

반응표면분석에 의한 해송이버섯(*Hypsizigus marmoreus*) 추출물 중 단백다당체의 암세포 성장억제효과

정은봉¹ · 조진호^{2*} · 조승목²

¹바이오랜드 안산연구소
²한국식품연구원

Cytotoxic Effect of Isolated Protein-bound Polysaccharides from *Hypsizigus marmoreus* Extracts by Response Surface Methodology

Eun Bong Jung¹, Jin Ho Jo^{2*}, and Seung Mock Cho²

¹Bioland Ansan factory R&D Center, Gyeonggi 425-839, Korea

²Korea Food Research Institute, Gyeonggi 463-746, Korea

Abstract

This study used response surface methodology (RSM) in an effort to optimize the water extraction conditions of *Hypsizigus marmoreus* in order to increase cytotoxicity activity of the extract. A central composite design was applied to investigate the effects of independent variables, which included the extraction temperature (X_1), extraction time (X_2), the ratio of solvent to sample (X_3) on dependent variables of the extracts, including extraction yield (Y_1) and protein content (Y_2). The estimated optimal conditions were as follows: 51.3°C extraction temperature, 8.2 hrs extraction time, and 46.7 mL/g of solvent per sample. The extract (CE) was extracted at optimal condition and crude polysaccharides (CPS) were obtained from CE by ethanol precipitation, dialysis, and freeze drying. Neutral (NPS) and acidic (APS) fraction of polysaccharides were separated from CPS by ion chromatography. The growth inhibitory effects of the APS (0.5 mg/mL) on AGS human cancer cells were 73.97%. CPS showed the highest growth inhibitory effects on HepG2 human cancer cell at 0.5 mg/mL. However all fraction polysaccharides from *Hypsizigus marmoreus* showed lower than 20% growth inhibition on SW480 human cancer cell.

Key words: *Hypsizigus marmoreus*, response surface methodology, anticancer, growth inhibitory, mushroom

서 론

세계적으로 사망원인의 1, 2위를 차지하고 있는 암에 대한 치료는 대부분 합성화학약품을 이용한 치료방법으로 조절 및 면역기능에 이상을 초래하고 암세포 이외의 정상세포에도 독성을 나타내고 있어 특이적이며 선택적으로 작용하는 천연항암제를 생약재로부터 개발하려는 많은 연구가 수행되고 있다(1,2).

천연물 중 생약재를 포함한 herb류가 가장 많이 연구되고 있으며, 버섯류도 향미 및 영양성분 이외에 항암활성 및 면역증강효과, 항산화효과 등의 약리작용 때문에 최근에는 건강식품 및 의약품 소재로 널리 이용되고 있다(3).

여러 종류의 버섯들이 항암효과가 있음이 알려졌는데 버섯이 항암효능을 나타내는 주된 원인은 버섯 속에 함유되어 있는 단백다당체 때문이라는 것이 밝혀지고 있다(4,5). 현재 버섯 유래의 항암효과를 갖는 다당류는 표고버섯(*Lentinus*

edodes)의 성분인 lentinan, 치마버섯(*Schizophyllum commune*)의 성분인 schizophyllan, 구름버섯(*Coriolus versicolor*)으로부터 krestin 등이 있으며 이들은 일본과 동남아 등지에서 면역증강용 항암제로 시판되고 있다(6-8).

아가리쿠스 버섯의 조단백다당류는 추출액에서 분리된 crude한 물질이지만, 위암과 간암 세포주 등의 항암효과 연구에서 뛰어난 저해효과를 보였으며, 마우스를 이용한 *in vivo* 실험에서도 활성이 뛰어난 물질임이 확인되었다(9). 또한 항암효과를 갖는 단백다당체는 담자균류의 수용성 추출액을 정제함으로써 제조될 수 있는 것으로 알려져 있다(10).

해송이버섯은 만가닥느티버섯(*Hypsizigus marmoreus*)의 일종으로 담자균류의 송이과(*Tricholomataceae*) 느티버섯속(*Hypsizyus*)에 속하는 버섯의 일종이다(11,12). 이러한 만가닥느티버섯의 생리적 특징으로는 암세포성장억제효과와 항산화효과(13,14)와 만가닥느티버섯에서 분리한 hypsin의 항진균효과, 항종양효과 등의 생리활성에 관한 여러 보고

*Corresponding author. E-mail: jhjo@kfri.re.kr
Phone: 82-31-780-9091, Fax: 82-31-709-9876

Table 1. Experimental range and values of the independent variable in the central composite design for water extraction conditions of *Hypsizigus marmoreus*

Independent variables	Symbol	Levels				
		-1.68	-1	0	1	1.68
Extraction temperature (°C)	X ₁	8	25	50	75	92
Extraction time (hours)	X ₂	2	4	7	9	11
Ratio of solvent to sample (mL/g)	X ₃	23	30	40	50	57

가 있다(15,16).

