - \left( \frac{A - C}{B} \right) \times 100$$

A : 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액에 시료용액을 첨가하여 1시간 방치 후의 흡광도

B : 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액의 흡광도

C : 시료 자체의 흡광도

### 전자공여활성

Blois(1958)의 방법에 따라 능이버섯 추출물의 농도별 흡

석용액 0.2 mL에 4×10<sup>-4</sup> M DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrayl)용액 0.8 mL를 가하여 10초간 혼합하고, 상온에서 10분간 방치 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Electron donating activity (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{시료흡광도}}{\text{대조군흡광도}} \right) \times 100$$

### 항산화력 활성

Kiharu 등(1990)의 방법을 변형하여 99.5 % ethanol 2 mL 및 ethanol로 희석한 2.5% linolenate 2.05 mL, 1시간 이상 aeration시킨 0.05 M phosphate buffer(pH 7.0) 4 mL에 처리 농도 별로 시료 일정량을 첨가한 후 중류수를 첨가하여 10 mL로 조정하였으며, 70°C 암소에서 24시간 동안 반응시켰다. 그리고, 3시간 간격으로 반응액 0.1 mL를 취하여 75% ethanol 9.7 mL 및 30% ammonium thiocyanate 0.1 mL, 3.5% HCl · 0.02 M ferrous chloride 혼합용액 0.1 mL를 차례로 첨가하여 상온에서 3분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 혈전 용해활성

Astrup과 Mullertz(1952) 방법에 따라 0.2% fibrinogen-용액(pH 7.5, borate saline buffer로 제조) 5mL를 혼합하여 제조한 fibrinogen-agarose 용액에 thrombin 50 uL를 첨가하여 fibrin plate를 제조하였다. plate에 지름 5 mm의 pasteur pipette로 4개 원형을 만들어 각 시료를 20 uL씩 농도별로 점적하고 37°C에서 18시간 동안 반응시킨 후 생성된 clear zone을 측정하였다. 표준시료로서 정제된 혈전용해효소인 Streptokinase(제일제당, 1,180 unit/g)의 용해면적에 대한 시료의 용해면적의 상대적인 비율로 환산하여 산출하였다.

$$\text{혈전 용해활성 (unit/g)} =$$

$$\frac{\text{시료의 clearzone size}}{\text{표준시료의 clearzone size}} \times \text{표준시료역가}$$

### Superoxide Dismutase(SOD) 유사활성

SOD유사활성은 nitroblue tetrazolium(NBT)의 환원을 억제하는 원리에 의해 측정하였다(Beaucham and Fridovich, 1971). 즉, cuvette에 각 시료용액 50~150 uL를 첨가하고, 5 mM xanthine (Sigma, Grade V) 5 uL, 10 mM EDTA 5 uL, 2 mM NBT 5 uL, 50 mM phosphate buffer(pH 7.8) 430 uL, xanthine oxidase(50unit) 5 uL를 첨가하여 500 uL로 조정한 후 560 nm에서 60초간 흡광도 변화를 측정하였다. 그리고 control O.D.값에 시료용액에 의한 O.D.값을 나눈 수치를 R 값으로 하여 R이 1.6~2.4가 되도록 시료량 및 농도를 조절하였다.

SOD like activity(unit/g) =

$$\frac{1}{R_o \cdot 2\text{일 때의 sample량(mL)}} \times \text{회석 배수} \times 100$$

### Angiotensin Converting Enzyme(ACE) 저해활성

ACE저해활성은 Cushman과 Cheung(1971)의 방법에 따라 0.3 M NaCl · 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3)로 녹인 12.5 mM HHL(Hip-Hip-Leu, Sigma 4884) 기질 100 uL에 시료 5 uL를 첨가하고 sodium borate buffer 45 uL를 가한 후 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응 후 rabbit lung acetone powder(Sigma L0756)로 제조한 ACE 150 uL를 가하고 다시 37°C, 1시간 반응시킨 다음 0.5 N HCl 250 uL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이 용액에 ethyl acetate 1.5 mL를 넣고 1분간 혼합한 후 상온에서 2,800rpm, 10분간 원심분리하여 상등액 1mL를 취하고 140°C에서 20분간 건조하고 1 M NaCl 3 mL를 가하여 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정하는 통상법과 ACE와 sample을 먼저 반응시킨 후 기질을 나중에 첨가하는 전처리법으로 측정하였다

