

목질진흙 (상황)버섯의 면역활성

송치현* · 니경수¹ · 양병근 · 전용재

대구대학교 공과대학 생물공학과, ¹대구공업전문대학 식품영양학과

Immuno-stimulating Activity of *Phellinus linteus*

Chi-Hyun Song*, Kyung-Soo Ra¹, Byung-Keun Yang and Yong-Jae Jeon

Department of Biotechnology, Taegu University, Kyongsan, Kyungbuk, 712-714

¹Department of Food and Nutrition, Technical Junior College, Taegu City 704-350, Korea

ABSTRACT: Anti-complementary (immuno-stimulating) activities of the polymers produced from submerged mycelial culture, natural and artificially cultivated basidiocarps of *Phellinus linteus* were compared. Activity (ITCH₅₀) of polymer extracted from natural and artificial cultivated basidiocarps of *P. linteus* was 65.77% and 63.94%, respectively, which is not significant difference. However, the activities which were significantly low were found from endo-polymer (41.95%) and exo-polymer (21.87%) produced by submerged culture of *P. linteus*.

KEYWORDS: Anti-complementary activity, Endo-polymer, *Phellinus linteus*

면역계를 자극하여 항암효과나 숙주 저항에 영향을 미치는 면역증강물질에 대한 연구가 고등식물 (higher plant), 고등균류 (higher fungi), bacteria, 조류 (algae) 등으로부터 조사되어져 왔다 (Franz, 1989). 이 중에서도 특히 버섯류 (basidiomycetes)로부터 생산된 다당체에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. Ikekawa 등 (1968)에 의하여 polyporaceae (말굽버섯과)를 위시하여 식용균류의 자실체를 열수 추출하여 얻은 extract가 sarcoma 180 등의 동물 이식암에 대하여 숙주 중개성이 현저한 항종양 활성이 있는 것이 발견되었다. 일례로 표고버섯으로부터 Lentinan (Chihara 등, 1970), 치마버섯으로부터 Schizophyllan (Tabata 등, 1981), 운지로부터 Krestin (Tsukagoshi와 Ohashi, 1974), 상황버섯으로부터 Meshima (Han 등, 1995)와 같은 다당체는 현재 항암 및 면역요법제 등으로 널리 사용되어지고 있다.

Phellinus linteus (상황버섯 또는 목질진흙버섯)의 자실체 열수추출물은 소화기 계통의 암에 저지 효과 (Ikekawa, 1968)와 간암, 환자절제 수술 후 화

학요법 병용에 의한 면역기능 향진이 있는 것으로 나타나 많은 연구가 진행되어 왔으며, 균사체 배양 추출물로부터 면역 활성 (Lee 등, 1996) 및 항암 활성 (정 등, 1993)도 입증되었다. 상황버섯에서 추출된 다당체의 항종양작용에 대한 기작은 확실히 밝혀지지 않았으나, 이들이 주로 macrophage나 complement system 등의 면역체계를 활성화시켜 항종양 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Suzuki 등, 1989). 특히, Okuda 등 (1973)은 항종양활성과 serum hemolytic activity의 손실이 밀접한 관계가 있음을 입증하여, 보체계 성분의 활성화가 항종양 작용에 관여함을 관찰하였다.

자연산 상황버섯은 가격이 상당히 비싸며 품질도 균일하지 않기 때문에 이 버섯의 인공재배 필요성이 대두 되어 왔던 바, 근래에 인공재배에 성공하여 활용 가능성이 증대되고 있다 (Song 등, 1997). 따라서, 본 연구에서는 인공배양으로 얻어진 상황버섯 자실체와 자연에서 채취한 자실체로부터 추출한 다당체의 면역활성을 비교하고, 액체배양에 의하여 생산된 균체외다당 (exo-polymer)과 균체내다당 (endo-polymer)의 면역활성을 anti-complementary activity assay로 비교하였다.

