

잔나비버섯 자실체로부터 분리한 물질의 특성 및 생리활성

정호권 · 이준우*

참존 생물소재연구소, *경북전문대학 식품가공과

Biological Activities of Substance Extracted from the Fruit Body of *Formitopsis rosea*

Ho-kweon Chung and June-Woo Lee*

Biomaterial research center, Charmzone Co., Ltd.

*Department of Food Science & Technology, Kyungbuk College

This study was conducted to investigate the characteristics and biological activities of the substance extracted from the fruit body of *Formitopsis rosea*. The substance was extracted by hot water and then it was separated high and low molecular weight fraction by ethanol precipitation. The high molecular weight fraction was found to be a proteoglycan composed of glucose, mannose, galactose, xylose, fructose, ribose and amino acids. The amino acids of proteoglycan were mainly threonine, isoleucine, glycine, aspartic acid. Anticomplementary activity of the high molecular weight fraction was higher than that of the low molecular weight fraction. And also, the high molecular weight fraction enhanced phagocytic activity and nitric oxide production of macrophage. In enzymatic lipid peroxidation reaction with ADP-FeCl₃-NADPH, the lipid peroxidation was inhibited 82.4% and 86.6% by high and low molecular weight fractions, in nonenzymatic lipid peroxidation reaction, it was 83.0% and 84.6%, respectively.

Key words : biological activity, anti-lipidperoxidative activity, *Formitopsis rosea*

서 론

담자균류는 예로부터 그 특유의 맛, 향기, 영양성분에 의해 식용 및 약용으로 널리 이용되어 왔으며, 이들에 대한 균체 성분과 대사 산물은 특히 생리활성과 관련하여 많은 연구가 수행되어 왔다. 담자균류의 생리활성에 관한 연구는 1955년 Bose⁽¹⁾가 수종의 담자균류로부터 분리한 물질의 항균 성분에 대한 보고를 시작으로 그들에 대한 성분확인 및 다양한 생리활성에 관한 연구가 이루어져 왔다. 담자균류의 면역·항암활성에 대한 본격적인 연구는 1969년 Chihara 등⁽²⁾이 일본 및 아시아에서 중앙에 유효한 민간약인 한방약에 기초하여 *Phellinus linteus*, *Coriolus hirsutus*, *Ganoderma applanatum* 등의 열수 추출물을 이용하여 sarcoma 180 고형암에 대한 흥미로운 결과를 얻었다. 특히, Tsukagoshi 등⁽³⁾은 구름버섯을 열수 추출하여 얻은 단백질 결합 다당류가 sarcoma 180에 항암 활성이 있음을 밝혔다. 이러한 단백 다당류를 산업적으로

활용하고자 하는 노력이 활발히 진행되어 왔으며, 최근에는 균사체를 대량으로 액체배양하여 얻은 polysaccharide-K(Krestin), *Lentinus edodes*로부터 분리한 lentinan⁽⁴⁾ 및 *Schizophyllum commune*에서 분리한 schizophyllan⁽⁵⁾이 현재 항암제 및 항암 보조제로서 이용되고 있으며, 이들은 β-glucan 구조를 가지고 있다. 이와 같은 구조를 가진 다당류들은 생체 방어에 중요한 면역세포의 성숙, 분화 및 증식을 촉진하는 생체 방어 증강 물질로 이용되고 있다^(6,7).

*Formitopsis rosea*는 구멍장이버섯과(Polyporaceae) 잔나비버섯속(Elfvigia)에 속하는 버섯으로 다년생 목재백색부후균으로 전세계에 분포하고 있는 것으로 알려졌다. 갓은 매년성장하며 반원형~말굽형, 표면은 각피로 덮여있고 평활하나 환문과 방사상의 주름이 있고, 조직은 코르크질이고, 포자는 8~9×5~6 μm로 난형이며, 구조는 불로초형이고, 포자분은 담황갈색이다⁽⁸⁾. 잔나비버섯에 대한 연구는 주로 면역·항암활성에 관한 연구가 주류를 이루어 왔으나⁽²⁾ 국내의 경우는 많은 연구가 이루어져 있지 않은 실정이며, 아직까지도 식품 또는 의약품으로의 개발이 전무한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 잔나비버섯 자실체로부터 저분자과 고분자 물질을 분획하여 이들의 당, 단백질, 구성 당 및 구성 아미노산의 조성을 측정하였다. *Formitopsis rosea*의 생리활성을 알아보기 위해서는 면역의 초기 반응을 담당하고 표

