

척혼합 발효배지로 생산된 신령버섯의 면역기능성 비교 분석에 관한 연구

김주남 · 서정식 · 박동철*

영남이공대학 식음료조리계열 · *김천대학 식품가공과

Studies on the Comparative Analysis of Immunofunction of *Agaricus blazei* Murill Cultivated with Fermented Media Containing *Pueraria thunbergiana*

Ju-Nam Kim, Chung-Sik Suh and Dong-Chul Park*

Division of Food, Beverage & Culinary Arts, Yeungnam College of Science & Technology,
Daegu 705-703, Korea

Department of Food Processing & Technology, Kimcheon College, Kimcheon 740-704, Korea

Abstract

This research was performed to investigate the immunomodulative effects of polysaccharides extracted from the fruiting body of *Agaricus blazei* cultivated with the media which are fermented with sugar cane bagasse containing *Pueraria thunbergiana* in open-air storage. In MTT test, methanol extracts from the fruiting body of *A. blazei* cultivated with *P. thunbergiana* media showed in colon carcinoma line(HT29) by 1.5~3.5 fold and human hepatoma cell line (HepG2) by 1.3~2.4 fold antitumor activities compared to two types media (rice straw plus sugar cane bagasse, rice straw only) often used in the farms. To clarify the antimutagenic principles, three extracts, Ab-1, Ab-2 and Ab-3, were separated by the solvent fractionations such as hot water, cold & hot sodium hydroxide respectively, and their antimutagenic effects was determined against N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine(MNNG) using *Salmonella typhimurium*. There was no significant differences of inhibition levels among the used media, but Ab-3 fractions still showed a high antimutagenicity in the Ames test regardless of cultivating areas or media. To prove the cell immunofunction, nitric oxide (NO) produced from Raw 264.7 macrophage cultured with three fractions (Ab-1, Ab-2, Ab-3) was measured, and showed generally increase about 45~58 percent compared to another two media (rice straw plus sugar cane bagasse, rice straw only), in the fraction of hot alkali extracts of the fruiting body cultivated with *P. thunbergiana*, which means that the media selection could be very important factors for improving medicinal effects in *Agaricus blazei* fruiting body.

Key words : *Agaricus blazei*, polysaccharide, immunofunction

서론

신령버섯(*Agaricus blazei* Murill)은 예로부터 브라질에서 건강식품으로 재배되면서 암, 당뇨, 고지혈증, 동맥경화, 만성간염의 치료와 예방에 효능이 있는 성인병 예방의 약용버섯으로 알려져 오고 있다(1). 이 버섯은 일본에서 최근 많은 농가가 인공재배를 시작하면서 국내에서도 인공재배가 아주 활발하게 이루어지고 있는 고소득 농업품목으로서 인기가 높은 품종중의 하나로 대두되고 있다. 이러한 약용버섯을 이용한 산업화의 방향은 일본에서 암치료제의 개발로 이어

졌으며, 그 결과 구름버섯의 추출물을 이용한 Krestin(PSK)과 치마버섯 추출물로 제조된 Sonifilan(SPG), 표고버섯의 Lentinan (LNT) 등을 비롯하여 여러 가지 형태의 의약품이 개발 시판되고 있다. 최근 국내에서도 상황버섯 균사체를 이용한 항암성 의약품이 제조되어 시판중에 있으며 이러한 움직임은 향후에도 더욱 활발해질 것으로 예상된다. 신령버섯내의 주요 항암성분인 1,6- 및 1,3-β-D-glucan은 sarcoma 180/mice에 대하여 저해활성이 90%이상 나타나는 것으로 보고되면서 이 버섯의 추출성분에 대한 항암 및 면역기능성에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다(2-7). 항돌연변이연구로서 자실체로부터의 추출물이 benzopyrene에 의한 돌연변이를 저지함과 동시에 그 물질의 주체가 linoleic acid임이 밝혀졌다(8). 또한 자실체로부터의 단백질단백체가 MethA 암세포의 성장을 저해하며(9), 균사체로부터 분리된 단백질단백체도 쥐체내

Corresponding author : Ju-Nam Kim, Division of Food, Beverage & Culinary Arts, Yeungnam College of Science & Technology, Daegu 705-703, Korea
E-mail : jnkim@ync.ac.kr