$$\text{ACE 저해율(\%)} = \frac{Ec - Es}{Ec - Eb} \times 100$$

$Ec$  : 시료대신 증류수 첨가시의 흡광도,

$Es$  : 시료첨가시의 흡광도

$Eb$  : 반응 정지 후 시료 첨가시의 흡광도

### 세포독성 측정

능이버섯 추출물의 세포독성을 측정하기 위해 인체 유래 암세포 A549(lung carcinoma ; KCLB 10185), HeLa(cervix uterine denocarcinoma; KCLB 10002), AGS(stomach adenocarcinoma; KCLB 21739), SK-Hep-1(liver adenocarcinoma; KCLB 30052)를 한국 세포주은행(KCLB)에서 분양받아 10% Fetal bovine serum(FBS)와 1% penicillin 및 streptomycin을 포함된 RPMI-1640에서 배양하였다. 능이버섯 추출물의 cytotoxicity는 Carmichael 등(1987)의 방법에 따라 MTT assay로 실험하였다. 즉,  $5 \times 10^4$  cell/well 농도로 96 well plate에 분주 후 세포가 plate 바닥에 부착될 수 있도록 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 16시간 배양하였다. 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지 180 uL와 버섯 추출물 20 uL를 첨가하여 다시 24시간 배양한 후 배지를 제거하고 0.5 mg/mL 농도의 MTT시약을 well 당 200 uL씩 분주하였다. 4시간 배양 후 MTT 시약이 포함된 배지를 제거하고, dimethyl sulfoxide 100 uL를 가한 후 sorenson's buffer(0.1 M NaCl · 0.1 M glycine, pH 10.5) 20 uL를 처리하여 상온에서 5분간 발색시키고 ELISA microplate reader(EL×800, Bio-tech., USA)를 이

용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조구는 시료 대신 PBS를 첨가하였다.

Cytotoxicity(%) =

$$\frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

### 돌연변이원성

Maron과 Ames(1983)의 방법에 따라 시료의 농도 증가에 따른 *Salmonella typhimurium* TA98 (KCTC 2053) 및 TA100 (KCTC 2054)의 돌연변이원성을 알아보기 위하여 멀균된 micro tube에 시료를 2.5, 5.0, 10.0 uL씩 넣은 후 S9 mix 500 uL, 균주 100 uL를 첨가하고 37°C water bath에서 20분간 전 배양하였다. 이것을 0.5 mM histidine · biotin을 포함된 top agar 2 mL에 첨가한 후 minimal glucose agar plates에 중충하고 37°C에서 48시간 배양 후 revertant colony수가 spontaneous colony의 수보다 2배 이상이면 돌연변이성이 있는 것으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### Nitrite 제거활성

능이버섯 추출물을 사용하여 nitrosamine 생성 원인물질인 nitrite 제거활성을 확인한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 즉, nitrosamine 생성 최적조건인 pH 1.2에서 반응시킨 경우, 능이버섯 추출물의 경우 0.05 mg/mL 농도에서부터 50%이상의 nitrite 제거활성을 나타내었으며, 농도 의존적으로 증가하였다. 능이버섯 추출물의 경우 0.5 mg/mL에서는 99.14±1.86%의 높은 활성을 나타내어 대조군으로 사용한 0.1 mg/mL vitamin C 및 butyrated hydroxy toluene(BHT)의 nitrite 제거활성 99.64±0.09%, 98.35±0.11%과 유사하였고, 0.1 mg/mL에서는 89.06±0.74%로 천연 항산화제로 사용되는 vitamin

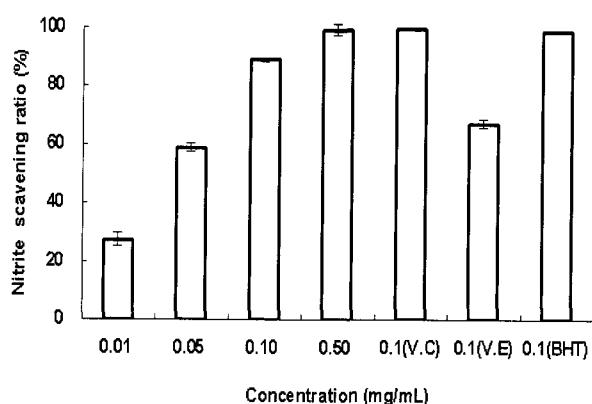


Fig. 1. Nitrite scavenging activity of 40% ethanol extracts of *Sarcodon aspratus* at pH 1.2.