Corresponding author : Chung, Ho-Kweon, Biomaterial research center, Charmzone Co., Ltd., #301 Hankang-village, 184-11 Kwang-jang-Dong, Kwangjin-Ku, Seoul, Korea
Tel : 82-2-453-8665, 8660
Fax : 82-2-453-8664
E-mail : biomater@thrunet.com

적 암세포에 대한 직접적인 세포 독성능을 가지며 대식세포의 활성화에 관여하는 탐식능과 활성화 분비 물질인 nitric oxide, tumor necrosis factor, B 세포와 T세포의 활성화와 관련이 있는 항체생성능 및 지질과산화 억제효과 등을 측정하여 새로운 기능성 소재로의 이용 가능성에 대해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용한 버섯은 잔나비버섯(*Formitopsis rosea*) 자실체를 이용하였다. 당 정량을 위한 sulfuric acid와 phenol, streptomycin 및 penicillin, LPS(*E. coli* 0127:B8), IFN- γ , NaNO₂ 등은 Sigma(USA, St. Louis MO), 단백질 정량은 bicinchoninic acid(BCA, Pierce Co.)를 사용하였다. 동물세포 배양을 위한 streptomycin, penicilline, RPMI 1640, DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) 배지 및 fetal new born calf serum은 GIBCO(Grand Island, N.Y)사, mTNF- α ELISA kit(Factor-Test-X)는 Genzyme사(USA, Cambridge MA)로부터 구입하여 사용하였다. 기타 시약들은 특급의 시약을 사용하였다.

실험동물 및 동물세포

Mouse는 8~10 주령의 20~25 g인 ICR계 웅성, rats는 230~250 g의 S-D계 웅성으로 삼육축산에서 구입하여 사용하였으며, 동물의 사육 조건으로 실험동물실 온도는 22±2°C, 습도는 55~60%, light cycle은 12시간씩 빛과 암상태를 유지하였으며, 고형 사료와 물은 무제한 공급하였다. Mouse의 복강 대식세포와 Raw 264.7 대식세포의 배지로는 10%의 FCS가 포함된 DMEM을 사용하여 petri dish를 이용하여 2~3일 마다 계대하여 주면서 실험에 사용하였다.

시료의 조제

버섯 자실체를 1×2 cm의 크기로 세절하여 10배(w/v, %)의 물을 가해 110°C에서 30분 동안 2회 반복 추출하고, 75 μ m의 체로 여과한 여액을 모아 1/5량으로 농축하였다. 농축물에 3배량의 에탄올을 가해 24시간 동안 방치한 다음 원심분리를 실시하였다. 침전물은 소량의 물을 가해 가용화시켜 투석막에 넣고 흐르는 물에 5일간 투석을 행하여 동결건조하였으며(고분자 분획), 상층액은 농축 및 동결건조하여 저분자 분획을 얻었다(Fig. 1).

당, 단백질 및 hexosamine의 정량

당의 함량은 phenol-sulfuric acid 법⁽⁹⁾으로 측정하였으며, 단백질 함량은 BCA 단백질 정량시약을 사용하여 측정하였다⁽¹⁰⁾. 다당류의 hexosamine의 함량은 Belcher의 방법⁽¹¹⁾으로 측정하였으며, 2-amino-2-deoxy-D-glucose-HCl(Sigma Co.)를 이용하여 얻은 표준곡선으로부터 측정하였다.

구성당 및 아미노산의 분석

구성당 분석하기 위해 시료 10 mg을 0.1 N HCl에 용해시켜 질소를 충전시킨 후, 100°C에서 5시간 동안 가수분해시켰으며, 여기에 3배량의 ethanol을 가해 4°C에서 하룻밤 방

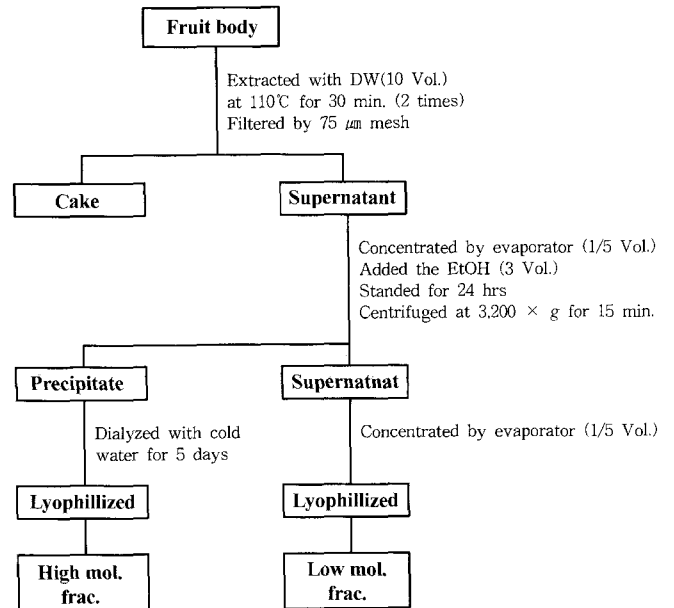


Fig. 1. Procedure for preparation of the fractionations from fruit body of *Formitopsis rosea*