의 Sarcoma-180에 대하여 아주 높은 저지효과를 나타내었으며 이는 숙주의 면역체계의 활성화에 의한 것으로 추측되고 있다(10). 또한 자실체의 열수추출액도 쥐에 경구투여시에 T-cell과 같은 림프계가 활성화되어 세포수의 증가를 유도한다는 사실도 보고되었다(11). 이 버섯의 자실체로부터 산용매 추출물 역시 두드러진 암세포의 독성작용이 있음이 보고된바 있으며 cell cycle 분석에서도 MethA 종양세포의 S phase의 loss를 유도한다는 사실이 밝혀졌다(12). Ebina와 Fujimiya(13)는 여러 가지 추출조건 가운데 ammonium oxalate 추출액의 항종양활성이 가장 가장 강한 것으로 보고하였으며, 이들 물질은 배지상에서도 상당한 정도의 macrophage chemostatic factor의 활성을 일으킴을 보고하였다. 신령버섯의 지용성 chloroform/methanol 추출물은 sacoma 180을 가지는 쥐에 대한 항종양 실험 결과 경구투여를 통해서 종양의 성장이 상당히 저지됨을 확인하고 이를 nuclear magnetic resonance (NMR) 등으로 분석한 결과 ergosterol임이 밝혀졌으며(14), 분자구조 연구로는 자실체로부터 추출된 저분자 중에는 항종양 활성물질이 평균 분자량 20 KDa의 α -1,4-glucan- β -1,6-glucan 복합체가 주성분으로서 in vitro에서 정상 세포에는 영향을 주지않으면서 MethA 종양세포에 선택적인 독성 작용이 있음이 보고된바 있으며(15), 또한 Mizuno 등(16)은 액배양으로 얻은 균사체의 열수추출 다당체가 자실체의 β -1,6-glucan과는 완전히 다른 glucomannan에 측쇄로서 β -1,2-linked D-glucopyranosyl과 β -D-glucopyranosyl-3-O- β -D-mannopyranosyl 잔기가 결합된 구조를 취하고 있음을 밝혔다. 다양한 구조의 β -glucan이 여러가지 종양에 대해 저해 효과를 가진다는 사실과 함께 최근 꽃송이버섯에서도 다량의 면역기능성 β -glucan이 확인되었으며, Ohno 등(17)은 이 버섯으로부터의 열수 및 알칼리 그리고 열알칼리성 추출물이 NMR 분석결과 6-branched 1,3- β -glucan 구조임과 동시에 쥐의 sarcoma 180 고형암에 대해서도 항종양활성을 나타냄을 보고하였다. 이러한 기능성 약용버섯의 인공재배역사는 그렇게 길지 않은 관계로 동양권에서는 생산량이 수요에 비하여 많이 부족한 실정이며 특히 재배시 괴균병을 비롯한 여러가지 병해충 예방법이 아직 확립되어 있지 않은 관계로 재배농가들이 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다. 현재 동양권에서는 우리 나라와 일본, 중국에서 벗짚과 사탕수수, 계분을 이용하여 주로 생산하고 있으며, 최근 첨가공식품 제조후 폐기되는 부산물에 사탕수수를 혼합·발효시켜 만든 배지로 재배되는 신령버섯이 품질과 향기에서 우수하여 국내는 물론 국외에서도 외국의 구매자는 물론 소비자들 및 구매선호도가 아주 높아 현재는 대일본수출량이 꾸준히 늘어나고 있는 상황에 있다. 또한 따라서 이들 버섯에 대한 품질의 우수성을 확인하고 수출상품의 경쟁력을 높이기 위한 학술적 근거 제공의 목적으로 면역기능성에 대한 비교연구가 필요할 것으로 사료되어 국내의 산지별로 버섯을 수집하여 사용배지에 따른 일차적인 암세포독성 및 면역기능성

에 관한 연구결과를 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 버섯자실체는 가공부산물인 최을 사탕수수에 약 10% 첨가하여 야적발효로 제조된 배지를 이용하여 재배생산된 버섯으로서 경북 칠곡군 기산면에 소재한 신령버섯 생산농가로부터, 벗짚에 사탕수수를 혼합 발효시킨 배지를 사용한 국내의 경산 및 경주산버섯은 농가로부터 직접 구입하여 사용하였다. 그 외 일본 및 중국산은 수입업자를 통하여 구입, 사용하였으며, 실험에 사용된 버섯은 생버섯 혹은 일정온도에서 열풍건조된 형태의 자실체를 사용하였다.