E의  $67.22 \pm 1.63\%$  보다 활성이 높음을 알 수 있었다. Kim 등(2001)은 팽이버섯 및 마늘, 녹차, allspice, 하수오, 오미자, 행인, 솔잎에 대한 nitrite 제거활성 실험에서 각각의 에탄올 추출물은 pH 1.2에서 10 mg/mL 농도로 처리 시 높은 제거활성을 보였으며, 10 mg/mL 농도에서 녹차추출물은 100%, 솔잎추출물은 95%의 활성을 나타냈고, 팽이버섯, 마늘, 녹차, 하수오, 오미자, 행인은 모두 20% 이하의 nitrite 제거활성을 나타낸다고 보고하였다. 또한, Jung과 Lee(1998)은 석이버섯 중의 다양한 페놀성 화합물이 nitrite 제거활성이 있다고 보고하였다. 이와 같은 결과로 볼 때, 능이버섯 추출물의 경우 팽이 및 석이버섯보다 높은 nitrite 제거활성을 가지고 있으며 동일 농도에서는 녹차추출물보다 강한 활성을 보일 것으로 판단된다. 능이버섯의 경우 다른 버섯류에 비해 강한 향과 진한 색상을 가지고 있어 nitrite 제거활성에 관련된 폴리페놀성분의 함량이 높은 것으로 판단되며 이에 따라 강한 활성을 보유한 것으로 생각된다(Kang et al., 2000; Jeong et al., 2001).

### 전자공여활성

전자공여능에 의한 항산화 활성은 안정한 free radical인  $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picryl hydrazyl(DPPH)를 이용한 전자공여효과로서 능이버섯추출물의 환원력을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 즉, 능이버섯 추출물의 경우 전자공여효과가 0.1 mg/mL에서  $90.42 \pm 0.54\%$ 로 가장 높게 나타났고, 농도 의존적으로 활성이 증가하였으나, 0.1 mg/mL 이상에서는 농도에 영향을 받지 않았다. 전자공여활성은 free radical을 환원시킴으로서 산화를 방지하는 항산화활성과 관련이 있기 때문에 식품에 산화방지를 목적으로 사용되는 대조군을 사용하여 실험한 결과 0.1 mg/mL 농도에서 vitamin C가 95.36%로 가장 높았고, vitamin E 역시  $92.56 \pm 0.04\%$ 로 높게 나타났으나 합성 항산화제인 BHT의 경우 전자공여 활성이 약 50% 수준으로 낮게 나타났다. Kim 등(2001)은 식물체 추출물 중

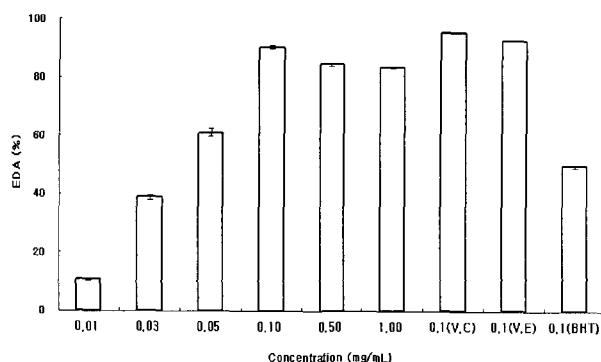


Fig. 2. Dose-response effects of electron donating ability (EDA) of 40% ethanol extracts of *Sarcodon aspratus*.

녹차 및 allspice, 오미자, 하수오 등이 50% 이상의 전자공여 효과를 나타냈다고 발표했고, Kang 등(1996)은 전자공여능이 phenolic acids와 flavonoids 및 기타 phenol성 물질에 대한 항산화작용의 지표라 하였으며, 이러한 물질은 환원력이 큰 것 일수록 전자공여능이 높다고 하였다. 따라서 능이버섯 추출물의 전자공여효과가 우수하여 산화성 생물활성 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