치한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하였다. 이것을 1 mL의 pyridine에 용해시키고 0.2 mL의 hexamethyl disilazane과 0.1 mL의 trimethyl chlorosilane을 가하고 80°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액 중의 당은 gas chromatography (Shimadzu GL 9A)를 이용하여 분석하였으며, 분석조건은 다음과 같다. column; 3% OV-17(80~100 mesh Shimalite) 3 mm(D) × 3 m(L) borosilicate glass packed column, column temperature; 150~180°C, gradient; 1°C/1 min, detector; frame ionization detector(FID), detector temperature; 190°C, injection temperature; 190°C, flow rate; carrier gas-N₂(50 mL/min), combustion gas-H₂(60 mL/min), air(60 mL/min). 구성아미노산 분석은 시료 4 mg을 1 mL의 6N HCl에 용해시켜, 질소를 충전한 후 밀봉하여 110°C에서 24시간 동안 가수분해시킨 후, Lee 등⁽¹¹⁾의 방법에 따라 분석을 실시하였다.

분자량 측정

분자량은 Sepharose CL-4B column(φ 2.6 cm×52 cm)에서 fraction volume을 2 mL로 하여 chromatography를 행하였으며, 당의 확인에는 phenol-sulfuric acid법을 이용하여 발색시켜 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분자량 측정을 위한 표준 물질로는 Sigma사의 dextran(2,000 kD, 500 kD, 124 kD, 9.3 kD)을 사용하였다.

항보체활성의 측정

항보체 활성은 Lee 등⁽¹²⁾의 방법을 이용하여 측정하였으며, 실험의 정확을 기하기 위하여, complement와 hemolysin에 대한 활성 역가를 측정하여 실험에 이용하였다. 반응물은 70 μ L의 0.5 M EDTA를 가하여 반응을 중단시킨 후 400×g에서 5분간 원심 분리하여 얻어진 상등액은 541 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항보체 활성은 대조군 대비 총보체 용혈율(50% of total complement hemolysis; TCH50, %)의 저지율(inhibi-

tion of TCH₅₀; ITCH₅₀%)로 나타내었다.

용혈반형성 세포수의 측정

용혈반형성 세포수의 측정은 Jerne과 Nordin⁽¹³⁾의 방법에 따라 행하였다. Mouse 5마리를 1군으로 하여 20 mg/kg 농도의 시료를 연속 5일간 복강내에 투여하고 5일이 지난 후 1×10⁷ 개의 SRBC를 복강주사하여 면역시켰다. 5일 후 mouse를 치사시키고 비장을 분리하여 빙냉의 Hank's balanced salt solution(HBSS)에 넣고 분쇄하여 비장세포를 유리시킨 것을 400×g에서 5분간 원심분리하여 실험에 이용하였다. 용혈반형성 세포수를 측정하기 위해 비장세포 0.1 mL(1×10⁸ cells/mL)와 0.1 mL의 10% SRBC를 0.7% agar용액 2 mL에 혼합하여 1.5% agar 기저평판에 균일하게 분주한 후 37°C에서 60분간 감각화시켰다. 여기에 보체로서 10%의 guinea pig serum을 2.5 mL씩 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 용혈반형성 세포수를 측정하였다.

탐식능의 측정

탐식능은 Kanari 등⁽¹⁴⁾의 방법에 따라 carbon clearance rate로서 측정하였다. 20 mg/kg 농도의 시료를 복강내에 연속 5일간 투여하고, 24시간 후 mouse의 꼬리정맥에 carbon 부유액(Perikan drawing ink 17 black 3 mL, 생리식염수 4 mL 및 3% gelatin 4 mL의 혼합액)을 0.25 mL/mouse씩 주사하고 3분, 6분 및 9분 후에 안와정맥에서 30 μL를 채혈한 즉시 3 mL의 0.1% Na₂CO₃를 가하여 용혈시킨 후 675 nm에서 흡광도를 측정하였다. Carbon clearance rate는 아래 식에 의해 계산하였다.

$$t_{1/2} = \frac{(t_2 - t_1)(1/2)OD_1}{OD_1 - OD_2}$$

t₁=Initial time(min)