시료의 조제

국내외에서 생산된 건조버섯 25 g을 waring blender로 마쇄한 후 목적에 따라 methanol, 물, ethanol을 사용하여 추출, 감압농축시켰다. 농축된 시료는 동결건조로 갈색의 분말을 만든 다음 필요에 따라 적정농도로 녹여 항암효과실험에 사용하였다. 신령버섯내의 다당체의 추출은 Ohno 등(3)의 방법에 건조시킨 자실체로부터 추출하였다. 먼저 Fig. 1에 나타난 바와 같이 분말시료 25 g에 $CHCl_3$ /methanol 혼액(1:1)로서 지용성 성분을 제거한 후 잔사에 대하여 121°C, 2시간 동안 처리한 추출액에 ethanol을 가하여 침전분획을 얻었다. 그리고 잔사에 대하여 10% NaOH/5% urea 용액으로 2일간 4°C에 방치한 다음 추출액을 모아 투석후 동결건조하였으며, 잔사에 대해서도 65°C에서 1시간동안 10% NaOH/5% urea 용액으로 추출, 투석 및 동결건조시켰다.

세포주의 배양

본 실험에 사용된 murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cell 의 배양은 RPMI-1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 농도에서 배양하였으며 사용시에는 1~4 x 10⁷ cells/mL로 조정하였다. 항종양실험에는 Human colon carcinoma cell line인 HT29 cell 과 human heptoma cell line HepG2를 사용하였다. HT29 cell은 RPMI-1640 배지에 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicilline G/streptomycin)을 첨가하여 배양하였고, HepG2 cell은 F-10배지에 10% FBS, 1% antibiotics를 첨가, 배양하였으며, 이 두 cell은 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 2~3일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

항돌연변이 실험

시료와 변이원의 돌연변이 및 항돌연변이-효과에 대한 실험은 Ames와 Maron의 방법(18)에 따라 preincubation test로 수행하였다. 먼저 phosphate buffer 0.5 mL(직접돌연변이원), 12시간 배양된 *Salmonella typhimurium* TA100 [*hisG* 46, *rfa*(Δ), *uvrB*, R-factor] 0.1 mL, 시료 50 μ L, mutagen 50 μ L를 ice bath에 담긴 cap tube에 첨가하여 가볍게 섞은 다음 37°C에서 30분간 예비 배양한 후 45°C의 top agar 2 mL씩을 각 tube에 첨가하고 3초간 혼합하였다. 이것을 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양후 revertant colony 숫자를 계수하였다.

항종양실험

시료에 대한 세포독성은 Green 등(19)의 방법에 따라 MTT assay 방법을 이용하였다. 추출 시료는 dimethylsulfoxide (DMSO) 혹은 증류수에 녹여 0.2 μ m membrane filter로 여과하였으며 1×10^5 cell/mL의 농도로 배양된 cancer cell을 96-well microtiter plate에 100 μ L씩 첨가하고 각 시료를 1 mg, 0.5 mg으로 각각 첨가하여 37°C의 5% CO₂에서 48시간 배양하였다. 이때 칩과 사탕수수 혼합 발효배지 그리고 벚짚과 사탕수수 혼합발효배지, 벚짚발효배지만으로 재배된 국내산 생버섯으로부터의 methanol 추출물도 동시에 처리하였으며 각 농도마다 모두 3개씩 실시하였다. 대조군은 시료대신 PBS를 동량 첨가하였으며 배양이 끝난 microplate의 well에 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (5 mg/mL)] 용액 10 μ L를 각 well에 가해주고 다시 4시간 더 배양하였다. 배양종료시 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액을 제거한 다음 well에 DMSO 100 μ L를 첨가해 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다

면역증강활성실험

면역활성실험에서 Raw 264.7 세포는 2×10^6 cells/mL가 되도록 분주하고 37°C, 5%의 CO₂하에서 전 배양하였으며, 배양된 세포중에 비부착성 세포를 제거한 다음 hemocytometer를 이용하여 5×10^5 cells/mL로 조정하여 96 well에 200 μ L씩 분주(10^5 cells) 하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 5~6 시간 배양하였다. 배양후 비부착성 세포를 제거하고 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 24시간 배양 한 다음 대식세포의 활성정도를 측정하였다. 대식세포의 활성을 나타내는 NO의 양은 Ding등의 방법(20)에 따라 간접법으로 NO₂의 양을 측정하였다. 즉 100 μ L의 배양액과 동일한 동량의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% naphthylene diamine dihydrochloride/2% H₃PO₄)를 섞고 실온에서 방치한후 ELISA reader(DYNATECH, MR 5000)를 이용해 540 nm에서 측정하였다. NO₂의 농도는 sodium nitrate를 회색하여 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다.