### 항산화활성

능이버섯 추출물의 첨가가 2.5% linoleic acid의 자동산화 속도에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig. 3과 같이 0.01 mg/mL 이상의 모든 농도에서  $p < 0.001$  수준으로 유의성 있게 linoleic acid의 자동산화를 억제하는 것으로 나타났다. 특히, 0.5~1.0 mg/mL를 첨가했을 때 산화생성물 생성에 따른 O.D. 값의 변화는 24시간 후 0.5 mg/mL은  $0.054 \pm 0.004$ , 1.0 mg/mL은  $0.051 \pm 0.005$ 로 식품에 가장 많이 사용되고 있는 항산화제인 BHT(0.1 mg/mL)의  $0.066 \pm 0.002$ 와 vitamin E(0.1 mg/mL)의  $0.079 \pm 0.010$ 보다 높은 항산화활성을 보였으며, 0.1 mg/mL 농도에서도  $0.071 \pm 0.005$ 로 vitamin E와 유사한 항산화활성을 나타냈다. Lee 등(1990)은 황백의 열수추출물의 항산화 활성에 관한 연구에서 5~50 mg/mL 첨가 시 과산화물의 생성을 강하게 억제시키며, 항산화제인 BHT와 vitamin C, E, 황백 추출물 5 mg/mL 농도에서 비교했을 때 BHT 및 vitamin C보다는 조금 낮은 항산화력을 나타내고, vitamin E의 항산화력이 가장 낮게 나타났다고 하였다. 또한, Kang(1998) 등의 각종 생약추출물에 대한 항산화 효과에서 0.2 mg/mL의 농도에서 울금 및 구기자, 산조인, 약쑥, 당

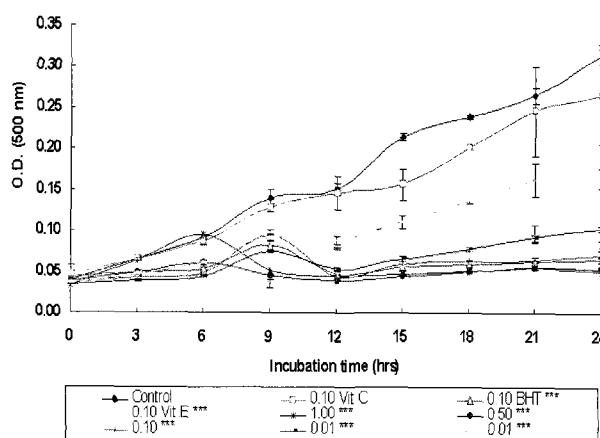


Fig. 3. Antioxidant effects of 40% ethanol extracts of *Sarcodon aspratus* on the autoxidation rate of the linoleic acid stored at 70°C.

The values are mean  $\pm$  S.D. of 4 replications. Significantly different from control at \*\*\* $p < 0.001$  by Student's t-test.

귀, 산조인 등의 항산화력은 우수하여, 대조구인 vitamin E나 rosemary 보다 월등히 높은 항산화력을 보였다고 보고하였다. 따라서, 능이버섯 추출물의 경우 황백 추출물이나 올금, 구기자 등의 생약 추출물과 동등 수준의 항산화활성을 보유한 것으로 나타났다.

