

상황미를 이용한 항로타바이러스 효과와 항균성 측정에 관한 연구

송진옥* · 신희철¹ · 김용휘²

중부대학교 원격대학원 과학기술교육학과, ¹(주)조은식품, ²중부대학교 호텔외식산업학과

Studies on the Anti-rotaviral and Anti-bacterial Effects of *Phellinus linteus* Mushroom Rice

Jin-Ook Song, Hee-Chul Shin¹, and Yong-Hui Kim²

Department of Science & Technology Education, Cyber Graduate School, Joongbu University, Chungnam 312-702, Korea

¹Choeunfoods Co., Ltd., Paju 413-749, Korea

²Department of Hotel & Foodservice Industry, Joongbu University, Chungnam 312-702, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the inhibitory effects of *Phellinus linteus* mushroom rice on food-borne pathogens (*Staphylococcus aureus* 305, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Escherichia coli* 0157:H7 ATCC 42894, *Escherichia coli* O55) and human rotavirus (KU, S2, YO, K-21). The results obtained are summarized as follows: The inhibitory effects of *Phellinus linteus* mushroom rice against food-borne pathogens; inhibition zone diameters for *S. aureus* 305, *L. monocytogenes* ATCC 19114 and *E. coli* 0157:H7 ATCC 42894 were 18 mm, 20 mm and 13mm, respectively. *E. coli* O55 did not form an inhibition zone. The inhibitory effects of 1/3% *Phellinus linteus* mushroom rice on MA-104 cells using the MTT assay were, KU 90.52±18.42%, S2 94.74±8.68%, YO 59.77±8.68% and K-21 97.56±12.50%. *Phellinus linteus* mushroom rice has inhibitory effects on the food-borne pathogens *S. aureus* 305, *L. monocytogenes* ATCC 19114 and *E. coli* 0157:H7 ATCC 42894, and human rotavirus (K-21, S2, YO, KU).

Key words : *Phellinus linteus* mushroom rice, rotavirus, MTT assay

서 론

상황버섯(*Phellinus linteus*)의 자실체 열수 추출물은 소화기 계통의 암에 저지효과(Ikekawa *et al.*, 1968)가 있다고 알려지면서 많은 연구가 진행되어 면역(Song *et al.*, 1998), 항암활성(Kwon *et al.*, 2003; Lee and Bang, 2001; Rhee *et al.*, 2000) 및 항산화 활성(Kim *et al.*, 2006), 항돌연변이원성(Lee and Bang, 2001; Ji *et al.*, 2000), 항고혈압효과(Lee *et al.*, 2006) 등 상황버섯의 다양한 생리활성이 보고되어 있다. 상황버섯의 열수 추출물이 B 면역세포기능을 증가시키고, 상황버섯에서 추출된 다당체가 체액성 및 세포성 면역반응을 항진시킨다(Kim *et al.*, 1999)는 연구보고도 있어 민간에서 많이 사용되고 있다.

*Phellinus linteus*은 항암활성이 높은 것으로 보고된 이래 많은 관심의 대상이 되고 있다. 버섯유래의 고분자 다당류들의 항암 및 면역 증강효과 등의 약리활성을 나타내는 물질은 특이적 구조를 갖는 β -glucan성 다당류로 알려졌다. 이들은 공히 β -1,3-glucan을 주쇄로 하여 β -1,6-glucan이 끝가지로 연결되어 있는 형태로 유지하는 것으로 보고되었다. *Lentinus edodes*로부터 분리한 다당류인 lentinan의 평균 분자량은 400-800 kD으로써 주사슬은 β -1,3-glucopyranoside이고 β -1,6-의 branch를 갖는 구조이며, X선 및 NMR에 의해 3중 나선구조를 갖는 물에 난용성인 물질임을 보고하였다(Chihara *et al.*, 1969).