또한, 이러한 해송이버섯은 인공재배가 가능하고 맛이 좋아 최근 미국, 중국, 일본, 한국에서 소비량이 증가하고 있다(17). 따라서 본 연구에서는 항암효과가 뛰어난 물질로 알려진 조단백당류를 만가닥느티버섯의 일종인 해송이버섯에서 효과적으로 추출하고자 반응표면분석을 이용하여 추출 방법을 확립하고 이 추출물을 이용하여 조다당체를 얻고 이 온교환 수지를 이용하여 분리한 뒤 분획별 암세포성장 억제율을 알아보았다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용한 해송이버섯은 (주)해송산업(강원도 강릉시)에서 제공받았으며 35°C에서 24시간 건조한 후 분쇄하여 분말로 만들어 -20°C 냉동고에 보관하며 실험에 이용하였다.

추출조건 설정을 위한 실험계획

본 실험에서는 추출조건에 따른 추출특성의 모니터링과 추출조건의 최적화를 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)(18)을 사용하였다. 추출조건에 대한 실험계획은 중심합성계획(19)을 사용하였으며, 반응표면분석을 위해 MINITAB statistical software(Version 13, Minitab Inc., State College, PA, USA)를 사용하였다. 이때 추출조건은 시료에 대한 추출온도(X₁) 8~92°C와 추출시간(X₂) 2~11시간과 추출용매비(X₃) 23~57 mL/g이었으며, 이들 독립변수들은 5단계(-1.68, -1, 0, 1, 1.68)로 부호화(Table 1)하여 중심합성계획에 따라 20구간으로 설정하였다(Table 2). 또한 이들 독립변수에 의해 영향을 받는 종속변수(Y_n)는 수율(Y₁)과 단백질 함량(Y₂)으로 하였다.

수율

수율은 추출액을 동결건조한 후 추출액 조제에 사용한 원료의 건조중량에 대한 고형분 양(%)으로 나타내었다.

총당 및 단백질 함량

총당 함량 분석은 Saha와 Brewer(20)의 방법에 따라 phenol-sulfuric acid 법으로 실시하였다. 즉, 5% phenol (w/v) 0.2 mL와 sulfuric acid 1 mL를 시료 0.2 mL와 반응시킨 후 glucose를 표준당으로 하여 UV-visible spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)로 490 nm

Table 2. Central composite design and responses of dependent variables for water extraction conditions to independent variables

Exp. No.	Coded levels of variables			Responses	
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
1	-1	-1	-1	32.5	14.16
2	1	-1	-1	49.3	15.34
3	-1	1	-1	34.8	16.34
4	1	1	-1	52.3	16.22
5	-1	-1	1	34.0	15.84
6	1	-1	1	51.7	18.45
7	-1	1	1	42.5	19.54
8	1	1	1	54.3	18.88
9	-1.68	0	0	17.5	14.51
10	1.68	0	0	61.8	1.91
11	0	-1.68	0	41.6	14.16
12	0	1.68	0	54.7	20.61
13	0	0	-1.68	44.0	18.54
14	0	0	1.68	54.7	19.15
15	0	0	0	55.1	19.87
16	0	0	0	54.9	21.54
17	0	0	0	52.1	19.94
18	0	0	0	53.4	21.61
19	0	0	0	54.4	20.75
20	0	0	0	54.3	20.04

X₁ (extraction temperature, °C), X₂ (extraction time, hrs), X₃ (ratio of solvent, mL/g). Y₁ (extraction yield, %), Y₂ (protein contents, %).

에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 함량은 Lowry-Folin 방법(21)으로 분석하였다. 즉, 시료 0.5 mg에 Lowry-Folin 반응을 실시한 후 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 740 nm에서 흡광도를 측정하였다.