OD₁=t₁에서의 OD값

OD₂=t₂에서의 OD값

Mouse 복강 대식세포의 분리

Mouse 복강 대식세포는 분리는 정상적인 mouse에 3%의 thioglycolate broth(Difco Co.) 2 mL를 복강에 투여하고 6일 후, 복강으로부터 분리하여 실험에 사용하였다. 대식세포의 분리는 10 mL의 Ca²⁺, Mg²⁺-free HBSS를 복강 내로 주입하고, mouse를 상하 좌우로 가볍게 흔든 다음 주사기를 이용하여 세포를 모아 200×g에서 5분간 원심분리를 2회 반복 실시하였다. 분리된 세포는 DMEM에 부유시켜 petri dish에 분주한 다음 incubator(5% CO₂, 37°C)에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액의 비부착성 세포를 제거한 후, 10% FCS가 함유된 DMEM 배지를 교환하여 이를 실험 목적에 따라 사용하였다.

Nitric oxide의 측정

대식세포로부터 생성되는 NO를 측정하기 위해서, 96 well에 대식세포를 분주하고, 2시간 동안 전 배양하여 비부착 세포를 제거하였다. 각 well에 시료 및 대조물질 10 μg를 가하여 37°C에서 5% CO₂ 하에서 24시간 동안 배양 한 후, NO 생

성량은 Ding 등⁽¹⁵⁾의 방법에 따라 정량하였다. 간략하면, 100 μL의 배양액과 동량의 Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylene diamine dihydrochloride, 2.5% H₃PO₄)를 가하여 실온에서 10분 동안 반응시킨 후, 540 nm에서 ELISA(Bio-Tek instrument, Inc. Ceres UV. HDi)를 이용하여 측정하였다. NO₂의 농도는 sodium nitrite를 이용하여 얻어진 흡광도로부터 표준 곡선을 작성하여 측정하였다.

TNF-α의 측정

Mouse의 혈청 및 대식세포 배양물 내의 TNF-α의 정량은 multiple antibody sandwich 원리를 이용한 solid-phase ELISA 방법을 이용하였으며, 상세한 실험과정은 Lee⁽¹⁶⁾와 동일한 방법으로 실시하였다. 반응 정지후 실온에서 10분 동안 방치하고 30분 이내에 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료내의 mTNF-α양은 표준 mTNF-α의 농도의 흡광도를 이용하여 얻어진 표준 직선으로부터 계산하였다.

In vitro에서의 지질 과산화 유발 및 측정

Microsome의 분리와 in vitro 지질 과산화 억제능의 측정은 Kiso 등⁽¹⁷⁾의 방법을 이용하였다. 지질 과산화 정도는 Ohkawa 등⁽¹⁸⁾의 방법을 이용하여 생성된 malondialdehyde(MDA) 양을 측정하였다. 표준물질로서 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP)를 이용하여 시료내의 MDA량을 정량하였으며, 저해율은 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{\text{MDA of control} - \text{MDA of sample}}{\text{MDA of control}} \times 100(\%)$$

통계처리

본 실험에서의 통계처리는 평균치±표준오차로 나타내었으며, 유의성 검정은 Student's t-test로 확인하였다.

결과 및 고찰

조다당류의 수율 및 성분

잔나비버섯 자실체로부터 얻은 고분자와 저분자 분획의 수율과 화학적 조성을 알아본 결과는 Table 1과 같다. 버섯 자실체를 세절하여 10배의 물을 가해 110°C에서 30분 동안 열수 추출한 고분자 및 저분자의 수율은 각각 0.4%와 3.6%였다. 고분자와 저분자 분획의 총당 함량은 각각 41.0%와 28.0% 이었고, 단백질은 3.9%와 3.2%로 조사되었다. Hexosamine은 고분자 분획에서 11.7%로 많이 함유하고 있어 당과 단백질이 N-glucosidic 결합력을 이루는 단백다당류인 것으로 추정된다. 저분자 분획에서 높은 총당 함량을 나타낸 것은 일부 저분자 다당류의 혼재되었거나 저분자의 당 유도체들에 의한 결과로 추정된다.