결과 및 고찰

사용배지에 따른 항종양 효과 검색

버섯에서 추출용매에 따른 항종양 물질의 저해효과를 검토하기 위하여 먼저 MTT assay로 분석한 결과 Table 1에서 처럼 methanol 추출물이 비교적 높은 효과를 나타내었다. 이들중 methanol 추출물만을 이용하여 human colon carcinoma cell line인 HT29 와 human heptoma cell line HepG2에 대하여 항종양실험을 다시 수행한 결과, Table 2와 같이 결장암 세포에 대해서 농도에 따라 재배시 사용된 배지에 따라 1.5~3.5배까지의 차이를 나타내었다. 간암세포에 대해서도 약 1.3~2.4배까지의 저해효과를 볼 수 있었으며 이는 발효배지의 조성에 따른 차이로 추측된다. 현재 시중에는 음료 및 분말형태의 차를 비롯하여 농가에서는 건조버섯을 간단하게 열수추출하여 팩에 담은 형태로 유통되고 있으며 이를 위하여 국내산 신령버섯간에 지역별로 다르게 사용되는 생산배지사이에 나타나는 항종양효과를 생버섯을 이용한 methanol 추출물에 대하여 간단히 비교 검토하였다. 그 결과 약 4.5% 수율의 동결건조 분말을 얻을 수 있었으며, 이에 대한 항종양 실험결과 상기의 결과처럼 일반적으로 많이 사용되는 벚짚과 사탕수수 혼합배지보다는 벚짚대신에 칩을 사탕수수에 일부 혼합하여 발효시킨 배지에서 생산된 버섯에서 상당히 높은 종양 저해효과를 나타내었다. 생버섯에 대한 비교결과에서는 Table 3에서와 같이 결장암에 대한 처리시 칩을 사용한 배지의 버섯에서는 일반 벚짚사용 배지보다 저농도에서 약 1.5배, 고농도에서 약 1.6배의 높은 저해효과를 나타내었으며, 간암세포에서는 저농도에서 약 2.1배, 고농도에서 약 2.8배의 더욱 높은 저해효과를 나타내었다. 이러한 결과는 농가에서 버섯재배 배지의 선정시 생산제품의 고품질화를 유도하고 경쟁력있는 상품화를 위해서 고려해야 할 중요한 사항으로 판단되며, 또한 경제적이면서 기능성이 있는 발효배지의 제조관련 연구에서 칩사용의 경제성을 고려하면서 보다 강화되어야 할 것으로 본다.

Table 1. Inhibitory effects of extracts from the fruiting body of raw *A. blazei* cultivated with *Pueraria thunbergiana* plus sugar cane bagasse media on the growth of cancer cells

Extract	Inhibition rate (%)			
	HT29		HepG2	
	0.5 mg/mL	1 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL
Water-Ex.	10	12	15	21
Ehanol-Ex.	13	36	7	22
Methanol-Ex.	20	50	25	32

Table 2. Inhibitory effects of methanol extracts from the dried fruiting body of *A. blazei* on the growth of cancer cells

Cultivated area	Used media	Inhibition rate (%)			
		HT29		HepG2	
		0.5 mg/mL	1 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL
Korea	<i>Pueraria thunbergiana</i> plus sugar cane bagasse	25	45	32	63
Korea	Rice straw plus sugar cane bagasse	20	30	38	49
Japan	Rice straw plus sugar cane bagasse	28	45	27	50
China	Rice straw only	4	13	27	26

Table 3. Inhibitory effects of methanol extracts from the raw fruiting body of *A. blazei* cultivated in the Korean farm on the growth of cancer cells