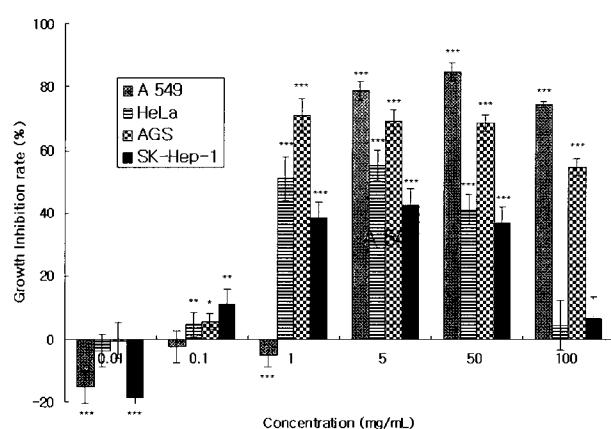
#### SOD 유사활성 및 혈전용해 활성, ACE 저해활성

SOD유사활성물질은 SOD와 유사한 작용을 하는 저분자 물질로서 주로 phytochemical에 속하는 물질이다. 능이버섯 추출물의 SOD유사활성을 측정한 결과는 Table 1과 같이  $3,250 \pm 51$  unit/g으로 나타났다. Park 등(1998)은 버섯 ethanol 추출물의 SOD활성 실험에서 *Armillariella mellea*(뽕나무버섯) 및 *Daedalea dickinsii*(테미로버섯), *Fomitella fraxinea*(아카시목재버섯)의 추출물에 의하여 SOD효소 활성이 증가한다고 보고하였으며, Kim 등 (2001)은 마늘 및 브로콜리, 상추 등에 SOD유사활성물질이 함유되어 있다고 하였다. 감잎차의 SOD 유사활성은 833.33 unit/g(Park 등 1995), 그리고 Kim과 Park(2000)이 보고한 curry 향신료의 SOD 유사활성은  $10^3 \sim 10^4$  unit/g 으로 능이버섯 추출물의 SOD 유사활성이 감잎차보다 높으며 향신료 중 parsley 및 mustard, coriander seed와 유사한 활성을 가진 것으로 나타났다. 활성화된 thrombin에 의해 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 생성된 혈전은 plasmin과 같은 혈전용해효소에 의해 용해된다. 능이버섯 추출물의 혈전용해 활성을 측정한 결과 표준시료인 Streptokinase(제일제당) 1,180 unit/g 보다 높은 1,843.8 unit/g의 활성을 나타냈다. Choi 등(1999)은 *Daedaleopsis styraeina*, *Trichaptum abietinum*, *Coriolus versicolor*, *Pisolithus tinctorius* 그리고 *Tricholomopsis decora* 버섯추출액의 혈전용해효소 활성을 측정한 결과, 대조구로 사용한 plasmin 1.0 unit/mL 보다 3~4배의 높은 활성을 나타냈다고 보고하였다. 따라서, 표준 시료가 동일하지 않아 상대 비교를 할 수 없으나 능이버섯 추출물 역시 상기의 버섯 추출물과 동일하게 혈전 용해활성이 강한 것으로 판단된다. ACE 저해활성 측정은 기질이 ACE의 저해물질로 작용하거나, ACE의 순도에

따라서 흡입될 수 있는 이종의 효소에 의해 ACE저해물질이 분해 될 수도 있기 때문에 시료와 기질을 ACE와 함께 반응시키는 통상법(General method)과 미리 시료를 ACE와 반응시킨 후 기질을 첨가하여 반응시키는 전처리법(pretreatment method)을 이용하여 분석하였다. 능이버섯 추출물로 ACE저해 활성을 측정한 결과, Table 1과 같이 통상법에서는  $52.89 \pm 1.93\%$ , 전처리법은  $57.63 \pm 0.61\%$ 로 나타났다. Lee(2002)가 보고한 curry 사용원료 중 ACE저해활성에서 통상법보다 전처리법의 활성이 높게 나타난 것은 본 실험과 일치하였으며, 활성이 가장 강하게 나타난 red paper의 통상법( $52.80 \pm 2.13\%$ ) 및 전처리법( $64.39 \pm 2.65\%$ )의 결과와 능이버섯 추출물의 ACE저해활성이 유사하게 나타났다. 또한, Youn 등 (1992)이 보고한 고등어 근육단백질의 ACE저해활성은 50% 미만으로 능이버섯 추출물보다 낮게 나타났다.

#### 세포독성 측정

Human 유래 암세포에 대한 능이버섯 추출물의 세포독성을 실험한 결과는 Fig. 4와 같다. 즉, 폐암 세포주인 A549에 대한 세포독성 실험결과 능이버섯 추출물의 증식 억제율은 같이 처리 농도 1 mg/mL 이하에서는 세포의 증식을 촉진하는 것으로 나타났으나, 5 mg/mL에서는 78.9%, 50 mg/mL에서는 84.7%의 증식 억제를 나타내었다. 그리고 처리농도가 100 mg/mL까지 증가하여도 증식 억제율이 증가하지 않음을 알 수 있었다. 자궁암 세포인 HeLa의 경우 능이버섯 추출물의 세포 증식 억제율은 0.01 mg/mL의 농도에서는 오히려 세포 증식이 촉진되었으나 1.0 mg/mL에서는 51.2%, 5 mg/mL에서는 55.3%로 나타났으며, 그 이상의 농도에서는 증식



**Fig. 4. Dose-response effects of 40% ethanol extracts of *Sarcodon asparatus* on the cytotoxicity of human cancer cells.**

The values are mean $\pm$ S.D. of 6 replications. Significantly different from control at \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  and \*\*\* $p<0.001$  by Student's t-test.