본 연구는 상황버섯 균사체에 현미를 배양 재배한 상황미에서 열탕 추출한 추출분말을 이용하여 식중독균(*Staphylococcus aureus* 305, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 42894, *Escherichia coli* O55)과 유아 설사를 유발하는 human rotavirus(KU, S2, YO and K-21)에 대한 그 저해 효과를 규명함으로써, 병원성 식중독균 및 human rotavirus로 인

*Corresponding author : Jin-Ook Song, Department of Science & Technology Education, Cyber Graduate School, Joongbu University, #101 Daehak-Ro, Chubu-Myun, Kumsan-Kun, Chungnam 312-702, Korea. Tel: 82-41-750-6717, Fax: 82-41-752-3255, E-mail: jinook@joongbu.ac.kr

한 질병 및 설사증에 대한 상황미의 효과를 알아보고 기능성 식품 및 산업 소재로서의 개발을 위한 기초적 자료를 제공하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시 재료

본 실험에 사용된 상황미는 상황버섯 균사체를 현미찰에 배양하여 분말 상태로 생산한 것을 (주)비아이지에서 공급 받아 냉암소에 보관하면서 사용하였다.

공시 균주

시험균주로 *S. aureus* 305, *L. monocytogenes* ATCC 19114, *E. coli* O157:H7 ATCC 42894, *E. coli* O55를 사용하였다. -72°C에서 동결보관 중인 시험균주는 혈액배지 (Blood agar, Comed)에서 37°C/24 hr 배양하여 계대배양 후 사용하였다.

항균효과 측정

원통컵 방법(Hufford *et al.*, 1975)을 응용한 EPS의 *S. aureus* 305, *L. monocytogenes* ATCC 19114, *E. coli* O157:H7 ATCC 42894와 *E. coli* O55에 대한 항균효과의 측정 은 Muller-hinton agar(Difco, USA)위에 시험균액을 도말한 후 원통컵을 평판배지 위에 놓고 현탁 상황미(35 mg/mL)를 280 µL 떨어뜨린 다음 37°C에서 24시간 배양한 후 균이 증식하지 못한 clear zone의 직경에 따라 항균효과의 정도를 측정하였다.

공시 rotavirus

본 실험에 사용된 rotavirus로서 표준 human rotavirus는 일본 사뵤로 의과대학에서 분양받은 S2, YO, KU와 국내 영아에게서 분리동정한 K-21(Cha *et al.*, 1999)을 사용하였다.

공시 세포

Rotavirus를 증식시키기 위해 사용된 MA-104 세포의 계대배양은 Feng 등(1994)의 방법에 따라 시행하였다. 조직 배양용 75 cm² 크기의 T-flask를 이용하여 5% 농도의 CO₂를 공급한 37°C 배양기(Johnsam, Korea)에서 5일 동안 배양한 후, MA-104 세포의 단층이 형성되면 멸균된 생리적 식염수(0.85%-NaCl)로 2번 세척하고, 10배 희석된 0.25%-

trypsin EDTA(GIBCO, USA)로 세포를 분리시켰다. 56°C에서 20분간 불활성화시킨 7% 어린 송아지 혈청(fetal bovine serum; Hyclone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA)과 1%-L-glutamin penicillin streptomycin(L-GPS : Irvine Scientific, Santa Anna, CA, USA)이 첨가된 M199를 첨가하여 75 cm² 크기의 T-flask에 세포를 분주시킨 후 세포를 계대배양하여 사용하였다.

Rotavirus 배양

공시 rotavirus를 Chiarini 등(1983)의 방법에 따라서 배양하였다. 0.2%-acetylated trypsin(10 µL/mL)을 넣어 5% 농도의 CO₂를 공급한 37°C 배양기에서 30분 동안 활성화시켰고, MA-104 세포의 단층이 형성된 25 cm² 크기의 T-flask는 무혈청 M199로 2번 세척하여 미리 활성화시킨 바이러스를 넣어, 37°C 배양기에서 1시간 동안 흡착시킨 후, mL당 trypsin 1 µL가 함유된 무혈청 M199를 3 mL 첨가하여 flask에 넣고 5% 농도의 CO₂를 공급한 37°C 배양기에서 배양하였다. 배양 중 현미경으로 세포변성 효과(CPE : Cytopathic Effect)를 관찰하면서 세포변성 효과가 완전히 일어났을 때 -80°C 동결과 상온 해동을 3번 반복하여 바이러스를 수확한 후 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