Used media	Inhibition rate (%)			
	HT29		HepG2	
	0.5 mg/mL	1 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL
<i>Pueraria thunbergiana</i> plus sugar cane bagasse	46	56	54	88
Rice straw plus sugar cane bagasse	30	34	26	31

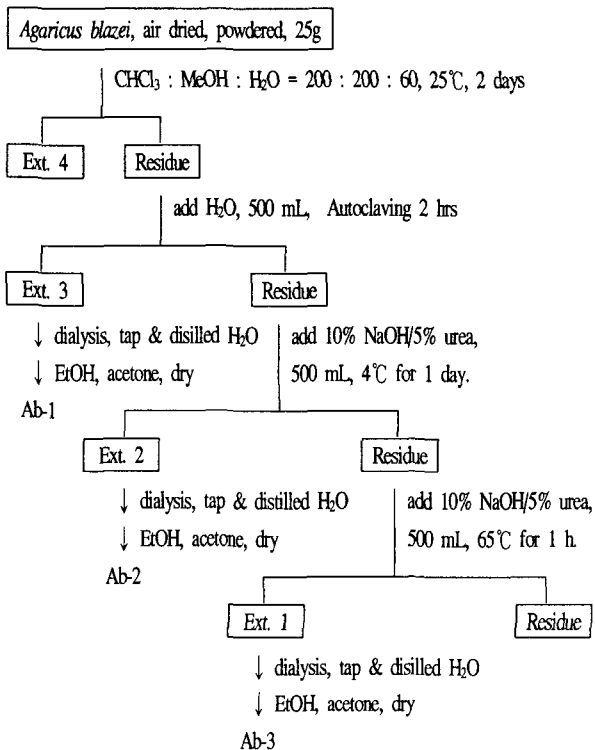


Fig. 1. Fractional preparations of water-soluble polysaccharide from the dried fruiting body of *Agaricus blazei* Murill.

항돌연변이효과 검증

건조 분말시료를 사용하여 Fig 1의 순서에 따라 지용성 성분을 제거한 다음 열수 및 냉·온 알칼리성 조건에서 다당체를 분리하여 Ab-1, Ab-2, Ab-3 분획을 얻었으며 이에 대하여 *Salmonella typhimurium* TA100을 이용한 항돌연변이 실험을 수행하였다. 그 결과 Table 4에서 처럼 생산지역 및 사용배지에 따른 큰 차이는 나타나지 않았지만 전반적으로 Ab-3 fraction에서 비교적 높은 항돌연변이 효과를 나타내었으며 처리농도에 따라서는 차이가 나타났다.

Table 4. Antimutagenic effects of fractions isolated from the dried fruiting body of *A. blazei* on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) using *Salmonella typhimurium* TA100

Cultivated area (used media)	Fractions	Concentrations (%)	Inhibition rate (%)
Korea (<i>Pueraria thunbergiana</i> plus sugar cane bagasse)	Ab-1	5	66
		10	70
	Ab-2	5	73
		10	79
	Ab-3	5	70
		10	91
Japan (Rice straw plus sugar cane bagasse)	Ab-1	5	63
		10	75
	Ab-2	5	70
		10	80
	Ab-3	5	54
		10	80
China (Rice straw only)	Ab-1	5	60
		10	75
	Ab-2	5	70
		10	80
	Ab-3	5	70
		10	88

면역증강활성효과 검색

다당체에 의한 면역세포의 활성도를 측정하기 위하여 macrophage Raw 264.7 cell에 분리 정제한 fraction을 적용한 결과 Table 5에서처럼 취사용 자실체의 hot-NaOH 추출액인 Ab-3 fraction이 동일한 추출조건에 다른 자실체에 비하여 약 45~58%의 NO 생성 증가를 나타내었다, 그 외 열수추출 fraction에서는 유의적인 큰 증가는 없으나 사용배지에 상관 없이 대체로 알칼리 추출 fraction에서 NO 생성이 증가하는 경향이 뚜렷하게 나타났다. 이 같은 결과는 Ohno 등(17)이