*Corresponding author

재료 및 방법

실험균주 및 배지

자실체의 인공배양에 사용된 *Phellinus linteus* 는 강원도 홍천에서 채취하여 순수분리하고 동정하였다(Song 등, 1997).

종근보관용 배지로는 potato dextrose agar (Difco)를 사용하였으며, 다당체 생산용 배지의 조성은 Galactose 1 g/l, Sucrose 9 g/l, Xyrose 1 g/l, Glucose 9 g/l, Yeast extract 0.5 g/l, Peptone 2 g/l, Patato dextrose broth 2 g/l, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5 g/l, DL-Serine 0.5 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, CaCl_2 0.6 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/l, Thiamin HCl 1×10^{-4} l이었으며, pH는 4.5로 조절하였다.

자실체 배양을 위한 종근배지로는 참나무 톱밥에 미강 10%를 첨가하여 고압멸균한 것을 사용하였으며, 인공재배를 위한 원목은 뽕나무를 기질로 사용하였다(Song 등, 1997).

자실체 생산을 위한 상황버섯의 인공배양

균사체배양 최적온도는 25~30°C이었으나 초기에는 잡균의 발생을 최소화하기 위하여 21~22°C로 배양하다가 25~30일 후 균사체가 원목 전체표면에 활착되어 생장이 시작될 때 부터는 최적온도인 25°C를 유지하였다. 원목의 굵기에 따라 약간의 차

이는 있으나 균사체의 색이 황갈색을 띄우다가 검은색으로 변하기 시작하였을 때(약 2~3개월) 자실체 생장을 위하여 polypropylene bag을 해체하고 재배사로 옮겨심기 작업을 하였다. 배양실에서 균사체 배양이 완료된 원목은 윗 표면에 접종원으로 사용한 종균을 완전히 제거한 후 충분히 관수하고 토양에 옮겨 심을 때 지상부로 5~7 cm 정도를 돌출시켜 매몰하여 종균접종을 하였던 상층부에 모래를 얇게 깔아 습도유지와 측면의 버섯발생을 유도하였다(Song 등, 1997).

다당체 생산을 위한 균사체배양

Phellinus linteus 균사를 PDA배지를 함유한 평판배지상에서 25°C, 10일간 배양후 직경 8 mm cork bore로 punching하여 접종원으로 사용하였고, 액체 배양시에는 합성배지를 이용하여 250 ml baffled flask에서 30일간 25°C, 120 rpm에서 배양하였다.

다당체 회수

자실체를 열수추출하여 Fig. 1과 같이 다당체를 회수하였으며, 균사체 액체배양으로 부터의 다당체는 Fig. 2와 같이 회수하였다. 즉 균사체 액체 배양물을 10447×g/20 min으로 원심분리하고, 4°C에서 24시간 침전후 침전물을 원심분리하여 회수하였다. 이를 동결건조한 후 수용성 다당체를 분리하기 위해 10 mg/1 ml(DIW)를 녹여 상등액을 취하여

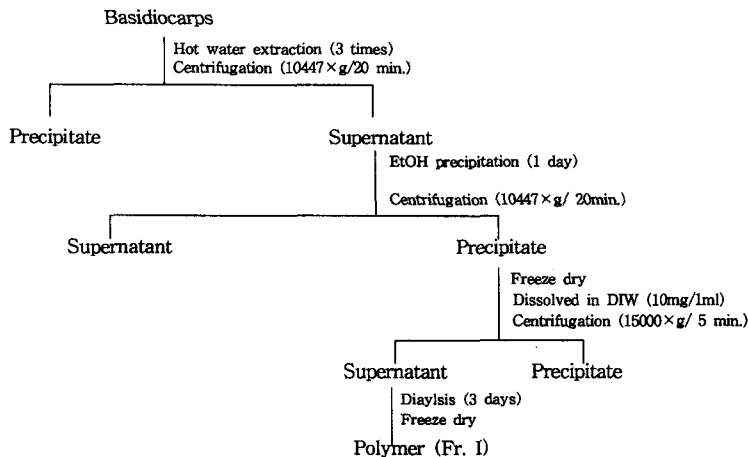


Fig. 1. Production process of polymer from the basidiocarps of *Phellinus linteus*.