Rotavirus의 역가분석

Rotavirus의 역가분석은 Ruggeri와 Greenberg(1991), Kaljot 등(1988)의 방법에 따라 수행하였다. 바이러스는 mL당 0.2% trypsin 5 µL를 첨가하여 37°C 배양기에서 30분간 활성화시킨 후 무혈청 M199로 10¹에서 10⁸까지 희석하였고, MA-104 세포의 단층이 형성된 6 well plate는 무혈청 M199로 2번 세척 후 희석한 바이러스 액을 각 well에 0.5mL씩 넣어 5% 농도의 CO₂를 공급한 37°C 배양기에서 1시간 동안 흡착시켰다. 그 다음 1.1% agarose(Seakem ME agarose; FMC Corp)를 용해시켜 2배 농도의 M199를 1:1로 섞고 37°C로 낮아졌을 때 각 well에 남아있는 바이러스를 피펫으로 제거한 후 agarose가 첨가된 배지 4 mL씩 중층하여 37°C 배양기에서 6일간 배양하였다. 배양 후 neutral red(GIBCO, USA)를 무혈청 M199와 1:20으로 희석한 다음 1mL씩 각 well에 넣어 배양기에서 7시간 동안 염색하여 plaque forming unit(PFU)를 계수하였다.

Anti-rotavirus 효과

Anti-rotavirus 효과는 MTT(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-

Table 1. List of rotavirus strains used in this study

Strains of rotavirus	Host species	G serotype	P serotype	Source
KU	Human	G1	P1A	Sapporo Univ., Japan
S2	Human	G2	P1B	Sapporo Univ., Japan
YO	Human	G3	P1A	Sapporo Univ., Japan
K-21	Human	G1	P1A	Cha <i>et al.</i> (1999)

2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay(Weber *et al.*, 2003) 방법을 응용하여 MA-104 세포를 96-well plate의 각 well에 200 μ L씩 넣고 5일 동안 배양하고 해동된 바이러스 100 μ L에 0.2%-trypsin 1 μ L를 넣은 후 37°C 배양기에서 30분 동안 활성화시켰으며 0.25 μ L의 trypsin이 첨가된 M199 30 mL을 준비하여 활성화된 바이러스 300 μ L를 넣어 실험에 이용하였다. 96-well plate에서 MA-104 세포의 단층이 형성된 세포는 무혈청 M199로 2번 세척하였고 바이러스를 100 μ L씩 각 well에 넣었다. 이때 1/3%-현탁 상황미를 계속적으로 2진 희석법으로 희석하여, 각 농도의 현탁 상황미 50 μ L를 바이러스 100 μ L에 혼합한(최종농도 1/3%-1/384%) 후 5% 농도의 CO₂를 공급한 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 감염된 세포에 well당 0.2%-MTT를 50 μ L첨가한다. 부드럽게 흔들어준 후 5% 농도의 CO₂를 공급한 37°C 배양기에서 4시간 정치시켰다. 4시간 정치 중 formazan이 침전되면, 상등액을 제거하고, DMSO 150 μ L를 첨가한 후 가볍게 진탕하여 짙은 청색의 결정체인 formazan을 용해시켰다. Formazan이 완전히 용해되면 ELISA plate reader(Model: EL311, Bio-TEK Instruments, USA)로 570 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다. 상황버섯의 RV 감염 억제효과는 상황버섯

를 첨가하지 않은 rotavirus에 감염된 세포군과 rotavirus를 첨가하지 않은 비감염 대조 세포군의 OD값을 기준으로 하여 상황버섯 농도별 감염 세포군의 OD값과 비교하여 억제율을 결정하였다.

결과 및 고찰

원통컵 방법에 의한 항균효과

원통컵 방법을 이용한 상황미 추출물의 *S. aureus* 305, *L. monocytogenes* ATCC 19114, *E. coli* O157:H7 ATCC 42894와 *E. coli* O55에 대한 항균 효과는 Table 2에 나타내었다. 그 결과 *Staphylococcus aureus* 305(18 mm), *L. monocytogenes* ATCC 19114(20 mm), *E. coli* O55(13 mm)에서는 inhibition zone이 형성되었으나 *E. coli* O157:H7 ATCC 42894에는 inhibition zone이 형성되지 않았다 (Fig. 1, Table 2).