조다당체의 추출 및 분리

해송이버섯 건조분말 50 g을 해송이버섯 최적추출조건인 증류수 2,335 mL에 넣고 교반하며 51.3°C에서 8.2시간 동안 추출하였다. 추출액의 분리를 위하여 여과지(Adventec 5C filter paper, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과 후 여과액을 evaporator로 50 mL까지 농축한 후 동결건조 하여 물추출물(CE)을 얻었다. 물추출물을 40 brix의 농도로 제조한 후 3배량의 에탄올(순도 95%이상)을 넣고 4°C에서 24시간 동안 침전 대기하였다. 원심분리를 통하여 상등액을 제거하고 침전물을 분리하여 소량의 증류수로 침전물을 녹인 후 dialysis tube(Spectra/Por. Membrane, MWCO 12,000~14,000 Da, Spectrum Laboratories, CA, USA)에 넣고 3일간 투석을 실시하였다. 투석 후 침전물을 여과하여 제거하고 동결건

조 하여 조다당체(CPS)를 최종적으로 분리하였다.

중성다당체와 산성다당체의 분리

조다당체 1.5 g을 20 mL의 deionized distilled water에 용해시켜 DEAE cellulose resin이 충전된 ion chromatography column에 적용시켜 3차 증류수를 전개용매로 용출하였다. 흡착되지 않은 용출액을 동결건조 하여 중성다당체(NPS)를 분리하였다. Column에 흡착된 성분을 분리하기 위하여 2 M의 NaCl 수용액을 전개용매로 사용하여 용출하였고 용출액에 포함된 NaCl을 제거하기 위하여 용출액을 dialysis tube(Spectra/Por. Membrane, MWCO 12,000~14,000 Da, Spectrum Laboratories)에 넣고 4일간 투석한 후 동결건조 하여 산성다당체(APS)를 분리하였다.

항암활성능 평가를 위한 암세포 성장억제 효과

해송이버섯 각 추출물의 암세포의 성장억제 효과는 Green 등(22)의 방법에 따라 MTT assay를 이용하여 검토하였다. 실험에 사용된 위암 세포주 AGS(stomach adenocarcinoma), 간암세포주 HepG2(liver hepatoblastoma), 대장암 세포주 SW480(colon adenocarcinoma)은 10% fetal bovine serum(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 streptomycin-penicillin(Gibco BRL) 1%가 첨가된 RPMI-1640 medium(Gibco BRL)에 배양하였으며, 고착성을 가지는 세포를 cell scraper로 회수, 부유시켜서 사용하였다.

MTT assay는 시료 20 µL와 세포 배양에서 얻은 single cell suspension(5×10^4 cells/mL) 180 µL를 96-well에 함께 넣어 4일 동안 37°C를 유지하면서 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 4일 후 MTT(5 mg/mL) 시약을 넣고 다시 4시간 동안 반응시켰다. 이것을 1,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 DMSO 150 µL를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시킨 후, 540 nm에서 microplate reader(Thermomax, Molecular device Co., Virginia, USA)로 흡광도를 측정하였다. MTT assay에 의해 측정된 대조군과 실험군의 O.D. 값을 다음과 같이 아래의 계산식에 의해 세포성장 억제효과를 구하였다.

$$\text{Growth inhibition rate (\%)} = \left\{ \frac{\text{대조군 O.D.} - \text{실험군 O.D.}}{\text{대조군 O.D.}} \right\} \times 100$$

통계분석

해송이버섯 추출조건에 따른 추출물의 특성은 MINITAB program(Minitab Inc., Minitab Statistical software, USA)

을 사용하여 반응표면회귀분석으로 통계처리 하였다. 반응표면 분석에서 독립변수(X_1, X_2, X_3)에 대한 2차 회귀모형은 다음과 같다.

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_{11}X_1^2 + A_{22}X_2^2 + A_{33}X_3^2 + A_{12}X_1X_2 + A_{13}X_1X_3 + A_{23}X_2X_3$$

여기서 Y는 종속변수, X_1, X_2, X_3 는 독립변수, A_0 는 절편, A_n 은 회귀계수이다.

반응표면분석에 의한 해송이버섯 추출조건에 최적화는 MINITAB program을 이용하여 각각의 독립변수의 특성값에 대한 목표값을 설정하여 목표값을 만족시키는 인자의 최적 조합을 결정하였다.