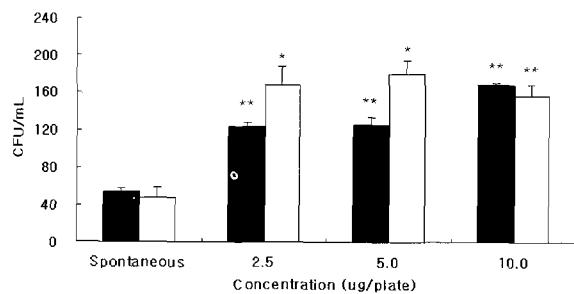
<sup>1)</sup> Streptokinase was 1,180 unit/g.

Attribute	<i>Phellinus ribis</i> extracts
SOD like activity	$3,250 \pm 51$ unit/g
Fibrinolytic activity	1,843.8 unit/g <sup>1)</sup>
ACE inhibition rate (general)	$52.89 \pm 1.93\%$
ACE inhibition rate (pre-treatment)	$57.63 \pm 0.61\%$

억제율이 감소하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 버섯 추출물의 처리 농도가 증가하면서 함유되어 있는 색소물질의 농도 역시 증가하여 세포독성 측정에 사용되는 MTT 시약에 영향을 끼쳐 실제 세포독성은 증가하였더라도 흡광도가 높게 나타났기 때문에 판단된다. 위암 세포주인 AGS에 대한 세포독성 실험결과 0.01 mg/mL의 농도에서는 증식억제 효과가 없었으며, 0.1 mg/mL에서는 6% 미만의 낮은 증식억제율을 보였고, 1~50mg/mL의 농도를 처리했을 경우에는 68.5~70.8%의 유사한 증식 억제율을 나타내었으며, 그 이상의 농도에서는 억제효과가 감소하는 것으로 나타났다. 간암 세포주인 SK-Hep-1에 대한 세포독성 실험결과 능이버섯의 암세포 증식 억제율은 HeLa에서 보였던 능이버섯의 증식 억제율과 비슷한 경향을 나타냈다. 즉, 저 농도 0.01mg/mL에서는 18.5%의 증식 촉진효과를 나타냈으며 0.1~5 mg/mL의 농도처리 시 농도 의존적으로 증식 억제율이 42.5%까지 증가하였으나 그 이상의 농도처리 시에는 감소하는 경향을 보였다. 영지버섯의 새로운 약효성분의 개발에 관한 보고에서 Bok 등(1994)은 간암세포 Sk-Hep-1에 대한 MTT assay 결과 100 ug/mL의 농도에서 중성분확인 클로로포름층의 세포 증식억제효과가 90.4%로 가장 높다고 보고하였으나 본 실험에서 사용한 능이버섯 추출물의 경우 전혀 놓축되지 않은 시료를 사용하여 1~5 mg /mL 농도에서 A549 및 HeLa, AGS세포에 대해 약 50~80% 정도의 세포 증식억제 효과를 나타내 영지버섯과 같이 특정성분을 추출, 정제하여 좀더 상세한 연구가 진행될 경우 강한 세포 독성을 나타낼 것으로 판단된다.

### 돌연변이원성

능이버섯 추출물에 의한 돌연변이원성 유무를 확인해 본 결과는 다음과 같다. *Salmonella typhimurium* TA98에 대한 능이버섯 추출물의 돌연변이원성을 실험한 결과는 Fig. 5와 같이 자연돌연변이수인  $54.3 \pm 2.3$ 에 비해서 능이버섯 추출물의 첨가농도가 증가할수록 histidine positive revertant colony의 수도 증가하여 2.5 uL/plate에서는  $123.0 \pm 5.1$ , 5 uL/plate에서는  $125.0 \pm 7.0$ , 10 uL/plate에서는  $167.3 \pm 2.6$  개의 colony를 나타내  $p < 0.05$  이상의 수준에서 유의차 있게 2배 이상 증가함을 알 수 있었다. 또한, *Salmonella typhimurium* TA 100의 돌연변이원성 결과에서도 자연 돌연변이수  $48.5 \pm 9.7$ 보다 모든 농도에서 histidine positive revertant colony의 수가  $p < 0.01$  수준에서 유의차 있게 2배 이상 증가함을 알 수 있었다. 따라서, 능이버섯 추출물은 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100에 대한 돌연변이원성이 존재하는 것으로 확인되었다. Bae와 Lee(2000)는 능이버섯 추출물을 이용하여 돌연변이원성 유무를 확인한 결과 시료자체에 의한 돌연변이원성은 존



**Fig. 5. Reverse mutation test of 40% ethanol extracts of *Sarcodon aspratus* in *Salmonella typhimurium* TA 98 (■) and TA 100(□).**

The values are mean±S.D. of 4 replications. Significantly different from control at \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  by Student's t-test.