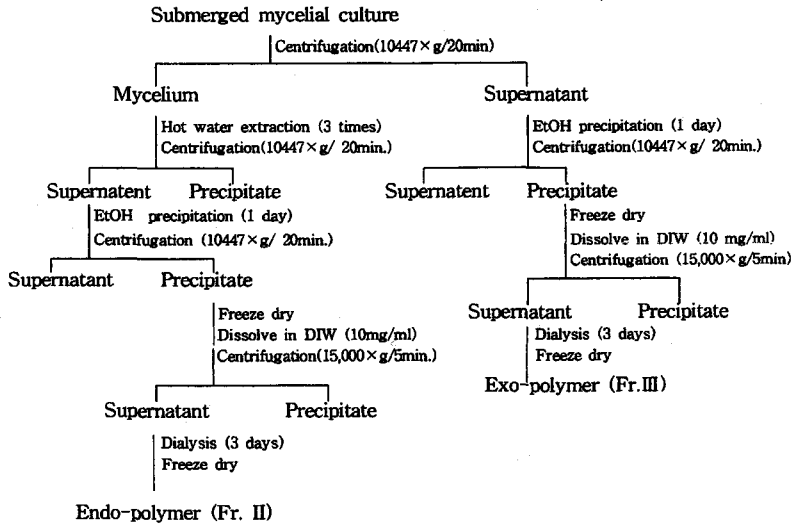


Fig. 2. Production process of endo- and exo-polymer from the submerged mycelial culture of *Phellinus linteus*.

다시 동결건조하여 시료로 사용하였다.

항보체 활성의 측정

항보체 활성은 Mayer법(Kabat and Mayer, 1961)으로 측정하였다. NHS(normal human serum), GVB²⁺(gelatine veronal buffered saline, pH 7.2)와 시료를 각각 50 μl씩 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 반응액에 GVB²⁺를 350 μl씩 첨가하고, 이를 10배에서 160배까지 연속 희석하여 750 μl의 GVB²⁺와 양의 감작혈구(10⁸ cells/ml)를 250 μl씩 첨가하여 1시간 동안 반응시킨다음 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)를 2.5 ml씩 가하여 원심분리 후 상등액의 흡광도를 412 nm에서 측정하였다. 한편 대조구는 동일조건에서 시료를 함유하지 않은채 측정하였으며 항보체 활성은 대조구 대비 총보체 용혈(50% of total complement hemolysis, TCH₅₀)의 저지율(inhibition of TCH₅₀ 또는 ITCH₅₀)로 나타내었다. 시료의 정확한 활성을 검정하기 위해 역가를 알고 있는 항보체 다당 CAP-0(ITCH₅₀=61.50%)를 표준물로 하였다.

$$ITCH_{50}(\%) = \frac{TCH_{50} \text{ of control} - TCH_{50} \text{ treated with sample}}{TCH_{50} \text{ of control}} \times 100$$

시 약

양의 감작혈구(IgM hemolysin sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본 동결건조 연구소로부터 구입하여 사용하였으며, 5,5'-diethylbarbituric acid sodium salt는 Merk사 제품을, 정상인의 혈청(Normal human serum, NHS)은 본 실험실에서 신선한 상태로 직접 제조하여 사용하였고, 그외 기타 시약은 시판 일급 혹은 특급시약을 사용하였다.