Table 1. Chemical composition of low and high molecular fraction extracted from *Formitopsis rosea*

| Sample | Total sugar (%) | Protein (%) | Hexosamine (%) | Yield (%) |
|-----------------|-----------------|-------------|----------------|-----------|
| High mol. frac. | 41.0 | 3.9 | 11.7 | 0.44 |
| Low mol. frac. | 28.0 | 3.2 | - | 3.60 |

Table 2. Monosaccharides composition of high molecular fraction extracted from *Formitopsis rosea*

| Monosaccharide | Content(%) |
|----------------|------------|
| Arabinose | 0.9 |
| Ribose | 2.6 |
| Xylose | 7.8 |
| Mannose | 12.2 |
| Fructose | 2.8 |
| Galactose | 12.1 |
| -Glucose | 33.1 |
| -Glucose | 28.5 |

Table 3. Amino acids composition of high molecular fraction extracted from *Formitopsis rosea*

| Amino acids | Content(%) |
|---------------|------------|
| Aspartic acid | 9.0 |
| Threonine | 21.3 |
| Serine | 6.5 |
| Glutamic acid | 6.4 |
| Proline | 3.3 |
| Glycine | 10.0 |
| Alanine | 7.1 |
| Cystein | - |
| Valine | 3.4 |
| Methionine | - |
| Isoleucine | 11.4 |
| Leucine | 9.8 |
| Tyrosine | 3.7 |
| Phenylalanine | 0.3 |
| Histidine | 1.8 |
| Lysine | 3.7 |
| Arginine | 2.3 |

구성당의 분석

잔나비버섯 자실체로부터 분리한 고분자 분획의 구성당 분석 결과는 Table 2와 같다. 단당 성분은 glucose가 주를 이루고 있으며, 소량의 galactose, mannose, arabinose 및 fructose 등으로 구성되어 여러 가지 당이 결합된 구조를 이루는 단백당류임을 알 수 있었다. 또한 고분자 분획의 단당류 성분은 glucose, mannose, galactose, xylose 및 fructose의 순으로 나타났다. Glucose의 함량은 61.6%를 함유하고 있었으며, α-와 β-glucose의 비율은 1:0.86으로써 α-glucose의 함량이 높게 나타났다.

구성 아미노산의 분석

잔나비버섯 자실체로부터 분리한 고분자 분획의 구성아미노산 분석 결과는 Table 3에 나타낸 바와 같이 15여 종의 아미노산으로 구성되어 있었다. 버섯 자실체 열수추출 고분자 분획은 threonine의 경우 가장 높은 21.3%를 함유하고, 산성 아미노산인 Asp, Gly 및 Glu 등이 각각 9.0%, 10.0% 및 6.4%, 중성 아미노산인 Ala은 7.1%를 함유하고 있는 것으로 나타나 당과 단백질이 결합된 단백당류인 것으로 추정된다. 일반적으로 당과 단백질의 결합양식 중 O-glucosidic 결합은 peptide쇄중의 Ser과 Thr 같은 아미노산의 개입에 의해 이

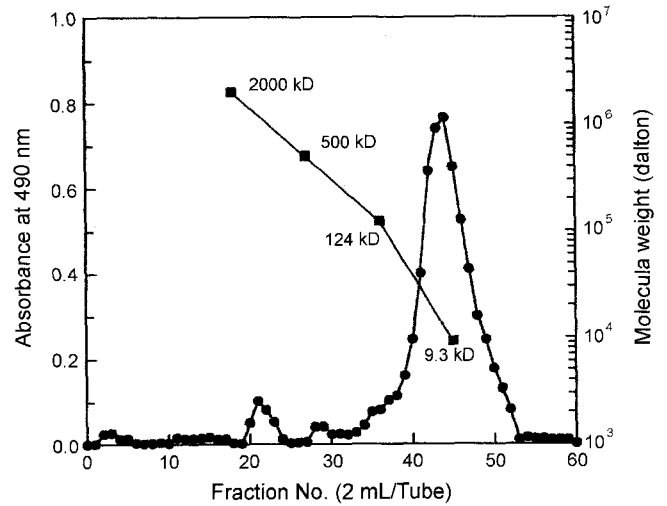


Fig. 2. Molecular weight pattern of high molecular fraction extracted from *Formitopsis rosea*

Table 4. Anticomplementary activity of low and high molecular fraction extracted from *Formitopsis rosea*

| Sample | ITCH ₅₀ (%) |
|-----------------|------------------------|
| Low mol. frac. | 2.9±1.7 |
| High mol. frac. | 30.0±7.1 |
| Krestin | 14.0±2.3 |

Krestin: Obtained from *Coriolus versicolor* (Kurea Co., Japan).

루어지는 것으로 알려졌다⁽¹⁹⁾. 따라서 잔나비버섯 유래 고분자 분획의 경우는 hexosamine에 의한 N-glucosidic 결합과 O-glucosidic 결합을 이루는 당단백질 구조를 하고 있는 것으로 추정된다.

분자량 분포

잔나비버섯 자실체로부터 추출한 고분자 분획에 대한 분자량 pattern은 전형적인 2개의 peak가 나타났으며, 주 peak의 분자량은 약 10 kD 부근인 것으로 측정되었다(Fig. 2).