재하지 않는다고 보고하였는데, 이는 항돌연변이 실험결과에서 추출용매에 따른 억제효과가 각각 달리 나타난 것과 비교해 볼 때, 돌연변이원성의 차이는 능이버섯의 전조상태, 추출용매와 처리 농도 차이, 혹은 보관방법 등에 영향을 받았을 것으로 사료된다.

### 요약

천연물 유래 생활습관병의 예방 및 치료에 유용한 성분을 함유하고 있는 소재를 탐색하고자 능이버섯 추출물의 생리활성을 확인하였다. 능이버섯 추출물의 nitrite 제거활성은 pH 1.2에서 강한 활성을 보였으며, 농도 의존적으로 활성이 증가하였고, 0.5 mg/mL 처리 시 저해활성이  $99.85 \pm 3.05\%$ 로 대조구로 사용한 vitamin C(0.1 mg/mL)의  $99.18 \pm 0.31\%$ 과 유사하였다. 전자공여활성 역시 농도 의존적으로 증가하였으며, 0.1 mg/mL에서  $90.42 \pm 0.54\%$ 로 가장 우수하게 나타났고, 0.05 mg/mL에서도  $61.08 \pm 1.38\%$ 으로 높게 나타났다. 대조구로 사용한 0.1 mg/mL의 vitamin C는 95.36%, vitamin E는 92.56%, BHT는 49.55로 나타났다. 또한 능이버섯 추출물의 항산화 활성은 0.05 mg/mL 이상의 농도에서 유의차( $p < 0.001$ ) 있게 항산화 활성이 존재하였으며, 특히 1 mg/mL 농도에서는 합성항산화제인 BHT보다 강한 항산화력을 나타냈다. 능이버섯 추출물의 SOD유사활성은  $3,250 \pm 51$  unit/g로 나타났으며, 혈전 용해활성은 표준시료인 Streptokinase(제일제당)의 1,180 unit/g보다 높은 1,843.8 unit/g의 활성을 보였고, ACE저해활성은 통상법에서  $52.89 \pm 1.93\%$ 와 전처리법에서  $57.63 \pm 0.61\%$ 로 높게 나타났다. 암세포에 대한 능이버섯 추출물의 세포독성에서, 폐암 세포주인 A549에 대한 증식 억제율은 능이버섯 추출물 50 mg/mL 처리 시  $84.71 \pm 2.97\%$ 로 가장 높게 나타났고, 자궁암 세포주인 HeLa의 세포독성은