Rotavirus의 역가 측정

실험에 사용된 rotavirus의 역가는 KU는 2.8×10^7 PFU/mL, S2는 2.6×10^7 PFU/mL, YO는 1.8×10^7 PFU/mL, K-21은 1.8×10^7 PFU/mL를 각각 나타내, 억제능력을 측정하기

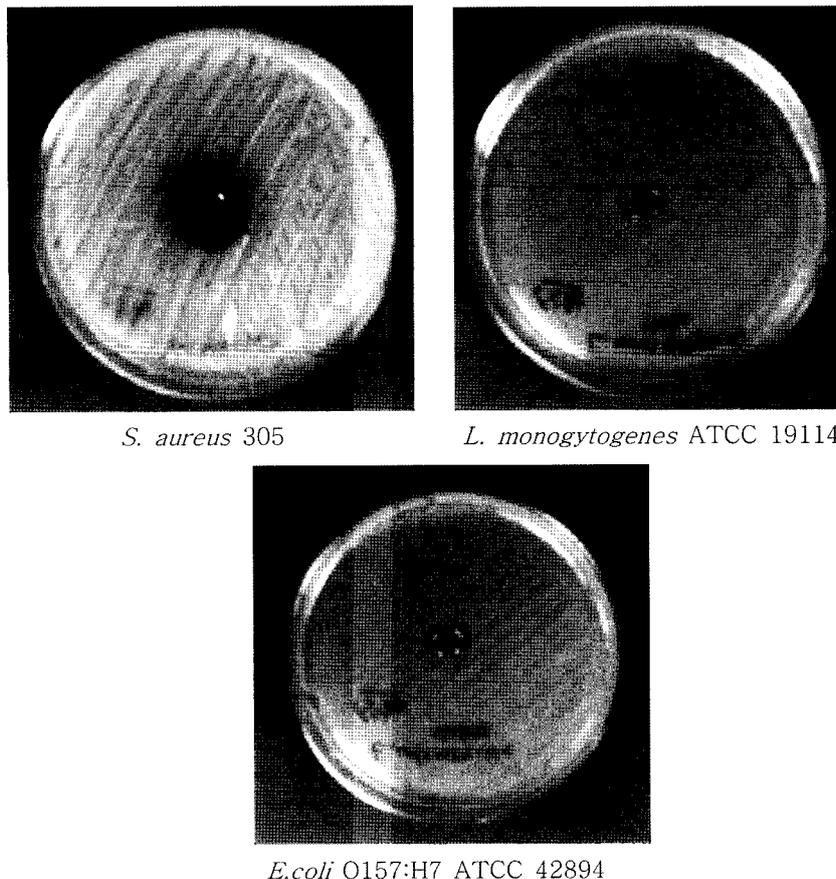


Fig. 1. Antibacterial effects of *Phellinus linteus* mushroom rice against pathogens by cup test.

Table 2. Antibacterial effects of *Phellinus linteus* mushroom rice against pathogens by cup test

Pathogens	Inhibition zone (mm)
<i>S. aureus</i> 305	18
<i>L. monogytogenes</i> ATCC 19114	20
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 42894	13
<i>E. coli</i> O55	-

위한 기본적인 활력을 갖춘 것으로 나타났다.

KU 감염 억제 효과

상황미 추출물의 농도별 KU의 세포 감염 억제 효과를 Table 3과 Fig. 2에 나타내었다. KU에 대한 상황미 추출물의 감염 억제 효과는 가장 높은 농도인 1/3%일 때 $90.52 \pm 18.42\%$ 로 가장 높게 나타났고, 1/12%, 1/48%와 1/192%일 때 세포 감염 억제 효과는 각각 $77.97 \pm 12.53\%$, $18.29 \pm 11.94\%$ 와 $9.45 \pm 16.85\%$ 로 나타났으며, 가장 낮은 농도인 1/384%에서 가장 낮은 $10.40 \pm 7.63\%$ 의 세포 감염 억제 효과를 나타내어 상황미 추출물의 농도가 낮아질수록 rotavirus 감염 억제 효과도 낮아짐을 알 수 있었다.