항보체 활성

잔나비버섯 자실체의 고분자 및 저분자 분획들의 항보체 활성화에 대한 실험 결과는 Table 4에 나타내었다. 즉, 고분자 분획에서는 30.0%, 저분자 분획은 2.9%의 보체계 활성능을 나타내었다. 일반적으로 고분자 다당류가 보체계를 활성화시킨다고 알려진 것처럼 저분자보다는 고분자에서 보체계를 활성화시킬 수 있었다.

Okuda 등⁽²⁰⁾은 항암활성 다당류와 보체계 활성화간에 밀접한 관계가 있음을 보고하였으며, 또한 Shimura 등⁽²¹⁾도 항암활성이 우수한 담자균류 유래 다당류가 보체계 활성능이 높게 나타났다고 보고하여 항보체활성의 측정은 항암성 다당류의 생리활성을 측정하는 좋은 도구로 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 Hamuro 등⁽²²⁾은 양자간에 어느 정도의 상관성을 갖지만 완전한 상관 관계는 없다고 보고하므로써 담자균류의 항암성 다당류의 생리활성 측정을 위해서는 다양한 모델을 이용한 연구를 수행할 필요가 있다.

Table 5. Hemolytic plaque forming cells assay of high molecular fraction extracted from *Formitopsis rosea*

| Sample | Spleen cells (10^7 cells/mL) | PFC (10^6 spleen cells) | PFC/spleen (10^2) | Stimulation Index (S.I.) |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Normal | 2.30±0.8 | 2.3±2.1 | 0.54±0.2 | - |
| Control | 2.35±0.7 | 6.1±3.7 | 2.13±0.8 | 1.0 |
| High mol. frac. | 2.39±1.2*# | 3.6±2.2* | 2.33±1.5# | 1.1 |
| Krestin | 3.83±0.3 | 6.0±0.4*# | 7.10±4.3* | 3.3 |

Normal: not immunized with SRBC, Control: immunized with SRBC.

*: Significantly different from the normal $P < 0.05$.

#: Significantly different from the control $P < 0.05$.

Table 6. Phagocytic activity of high molecular fraction extracted from *Formitopsis rosea*

| Sample | Carbon clearance rate ($t_{1/2}$, min) |
|-----------------|--|
| Control | 10.6±4.2 |
| High mol. frac. | 7.2±1.6 |
| Krestin | 9.2±2.0 |

Each value was represented as mean \pm S.D. of 5~6 mice.

Table 7. Nitric oxide production of low and high molecular fraction extracted from *Formitopsis rosea*

| Sample | Nitric Oxide (μ M) |
|--------------------|-------------------------|
| Control | 3.1±0.2 |
| Low mol. frac. | 3.2±0.1* |
| High mol. frac. | 5.0±1.0** |
| Krestin | 3.0±0.3 |
| Lipopolysaccharide | 41.5±1.1 |

*: Significantly different from the control, $p < 0.01$, **: $P < 0.05$.

항체생성능

버섯 자실체의 고분자 분획물이 mouse의 항체 생성에 미치는 영향을 검토하기 위하여, antigen으로서 SRBC를 사용하여 실험한 결과는 Table 5에 나타내었다. SRBC를 주사하지 않은 군에서는 대조군과 비교하여 3.9배의 stimulation 효과를 보였으며, SRBC 5×10^7 cells를 주사한 군에서는 커다란 반응을 나타내지 않는 것으로 조사되었다. 이와 같은 결과는 고분자 다당류가 체내의 체액성 면역에 관여하는 effector B 세포의 수를 약간 증가시킴으로써 미약한 adjuvant의 기능을 갖는 것으로 생각된다.

탐식능

버섯 자실체로부터 분리한 다당류 분획이 대식세포에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 carbon clearance rate($t_{1/2}$)를 측정하여 Table 6에 나타내었다. 생리식염수를 투여한 대조군에서는 10.6분으로 나타났으며, 고분자와 krestin 20 mg/kg을 투여한 군에 7.2분과 9.2분으로 나타나 고분자 다당류 투여군에서 대식세포의 탐식능이 증진됨을 알 수 있었다. 탄소 제거능에 대한 실험에서 고분자 다당류가 탐식능을 증강시키므로, 고분자는 대식세포를 활성화시켜 다양한 세포 내 물질들의 분비에 의하여 항종양 등의 면역 활성을 나타내는 것으로 추정됨으로써 대식세포에 대한 영향을 검토하고자 하였다.