브라질산 신령버섯자실체로 부터의 cold NaOH extracts가 처리농도에 따라 Sarcoma 180 고형암에 대하여 약 52-77%의 저해효과와, hot NaOH extract의 63-99%의 높은 저해효과, 열수추출물이 최고 5%의 낮은 저해율의 연구결과와 유사한 경향을 보이고 있다. 대식세포는 LPS 및 IFN- γ 와 같은 물질에 의하여 특이하게 활성화 되어, 생성된 NO가 혈관확장, 신경전달 및 숙주방어등의 기능을 가지는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 LPS를 macrophage cell에 단독으로 사용하였을 때는 약 3.2배의 NO 생성의 증가를 나타내었지만 시료와 함께 사용하였을때는 최고 약 6배의 생성량에 이르는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 신령버섯의 β -glucan성 다당류가 대식세포의 활성화에 직접적인 영향을 주며 활성화된 대식세포는 NO를 포함하여 cytokine 및 반응중간 대사산물의 생성을 촉진하여 이물질에 대한 직접적인 세포독성과 성장억제, 식균작용과 같은 면역반응을 유도한다고 볼 수 있다. 이에 관한 연구로는 Somer 등(21)이 활성화된 대식세포가 정상세포에는 무관하나 넓은 범주의 암세포를 살해할 수 있다고 보고하였으며 Higuchi 등(22)은 표적 암세포에 대한 활성화된 대식세포의 세포독성능은 NO의 감수성이 따라 달라질 수 있음을 보고한 바 있다.

Table 5. Contents of nitric oxide (NO) production of Raw 264.7 macrophage activated by the polysaccharide fractions extracted from the dried fruiting body of *A. blazei*
(unit : μ M/L)

Cultivated area (used media)	Fractions	Polysaccharide extracts (μ g/mL)			
		20	40	60	80
Korea (<i>Pueraria thunbergiana</i> plus sugar cane bagasse)	Ab-1	6.99	6.45	6.79	6.83
	Ab-2	8.16	7.76	7.49	6.95
	Ab-3	12.64	13.70	13.15	12.81
Japan (Rice straw plus sugar cane bagasse)	Ab-1	6.87	6.99	6.95	6.12
	Ab-2	8.49	9.87	8.49	7.70
	Ab-3	7.74	8.99	8.62	7.91
China (Rice straw only)	Ab-1	6.99	7.24	6.54	6.04
	Ab-2	9.32	11.03	9.28	8.49
	Ab-3	8.78	9.91	9.41	8.24

요 약

본 연구에서는 건강기능성 버섯으로 알려진 *A. blazei*에 대하여 재배시 농가에서 사용하는 배지의 종류에 따라 생산된 자실체의 면역 기능성 차이를 규명 할 목적으로 in vitro 상태에서 추출다당체의 세포에 대한 영향을 살펴보았다. 기능성 약용 버섯인 *A. blazei*에 대하여 재배시 농가에서 사

용하는 배지에 따른 in vitro 상태에서 세포에 대한 다당체의 영향을 검토하였다. 추출용매에 따른 항종양 물질의 저해효과는 약 25~30% 수율범위의 methanol 추출물이 비교적 높은 효과를 나타내었다. 이 추출물을 이용하여 human colon carcinoma cell line인 HT29와 human heptoma cell line HepG2에 대한 항종양실험 결과 결장암 세포에 대한 효과는 고농도로 처리시 사용된 생산배지에 따라 1.5~3.5배까지의 차이를 나타내었다. 간암세포에 대해서도 고농도로 처리시 사용된 생산배지에 따라 1.3~2.4배까지의 저해효과를 볼 수 있었으며 이는 배지상의 조성과 발효에 따른 차이로 추측된다. 국내산 신령버섯간 지역별로 다르게 사용되는 생산배지 사이에 나타나는 항종양효과에서 일반적으로 많이 사용되는 볏짚과 사탕수수 혼합배지보다는 볏짚대신에 칩을 사탕수수에 일부 혼합하여 발효시킨 배지에서 생산된 버섯에서 상당히 높은 종양 저해효과를 나타내었다. 즉 결장암에 대한 처리시 저농도에서는 약 1.5배, 고농도에서 약 1.6배의 저해효과를 나타내었으며, 간암세포에서는 저농도에서 약 2.1배, 고농도에서 약 2.8배의 더욱 높은 저해효과를 나타내었다. 건조 분말시료에서 지용성 성분을 제거한 후 열수 및 냉·온 알칼리성 조건으로 다당체를 분리하여 Ab-1, Ab-2, Ab-3 분획을 얻었으며, 이들 시료로 *Salmonella typhimurium* TA100을 이용한 항돌연변이 실험을 수행한 결과 재배지역과 사용배지에 따른 큰 차이는 나타나지 않았지만 대체로 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. 면역세포의 활성화정도를 측정하기 위하여 macrophage Raw cell에 상기의 fraction을 적용해본 결과 칩 사용 생산버섯의 알칼리성 추출 Ab-3 fraction이 사용한 다른 배지에 비하여 약 45~58% NO 생성 증가를 나타내었으며, 기타 열수추출 fraction에서는 유의적인 큰 증가는 없었으나 알칼리 추출조건에서는 대체로 증가하는 경향이 뚜렷하게 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2001학년도 영남이공대학 연구조성비 지원에 의해 이루어진 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Mizuno, T. (1989) Development and utilization of bioactive substances from medicinal and edible mushroom fungi(1). The Chemical Times, 1, p.12-21
- Higaki, M., Eguchi, F. and Watanabe, Y. (1997) A stable culturing method and pharmacological effects of the *Agaricus blazei*. Nippon Yakurigaku Zasshi Japanese., 110,