S2 감염 억제 효과

상황미 추출물의 농도별 S2의 세포 감염 억제 효과를 Table 4와 Fig. 3에 나타내었다. S2에 대한 상황미 추출물의 감염 억제 효과는 1/48% 및 1/24%에서 각각 $0.64 \pm 9.63\%$, $20.27 \pm 2.23\%$ 로 감염 억제율이 낮았으나 1/12%, 1/6%, 1/3%에서는 각각 $86.58 \pm 19.30\%$, $96.72 \pm 6.57\%$, $94.74 \pm 8.68\%$ 의 매우 높은 억제율을 보였다.

YO 감염 억제 효과

상황미 추출물의 농도별 YO의 세포 감염 억제 효과를 Table 5와 Fig. 4에 나타내었다. YO에 대한 상황미 추출물의 감염 억제 효과는 가장 높은 농도인 1/3%일 때 $59.77 \pm 8.68\%$ 로 가장 높게 나타났고, 1/12%, 1/48%와 1/192%일 때 세포 감염 억제 효과는 각각 $55.17 \pm 19.30\%$,

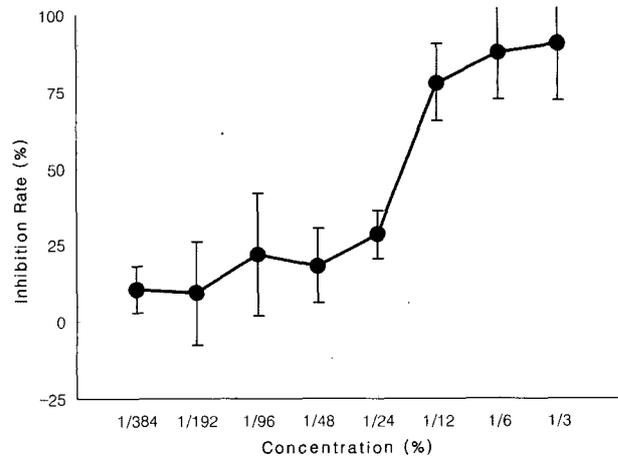


Fig. 2. Inhibitory effect of *Phellinus linteus* mushroom rice on the infection of KU in MA-104 cell.

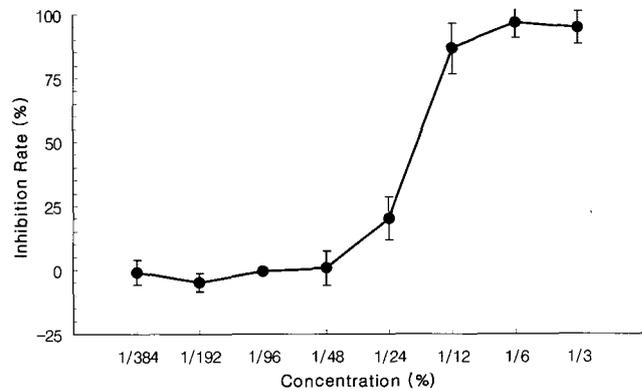


Fig. 3. Inhibitory effect of *Phellinus linteus* mushroom rice on the infection of S2 in MA-104 cell.

14.18 ± 9.63 와 $6.38 \pm 7.99\%$ 로 나타났으며, 가장 낮은 농도인 1/384%에서 가장 낮은 $9.10 \pm 10.65\%$ 의 세포 감염 억제 효과를 나타내어 사용된 다른 HRV에 비해 S2보다는 높고 KU보다는 낮은 감염 억제율을 보였다.