1~50 mg/mL 농도에서 40% 이상의 증식 억제효과를 나타냈으며, 위암 세포주인 AGS의 경우 5~50 mg/mL에서 약 70%의 높은 증식 억제율을 나타냈다. 간암세포주인 SK-Hep-1에 대한 능이버섯 추출물의 세포독성은 0.1~5 mg/mL까지는 증식 억제율이 증가하였으나 42.53% 수준이었다. Ames test를 이용한 돌연변이원성 실험결과 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100의 자연 돌연변이수에 비해 능이버섯 추출물 처리 시 2배 이상의 histidine positive revertant colony가 형성되어 돌연변이 유발성이 있음을 확인하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2001-005-G00005)에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Astrup, T. and Mullertz, S. (1952) The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs. Biochem. Biophys.* **40**, 346-352.
- Bae, J. T. and Lee, K. R. (2000) Antimutagenic and DNA topoisomerase I inhibition effects of *Sarcodon aspratus* extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 917-921.
- Beaucham, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase : Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276-287.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*. **181**, 1199-1120.
- Bok, J. W., Lee, S. K., and Kim, B. K. (1994) Studies of development of new pharmacologically active components of *Ganoderma lucidum*. *Korean Biochem. J.* **27**, 149-153.
- Carmichael J. W. G., DeGraff, A., Gazdar, J. M. and Mitchell, J. B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay. Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Choi, N. S., Seo, S. Y., and Kim, S. H. (1999) Screening of mushrooms having fibrinolytic activity. *Kor. J. Food sci. Technol.* **31**, 553-557.
- Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* **20**, 1637-1648.
- Eun, J. S., Yang, J. H., Cho, D. Y., and Lee, T. K. (1988) Studies on higher fungi in Korea(1) : Activity of proteolytic enzyme from *Sarcodon aspratus*. *J. Kor. Pharm. Sci.* **18**, 125-131.
- Jeong, O. J., Yoon, H. S., and Min, Y. K. (2001) Aroma characteristics of neungee (*Sarcodon aspratus*). *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**, 307-312.
- Jung, I. C. and Lee, J. S. (1998) Antioxidative effect of mycium-free culture broth extracts of *Pleurotus ostreatus*. *J. Korean Soc. Hygienic Sciences* **5**, 19-24.
- Kang, H. C., Yun, B. D., Yu, S. H., and Yoo, I. C. (2000) Chemical structure of the compounds isolated from the mushroom *Sarcodon asparatus*. *Can. J. Chem.* **65**, 2369- 2372.
- Kang, W. S., Kim, J. H., Park, E. J., and Yoon, K. R. (1998) Antioxidative property of tumeric (*Curcumae Rhizoma*) ethanol extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 266-271.
- Kang, Y. H., Park, Y. K., and Lee, G. D. (1996) The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 232-239.
- Kato, H., Lee, I. E., Chuyen, N. V., Kim, S. B., and Hayase, F. (1987) Inhibition of nitrosamine formation by nondialyable melanoidins. *Agri. Bio. Chem.* **51**, 1333-1338.
- Kazun, C., Nishijima, M., Miura, H., and Kamoi, I. (1990) Structural examination of water soluble glycans from fruit body of *Lyophyllum ulmarium*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **37**, 765-772.
- Kiharu, I., Miho, I., and Toshimi, H. (1990) Major antioxidative substances in leaves of atsumi-kabu. *Agric. Bio. Chem.* **54**, 1053-1055.
- Kim, B. K., Shin, M. J., Kim, O. N., Kim, H. W., and Choi, E. C. (1989) Antitumor components of the cultured mycelia of *Lepiota procera*. *Kor. J. Food Hygiene* **4**, 109-118.
- Kim, J. H. and Park, K. M. (2000) Nitrite scavenging and superoxide dismutase like activities of herbs, spices and curries. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 706-712.
- Kim, S. M., Cho, Y. S., and Sung, S. K. (2001) The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**, 626-632.
- Lee, J. S. (2002) Studies on the physiological activity of instant curries and curry raw materials. *MS thesis*,

- Sungkunkwan Univ., Suwon, Korea.
- 22. Lee, M. J., Park, S. K., Kim, J. K., Choi, D. Y., and Kim, C. H. (1990) Antioxidant and scavenging activity of water-extract from *Phellodendron amurense* Rupr. *Korean J. Oriental Medical Pathology* **13**, 112-118.
  - 23. Lucas, E. H. and Ringler, R. L. (1957) Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other holobasidomycets. *Antibiotics and Chemotherapy* **7**, 1-4.
  - 24. Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**, 173-215.
  - 25. Min, Y. K., Jeong, O. J., Park, J. E., and Jeong, H. S. (2002) Changes in aroma characteristics of neungee( *Sarcodon aspratus*) during drying period. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 780-786.
  - 26. Mizuno, T., K. Ohsawa., N. Hagiware., and Kuboyama. R. (1986) Fractionation and characterization of anitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 1679-1688.
  - 27. Park, S. W., Yu, K. H., and Min, T. J. (1998) Antioxidant activities of extracts from fruiting bodies of mushrooms. *Korean. J. Mycology* **26**, 69-77.
  - 28. Park. Y. J., Kang, M. H., Kim, J. I., Park, O. J., Lee, M. S., and Jang, H. D. (1995) Changes of vitamin C and SOD-like activity of persimmon leaf tea by processing method and extraction condition. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 281-285.
  - 29. Some, Y., Okuda, R., Wade, N., Kishida. E., and Misaki, A. (1989) Comparisons of protein-bound polysaccharide contents obtained from mycelia cultured broth and fruit body of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Appl. Mycol.* **17**, 223-228.
  - 30. Usui, T., Iwasaki, Y., and Mizuno, T.(1983) Isolation and characterization of antitumor B-D-glucans the fruit body of *Ganoderma applanatum*. *Carbohydr. Res.* **15**, 273-280.
  - 31. Youn, D. M., Lee, T. G. Byun, H. S., Kim, S. B., and Park, Y. H. (1992) Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein. *Bull. Korean Fish. Soc.* **23**, 229-235.

---

(2003. 3. 4. 접수 ; 2003. 4. 25. 채택)