- Suppl. 1, p.98-103
3. Ohno, N., Furukawa, M., Miura, N.N., Adachi, Y., Motoi, M. and Yadomae, T. (2001) Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biol. Pharm. Bull.*, 24, 820-828
 4. Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T. and Nakamura, T. (1989) Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr. Res.*, 186, 267-73
 5. Kawagishi, H., Nomura, A., Yumen, T., Mizuno, T., Hagiwara, T. and Nakamura, T. (1988) Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. *Carbohydr. Res.*, 183, 150-154
 6. Mizuno, T., Inagaki, R., Kanto, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. and Asakura, A. (1990) Antitumor activity and some properties of water-insoluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agri. Biol. Chem.*, 54, 2897-2905
 7. Mizuno, T.R., Kanto, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. and Asakura, A. (1990) Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agri. Biol. Chem.*, 54, 2889-2896
 8. Osaki, Y., Kato, T., Yamamoto, K., Okubo, J. and Miyazaki, T. (1994) [Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*, Jun-17]. *Yakugaku Zasshi. Japanese*, 114, 342-50
 9. Itoh, H., Ito, H., Amano, H. and Noda, H. (1994) Inhibitory action of a (1→6)-beta-D-glucan-protein complex (F III-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill ("himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn. J. Pharmacol.* 66, 265-71
 10. Ito, H., Shimura, K., Itoh, H. and Kawade, M. (1997) Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. *Anticancer Res.*, 17, 277-84
 11. Mizuno, M., Morimoto, M., Minato, K. and Tsuchida, H. (1998) Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 434-437
 12. Fujimiya, Y., Suzuki, Y., Oshiman, K., Kobori, H., Moriguchi, K., Nakashima, H., Matumoto, Y., Takahara, S., Ebina, T. and Katakura, R. (1998) Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol. Immunother.*, 46, 147-159
 13. Ebina, T. and Fujimiya, Y. (1998) Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. *Biotherapy.*, 11, 259-265
 14. Takaku, T., Kimura, Y. and Okuda, H. (2001) Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *J. Nutr.*, 131, 1409-1413.
 15. Fujimiya, Y., Suzuki, Y., Katakura, R. and Ebina, T. (1999) Tumor-specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill. *Anticancer Res.*, 19, 113-118
 16. Mizuno, M., Minato, K., Ito, H., Kawade, M., Terai, H. and Tsuchida, H. (1999) Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* murill. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 47, 707-714
 17. Ohno, N., Miura, N.N., Nakajima, M. and Yadomae, T. (2000) Antitumor 1,3-beta-glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. *Biol. Pharm. Bull.*, 23, 866-872
 18. Ames, B.N. and Maron, D.M. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 113, 173-215
 19. Green, L.M., Reade, J.L. and Ware, C.F. (1984) Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods.*, 70, 257-268
 20. Ding, A.H., Nathan, C.F. and Stuehr, D.J. (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.*, 141, 2407-2412
 21. Somers, S.D., Mastin, J.P. and Adams, D.O. (1983) The binding of tumor cells by murine mononuclear phagocytes can be divided into two qualitatively distinct types. *J. Immunol.*, 131, 2086-2093
 22. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H. and Osawa, T. (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.*, 15, 144, 1425-1431