또한 실험결과는 평균 ± 표준편차(Mean ± SD)로 표시하였으며, 통계적 유의성은 SAS(statistical analysis system) program을 이용하여 5% 수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

추출조건에 따른 추출물의 특성

해송이버섯의 유효성분을 추출하기 위하여 중심합성계획에 의한 20구간의 추출조건에 따라 추출시험을 실시하고, 이때 얻어진 각각의 추출물에 대하여 수율, 단백질 함량을 측정하여 결과를 Table 2에 나타내었다.

각각의 결과를 이용하여 최적 추출조건을 얻고자 반응표면 회귀분석을 실시하여 각 종속변수 즉, 수율과 단백질 함량에 대한 회귀식을 얻었다(Table 3). 독립변수들의 반응표면은 Maple 프로그램으로 용매비, 추출온도, 추출시간을 독립변수로 하여 Fig. 1, 2에 나타내었다.

수율에 대한 추출조건에 대한 영향

해송이버섯의 추출조건에 따른 수율을 측정하여 결과를 Table 2와 같이 17.5~61.8%의 범위로 측정되었으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R²는 0.943으로 유의성이 5%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 3). Table 4는 t-statistic에 근거한 종속변수 Y₁의 상수, 일차항(X_1, X_2, X_3), 이차항(X_1^2, X_2^2, X_3^2), 교차항(X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3)의 계수와 유의성을 나타낸 것으로 상수(p<0.01), 일차항(p<0.05)의 계수와 유의성이 있는 것으로 나타났다.

분산분석의 결과(Table 5), 일차항과 이차항은 통계적으

Table 3. Response surface model for extracting conditions of *Hypsizigus marmoreus*

Responses	Quadratic polynomial model	R ²	p-value
Y ₁	$Y_1 = 54.0749 + 10.127X_1 + 2.8141X_2 + 2.3135X_3 - 5.3569X_1X_1 - 2.3517X_2X_2 - 1.9274X_3X_3 - 0.65X_1X_2 - 0.6X_1X_3 + 0.725X_2X_3$	0.943	0.0001
Y ₂	$Y_2 = 20.7158 - 0.0648X_1 + 1.1322X_2 + 0.805X_3 - 2.754X_1X_1 - 0.5567X_2X_2 - 0.5479X_3X_3 - 0.1312X_1X_2 + 0.0038X_1X_3 + 0.0613X_2X_3$	0.904	0.001

X_1 (extraction temperature, °C), X_2 (extraction time, hrs), X_3 (ratio of solvent, mL/g). Y₁ (extraction yield, %), Y₂ (protein contents, %).

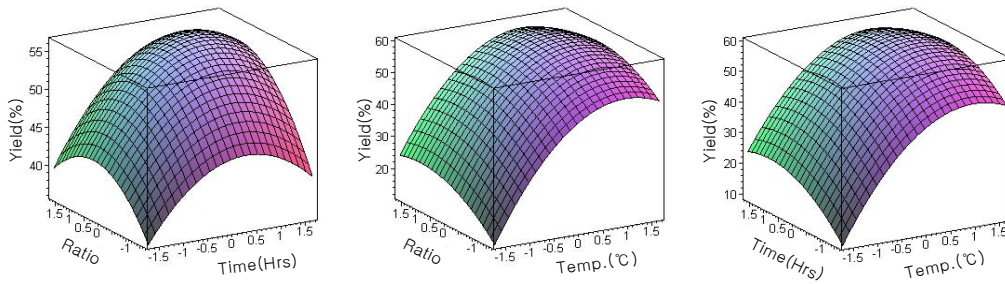


Fig. 1. Response surface for the effects of extraction temperature, solvent ratio, and extraction time on extract yield from *Hypsizigus marmoratus*.

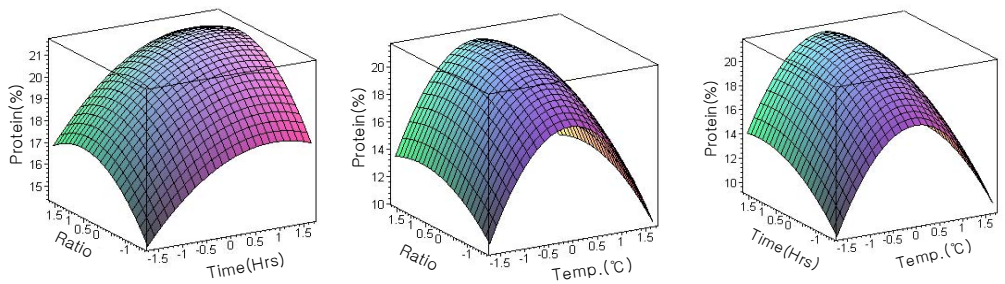


Fig. 2. Response surface for the effects of extraction temperature, solvent ratio, and extraction time on protein contents in *Hypsizigus marmoratus* extracts.