K-21 감염 억제 효과

상황미 추출물의 농도 별 K-21의 세포 감염 억제 효과

Table 3. Inhibitory effect of *Phellinus linteus* mushroom rice on the infection of KU in MA-104 cell

	<i>Phellinus linteus</i> mushroom rice concentration (%)							
	1/384	1/192	1/96	1/48	1/24	1/12	1/6	1/3
Inhibition rate (%)	10.40	9.45	21.75	18.29	28.35	77.97	87.70	90.52
	±7.63	±16.85	±19.92	±11.94	±7.80	±12.53	±15.19	±18.42

Table 4. Inhibitory effect of *Phellinus linteus* mushroom rice on the infection of S2 in MA-104 cell

	<i>Phellinus linteus</i> mushroom rice concentration (%)							
	1/384	1/192	1/96	1/48	1/24	1/12	1/6	1/3
Inhibition rate (%)	-0.77	-4.85	-0.38	0.64	20.27	86.58	96.72	94.74
	±10.65	±7.99	±10.91	±9.63	±2.23	±19.30	±6.57	±8.68

Table 5. Inhibitory effect of *Phellinus linteus* mushroom rice on the infection of Human rotavirus YO in MA-104 cell

	<i>Phellinus linteus</i> mushroom rice concentration (%)							
	1/384	1/192	1/96	1/48	1/24	1/12	1/6	1/3
Inhibition rate (%)	9.10	6.38	11.26	14.18	18.98	55.17	59.57	59.77
	±10.65	±7.99	±10.91	±9.63	±2.23	±19.30	±6.57	±8.68

Table 6. Inhibitory effect of *Phellinus linteus* mushroom rice on the infection of human rotavirus K-21 in MA-104 cell

	<i>Phellinus linteus</i> mushroom rice concentration (%)							
	1/384	1/192	1/96	1/48	1/24	1/12	1/6	1/3
Inhibition rate (%)	10.98	28.18	28.37	36.32	48.31	51.95	75.60	97.56
	±7.92	±12.00	±9.93	±11.61	±8.30	±8.40	±10.07	±12.50

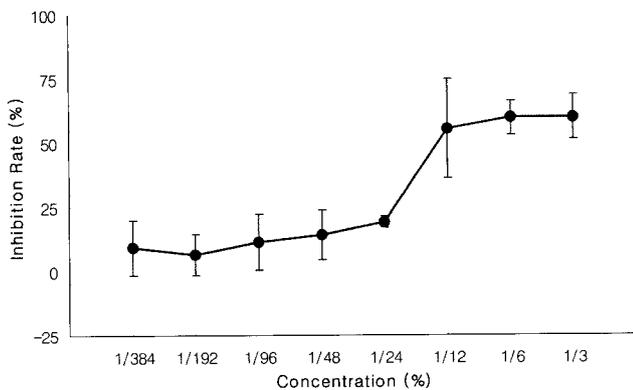


Fig. 4. Inhibitory effect of *Phellinus linteus* mushroom rice on the infection of YO in MA-104 cell.

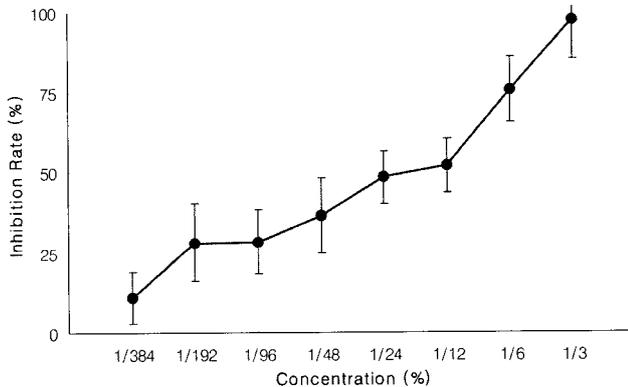


Fig. 5. Inhibitory effect of *Phellinus linteus* mushroom rice on the infection of K-21 in MA-104 cell.

를 Table 6과 Fig. 5에 나타내었다. K-21에 대한 상황미 추출물의 감염억제효과는 가장 높은 농도인 1/3%일 때 97.56±12.50%로 가장 높게 나타났고, 상황미 추출물의 농도가 1/12%, 1/48%와 1/192%일 때 세포 감염 억제 효과는 각각 51.95±8.40%, 36.32±11.61%와 28.18±12.00%로 나타났으며, 상황미 추출물이 가장 낮은 농도인 1/384%에서 가장 낮은 10.98±7.92%의 세포 감염 억제 효과를 나타내어 상황미 추출물의 농도가 낮아질수록 HRV 감염 억제 효과도 낮아짐을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 상황미 추출물을 이용하여 병원성 식중독균(*S. aureus* 305, *L. monocytogenes* ATCC 19114, *E. coli* O157:H7 ATCC 42894, *E. coli* O55)에 대한 항균효과와 human rotavirus(KU, S2, YO, K-21)에 대한 억제효과를 알아보기 위해서 수행되었다. 그 결과는 다음과 같다.