Table 8. TNF- α production of low and high molecular fraction extracted from *Formitopsis rosea*

| Sample | Nitric oxide(M) | TNF- α (pg/mL) |
|--------------------|-----------------|-----------------------|
| Control | 3.9±0.7 | 740±15 |
| Low mol. frac. | 3.2±0.5 | 521±135** |
| High mol. frac. | 8.2±0.8 | 1505±312* |
| Lipopolysaccharide | 53.6±3.5** | 5485±123* |

*: Significantly different from the control $P < 0.01$, **: $P < 0.05$.

Table 9. Effect of low and high molecular fraction extracted from *Formitopsis rosea* on Ascorbate-induced lipid peroxidation

| Sample | Formed malondialdehyde (nM/mL) | Inhibition Ratio (I.R., %) |
|--------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| Control | 38.9±1.1 | - |
| High mol. frac. | 6.6±0.3* | 83.0 |
| Low mol. frac. | 6.0±0.1* | 84.6 |
| Krestin | 10.8±0.4* | 72.2 |
| Butylated hydroxytoluene | 2.8±0.4* | 92.8 |

*: Significantly different from the control, $p < 0.01$.

Each value was represented as mean \pm S.D. of two experiments.

Nitric oxide 생성능

고분자 및 저분자 시료가 Raw 264.7 세포주에서 NO 생성능에 미치는 효과를 알아보기 위하여 실험한 결과는 Table 7에 나타내었다. 이 결과 고분자 및 저분자 모두에서 NO 생성능이 거의 없거나 미약하게 나타나는 것으로 조사되었다. 대식세포에는 mannose와 β -glucan의 수용체의 존재가 보고되었으나⁽²¹⁾, 본 연구의 결과 고분자의 경우 mannose와 β -glucan의 함량이 높았음에도 불구하고 NO의 생성량이 미미한 것으로 나타남으로써 다당류에 의한 대식세포의 활성화에는 성분상의 특징에 의한 것 보다는 구조적 특징에 기인하는 것으로 생각된다.

NO 및 TNF- α 생성능

활성화된 대식세포에 대한 영향을 알아보기 위하여, 3% thioglycollate(TG)를 복강 주입한 mouse로부터 복강 대식세포를 분리하여 각 분획을 처리하고 NO 및 TNF- α 를 측정 한 결과는 Table 8과 같다. 고분자 분획의 경우 NO와 TNF- α 의 생성은 대조군에 비해 각각 2.1배 및 2.0배의 증가를 보였으나 저분자의 경우는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 10. Effect of low and high molecular fraction extracted from *Formitopsis rosea* on ADP/NADPH/Fe²⁺-induced lipid peroxidation

| Sample | Formed malondialdehyde (nMmL) | Inhibition ratio (I.R., %) |
|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Control | 47.8±2.0 | - |
| High mol. frac. | 8.4±0.1* | 82.4 |
| Low mol. frac. | 6.4±1.1* | 86.6 |
| Krestin | 8.2±0.8* | 82.8 |
| Butylated hydroxytoluene | 5.6±0.3* | 88.3 |

*: Significantly different from the control, p<0.01. Each value was represented as mean±S.D. of two experiments.

지질 과산화 억제능

고분자 및 저분자 분획의 지질과산화 억제활성을 조사하기 위하여 간 microsome에 시료를 가한 후, 생성된 MDA의 양을 측정된 결과는 Table 9 및 10과 같다. Ascorbic acid와 FeSO₄에 의한 비효소적 지질과산화 유발의 경우, 대조군은 mL당 38.9 nM의 MDA를 생성 시켰고, 고분자 및 저분자는 각각 6.6 nM/mL과 6.0 nM/mL의 MDA 생성능을 보였으며, 이때 저해율은 각각 83.0% 및 84.6%였다. ADP, NADPH 및 Fe에 의한 효소적 지질 과산화 유발의 경우에 고분자 및 저분자는 각각 8.4 nM/mL과 6.4 nM/mL의 MDA 생성능을 보였으며, 각각의 저해율은 82.4% 및 86.6%로 나타났다. 일반적으로 버섯 자실체 추출물의 경우, 그들의 구조적 특성에 의해 저분자보다는 고분자 분획에서 지질과산화 억제효과가 높은 것으로 보고되고 있으나⁽²⁾, 경질 담자균류인 경우는 대부분 다년생으로 항산화능과 관련이 있는 2차 대사산물들이 저분자 분획에 다량 함유되어 있는 것으로 추정된다.