결과 및 고찰

자연으로부터 채취한 상황버섯의 생리활성에 대한 연구로써 Ikekawa(1968)는 자실체 열수 추출물이 소화기계통의 암에 저지효과 탁월함을 보고하였으며 이는 세포 매개성 면역반응을 촉진(Maeda and Chihara, 1971)시키거나 면역력이 저하된 암환자의 항체생성능력을 회복(Nomoto 등, 1975)시킴으로써 항암효과를 나타내는 것으로 알려졌다. 그러나 자연산의 상황버섯은 채취가 쉽지 않으며 품질의 균일성이 확보되지 않은 관계로, 본 연구에서는 인공재배 상황버섯과 자연 상황버섯의 자실체 열수 추출 다당체를 비교하고, 이들의 액체 균사체 배양을 통한 배양여액 및 균사체의 열수 추출로부

Table 1. Anti-complementary activity of polymer produced from natural and cultivated basidiocarps of *Phellinus linteus*

Origin	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ %)±SD ^a
Cultivated basidiocarp	63.94±6.48
natural basidiocarp	65.77±2.54

^a 5 replicated.

터 생산된 *exo-polymer*와 *endo-polymer*를 항보체 활성 실험을 통하여 보체계의 활성도를 비교하였다. 자연 상황버섯 자실체 열수추출 다당체의 항보체 활성은 65.77%이었으며, 인공재배 상황은 63.94%를 나타내어 비슷한 활성도를 보이고 있다 (Table 1). 따라서 면역활성의 측면으로는 인공 상황버섯의 이용가능성이 있다고 사료된다. 그러나 인공 상황버섯 자실체와 자연산 자실체의 형태 및 조직은 다른 양상을 보이고 있다 (Fig. 3).

액체배양으로부터 생산된 상황버섯의 균사체를

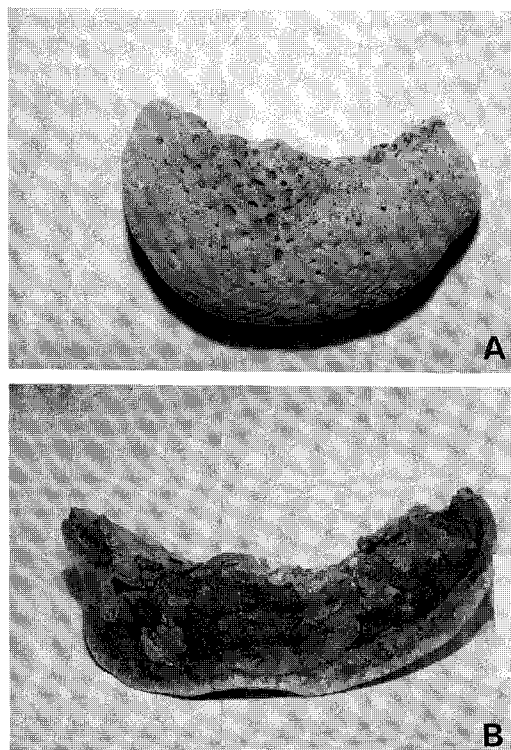


Fig. 3. Photograph of natural (A) and cultivated (B) basidiocarp of *Phellinus linteus*.

Table 2. Anti-complementary activity of polymer produced from submerged culture of mycelium and basidiocarps of *Phellinus linteus*

Origin of polymer	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ %)±SD ^a
Basidiocarp (Fr. I)	63.94±6.48
Mycelia (Fr. II)	41.95±2.86
Culture broth (Fr. III)	21.87±7.45

^a 5 replicated.

열수추출하여 획득한 균체내다당(*endo-polymer*)의 항암활성 (Chung 등, 1993)이나 면역활성 (Kim 등, 1996)에 대한 연구가 최근에 진행되어 왔으나, 자실체추출 다당, 액체배양에 의한 균체내 다당 (*endo-polymer*) 및 균체의 다당 (*exo-polymer*)의 면역활성에 대한 비교연구는 보고된 바 없었다. 따라서 본 연구에서 이들의 면역활성을 비교한 결과, 자실체추출 다당의 면역활성이 63.94%로 균사체추출 다당의 활성 41.95% 그리고 균체의 다당 21.87% 보다 높은 활성을 나타내었다 (Table 2). 본 연구 결과를 종합해 볼 때, 자실체와 균사체로부터 생산된 *polymer*는 구조와 성질이 다른 것으로 사료되며 따라서 각종 생리활성에 대한 연구는 각기 진행되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