항균성 테스트에서 *S. aureus* 305는 18 mm, *L. monocytogenes* ATCC 19114는 20 mm, *E. coli* O55는 13 mm의 inhibition zone이 생성되었으나, *E. coli* O157:H7 ATCC 42894는 inhibition zone이 생성되지 않았다. MTT assay 방법에 따라 실시한 1/3% 상황미 추출물의 human rotavirus에 대한 억제효과는 K-21이 97.56±12.50%, S2가 94.74±8.68% YO가 59.77±8.68%, KU가 90.52±18.42%로 각각 나타났다. 이러한 결과로 보아 상황미 추출물은 병원성 식중독균과 다양한 유아 rotavirus 모두에게 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다.

참고문헌

1. Cha, K. J., Yu, D. Y., Lee, C. K., and Yu, J. H. 1999. Effect of bovine and human lactoferrin on MA 104 cell infected with human rotavirus. *J. Kor. Soc. Virol.* **29**, 87-99.
2. Chiarini, A., Arista, S., Giammanco, A., and Sinatra, A. 1983. Rotavirus persistence in cell culture: select of resistant cells in the presence of fetal calf serum. *J. Gen. Virol.* **64**, 1101-1110.
3. Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T., and Fukuoka, F. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Nature* **222**, 687-688.
4. Feng, N., Burns, J. W., Bracy, L., and Greenberg, H. B. (1994) Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous rotavirus. *J. Virol.* **68**, 7766-7773.
5. Hufford, C. D., Funderburk, J. M., Morgan, J. M., and Robertson, L. W. 1975. Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. *J. Pharm. Sci.* **64**, 789-

- 792.
5. Ikegawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N. and Chihara, G. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann* **59**, 155-157.
 6. Ji, J. H., Kim, M. N., Chung, C. K., and Han, S. S. 2000. Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 322-328.
 7. Kaljot, K. T., Shaw, R. D., Rubin, D. H., and Greenberg, B. H. 1988. Infectious rotavirus enters cells direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* **62**, 1136-1144.
 8. Kim, I. H., Jin, E. J., and Lee, J. H. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of cambodian mushroom. *Phellinus linteus*. *Environ. Mut. Carcin.* **26**, 41-44.
 9. Kim, Y. S., Park, K. S., Park, H. K., and Kim, S. W. 1999. Compositional sugar analysis of antitumor polysaccharides by HPLC and GC. *Arch. Pharm. Res.* **17**, 337-342.
 10. Kwon, S. H., Kim, C. N., Kim, C. Y., Kwon, S. T., Park, K. M., and Hwangbo, S. 2003. Antitumor activities of protein-bound polysaccharide extracted from mycelia of mushroom. *Korean J. Food Nutr.* **16**, 15-21.
 11. Lee, J. W. and Bang, K. W. 2001. Biological activity of *Phellinus* spp.. *Food Ind. Nutr.* **6**, 25-33.
 12. Lee, K. H., Kwon, H. J., Chun, S. S., Kim, J. H., Cho, Y. J., and Cha, W. S. 2006. Biological activities of extracts from *Phellinus linteus*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 298-303.
 13. Rhee, Y. K., Han, M. J., Park, S. Y., and Kim, D. H. 2000. In vitro and in vivo antitumor activity of the fruit body of *Phellinus linteus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 477-480.
 14. Ruggeri, F. M. and Greenberg, H. B. 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide Vp8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J. Virol.* **65**, 2211-2219.
 15. Song, C. H., Ra, K. S., Yang, B. K., and Jeon, Y. J. 1998. Immuno-stimulating activity of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Micol.* **26**, 86-90.
 16. Weber, J. M., Ruzindana-Umunyana, A., Imbeault, L., and Sircar, S. 2003. Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. *Antiviral Res.* **58**, 167-173.

(2007. 5. 4. 접수/2007. 8. 1. 채택)