요 약

잔나비버섯 자실체로부터 열수추출하여 얻어진 고분자 및 저분자 분획의 이화학적 특성 및 생리활성 대하여 검토하였다. 고분자와 저분자 분획은 당과 단백질 및 소량의 hexosamine을 함유하고 있었다. 구성 당은 주로 glucose, galactose, mannose와 소량의 xylose, fructose, ribose 및 arabinose 등으로 구성되었으며, 아미노산의 경우는 당과 단백질의 결합력에 관여하고 있는 Ser과 Thr를 다량 함유하고 있는 것으로 조사되었다. 고분자 분획의 분자량은 10 kD 부근에서 주를 이루고 있는 것으로 나타났다. 항보체활성은 고분자 분획에서 높았으며, 항체생성능은 대조군에 비해 약간 증가하는 양상을 나타내었다. 탐식능, NO 및 TNF-α 생성능은 서로 상관성이 있는 것으로 조사되었다. 효소적 및 비효소적 지질과산화 유발에 대한 영향은 고분자 및 저분자 분획에서 모두 억제능을 나타내었다. 이와 같이 잔나비버섯 자실체로부터 추출한 고분자 및 저분자 분획은 면역활성 및 지질 과산화 억제효과 있는 것으로 조사되었다.

참고문헌

1. Bose, S.R. Campestrin, the antibiotics of *Psalliota campestris*. Nature 175: 468 (1955)

2. Chihara, G., Maeda, Y., Hamura, T., Sasaki, T. and Fukuoka, F. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*. Nature 222: 687-688 (1969)

3. Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. Jpn. J. Cancer Res. 65: 557-560 (1974)

4. Chihara, G., Hamuro, H., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, K. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. Cancer Res. 30: 2776-2781 (1970)

5. Komatsu, N., Okubo, S., Likumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sakai, S. Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. Gann. 60: 137-143 (1969)

6. Hamuro, J. and Chihara, G. Immunomodulation agents and their mechanism, Fenichel, R.L. and M.A. Chirigos ed., Marcel Dekker, New York, p. 409 (1984)

7. Chihara, G., Maeda, Y.Y., Suga, T. and Hamuro, J. Lentinan as a host defence potentiator (HDP). Int. J. Immunother. 5: 145 (1989)

8. Park, W.H. and Lee, H.D. Wild fungi of Korea in color. p. 374. Kyohak Co. Ltd, Seoul. Korea (1996)

9. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A. and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Biochem. 28: 350-356 (1956)

10. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85 (1985)

11. Belcher, R., Nutten, A.J. and Sambrook, C.M. Colorimetric determination of hexosamines. pp. 175-176. In: Carbohydrate analysis, Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. (ed.). IRL Press, Washington DC, USA (1986)

12. Lee, J.W., Jeong, H., Jung, C.H. and Lee, K.H. Effects of Alkali Extract of *Ganoderma lucidum* IY007 on Complement and Reticuloendothelial System. Kor. J. Mycol. 18: 137-144 (1990)

13. Jerne, N.K. and Nordin, A.A. Plaque formation in agar by single antibody producing cell. Science 140: 405-406 (1963)

14. Kanari, M., Tomoda, M., Gonda, R., Shimizu, N., Kimura, M., Kawaguchi, M. and Kawabe, C. A reticuloendothelial system activating arabinoxylan from the bark of *Cinnamomum cassia*. Chem. Pharm. Bull. 37: 3191-3194 (1989)

15. Ding, A.J., Nathan, C.F. and Stuehr, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. J. Immunol. 144: 2407-2413 (1988)

16. Lee, J.W. Immunological activity and characteristics of GLG isolated from the mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009. Ph.D. Thesis. Konkuk Univ. Korea (1996).

17. Kiso, Y., Tohkin, M., Hikino, H., Hattory, M., Sakamoto, T. and Namba, T. Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin; Effect on free radical generation and lipid peroxidation. Planta Med. 50: 298-303 (1984)

18. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem., 95: 351-358 (1979)

19. Mizuno, T. and Kawakou, I. Chemistry and biochemistry of mushroom. pp. 315-321. Society Press center. Tokyo. Japan (1992)

20. Okuda, T., Yoshioka, Y., Ikekawa, T., Chihara, G. and Nishioka, K. Anticomplementary activity of antitumor polysaccharide. Nature New Biol. 238: 59-60 (1972)

21. Adams, D.O. and Nathan, C.F. Molecular mechanisms in tumor killing by activated macrophages. Immunol. Today 4: 166-170 (1983)

22. Lee, J.W., Baek, S.J., Lee, S.M., Han, M.D., Kim, Y.H., Bang, K.W. and Jeung, H. Pharmacological activities of the high and low molecular fractions extracted from several basidiomycetes. KSM News Letter 11: 58 (1999)