상황버섯 자실체, 액체배양 균사체 및 배양액으로부터 고분자물질 (*polymer*)을 추출하여 면역활성을 *anti-complementary assay* 방법으로 측정하였다. 자연산과 인공재배 자실체로부터 생산된 *polymer*의 면역활성은 각각 65.77%와 63.94%로 나타내 큰 차이를 보이지 않았다. 자실체, 균사체 및 배양액으로부터 추출한 *polymer*의 면역활성 측정결과, 균사체는 41.95%, 배양액은 21.87%로 자실체 보다 낮게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 대구대학교 1997년도 학술 연구비와 1996년도 한국과학재단 핵심전문연구과제(961-

0603-021-2) 지원에 의한 결과이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 정경수, 김신숙, 김희수, 한만우, 김병각. 1994. *Phellinus linteus* 균사배양물로부터 분리한 단백당체 Kp의 항암활성. 약학회지 38(2): 158-165.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially, lentinan, from *Lentinus edodes*(Berk) Sing(an edible mushroom). *Cancer Res.* 30: 2776-2781.
- Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, K. Y. and Han, M. W. 1993. Effect of Kp, an antitumor protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep red blood cells. *Arch. Pharm. Res.* 16(4): 336-338.
- Franze, G. 1989. Polysaccharides in pharmacy: current application and future concepts. *planta Med.* 55: 493-497.
- Han, M. W., Ko, K. S. and Chung, K. S. 1995. Liquid cultivation of *Phellinus linteus* mycelium and preparation of antitumor and immunostimulating substance. *Korea Patent Open No.* 95-7860.
- Ikekawa, T., Nakanish, M., Vehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. 1968. Antitumor action of some Basidiomycetes especially *Phellinus linteus*. *Gann.* 59: 155.
- Kabat, E. A. and Mayer, M. M. 1964. Complement and complement fixation. In experimental immunology. *Charles, C. Thomas publisher. Illinose.* p. 133.
- Kim, H. M., Han, S. B., OH, G. T., Kim, Y. H., Hong, D. H., Hong, N. D. and Yoo, I. D. 1996. Stimulation of Humoral and cell mediated immunity by polysacchride from mushroom *Phellinus linteus*. *Int. J. Immunopharmac.* 18(5): 295-303.
- Lee, J. H., Cho, S. M., Song, K. S., Han, S. B., Kim, H. M., Hong, N. D. and Yoo, I. D. 1996. Immunostimulating activity and characterization of polysaccharide from mycelium of *Phellinus linteus*. *J. Microbiology and Biotechnology.* 6(3): 213-218.
- Maeda, Y. Y. and Chihara, G. 1971. Lentinan, a new immunoaccelerator of cell-mediated responses. *Nature.* 229: 634.
- Nomoto, K., Yoshikumi, C., Matsunaga, K., Fuji, T. and Takeya, K. 1975. Restoration of antibody-forming capacities by PS-K in tumor-bearing mice. *Gann.* 66: 365.
- Okuda, T., Yoshioka, Y., Ikekawa, T., Chihara, G. and Nishioka, K. 1973. Anti-complementary activity of antitumor polysacchrides. *Nature* 238: 290-291.
- Song, C. H., Moon, H. Y. and Ryu, C. H. 1997. Artificial cultivation of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* 25(2): 130-132.
- Suzuki, I., Hashimoto, K., Oikawa, S., Sato, K., Osawa, M. and Yadomae, T. 1989. Antitumor and immunostimulating activities of β -glucan obtained from liquid cultured *Grifora frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 410-413.
- Tabata, K., Itoh, W., Kojima, I., Kawabate, S. and Misaki, K. 1981. Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune*. *Carbohydr. Res.* 89: 121-135.
- Tsukagoshi, S. and F. Ohashi. 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann.* 65: 557-558.