Table 4. Estimated coefficient of the fitted quadratic polynomial equation for different response based on *t*-statistic

	Y ₁		Y ₂	
	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value
Intercept	54.0749	0.001	20.6279	0.001
X ₁	10.1270	0.001	0.3928	0.206
X ₂	2.8141	0.015	1.3208	0.001
X ₃	2.3135	0.036	0.8549	0.015
X ₁ X ₁	-5.3569	0.001	-1.9334	0.001
X ₂ X ₂	-2.3517	0.030	-1.1644	0.002
X ₃ X ₃	-1.9274	0.065	-0.6482	0.045
X ₁ X ₂	-0.6500	0.614	-0.5713	0.164
X ₁ X ₃	-0.6000	0.642	0.1113	0.776
X ₂ X ₃	0.7250	0.575	0.1338	0.732

X₁ (extraction temperature, °C), X₂ (extraction time, hrs), X₃ (ratio of solvent, mL/g). Y₁ (extraction yield, %), Y₂ (protein contents, %).

로 유의성이 있는 것으로 나타났으나(p<0.001) 교차항은 유의성이 인정되지 않았다(p>0.1).

각 추출조건에 따른 수율변화의 반응표면 분석 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 추출용매비가 45배에 가까워질수록 추출수율이 증가하다 다시 감소하는 경향을 보였으며 해송이버섯의 추출온도는 70°C부근까지 증가하다 그 이후 온도에서는 변화가 없는 것으로 나타났다. 그리고 추출시간의 경우 8시간까지 추출수율이 증가하다 그 이후의 온도에서는 추출수율의 변화가 보이지 않았다.

Choi(23)는 상항버섯균사체에서 단백다당체들을 추출할 때 추출온도, 추출용매비 그리고 추출시간이 증가할수록 추출수율이 높아진다고 하여 다소 차이가 있었다.

추출물의 단백질 함량에 대한 추출조건의 영향 중심합성계획에 의한 해송이버섯 추출조건별 단백질 함

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) for response of dependent variables

Responses	Source	DF	SS	MS	F-value	p-value
Yield	Model	9	2076.31	230.701	18.46	0.0001
	Linear	3	1581.85	527.283	42.20	0.0001
	Quadratic	3	483.99	161.332	12.91	0.001
	Cross-product	3	10.46	3.488	0.28	0.839
	Residual	10	124.96	12.496		
	Lack of fit	5	118.73	23.746	19.05	0.003
	Pure error	5	6.23	1.247		
Total	19	2201.27				
Protein	Model	9	108.388	12.0431	10.43	0.001
	Linear	3	35.913	11.9710	10.37	0.002
	Quadratic	3	69.622	23.2073	20.11	0.0001
	Cross-product	3	2.853	0.9509	0.82	0.510
	Residual	10	11.542	1.1542		
	Lack of fit	5	8.337	.6675	2.60	0.159
	Pure error	5	3.205	0.6409		
Total	19	119.930				

량은 Table 2에서와 같이 1.91~21.61%의 범위였으며 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R²는 0.904로 유의성이 5%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 3).

Y₂의 상수, 일차항(X₁, X₂, X₃), 이차항(X₁², X₂², X₃²), 교차항(X₁X₂, X₁X₃, X₂X₃) 중에서 상수(p<0.001), 일차항인 X₂, X₃(p<0.05), 그리고 이차항(p<0.05)이 유의성이 있는 것으로 나타났다(Table 4).

분산분석의 결과 수율과 마찬가지로 일차항과 이차항은 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타났으나(p<0.01) 교차항은 유의성이 인정되지 않는 것(p>0.1)으로 나타났다(Table 5).

각각 추출물의 단백질 함량의 분석결과는 Fig. 2에 나타나 있다. 추출용매비가 증가함에 따라 단백질의 함량이 늘어나다 45배를 넘어서는 다시 감소하는 것으로 나타났는데 이는 단백질 이외의 성분들도 함께 추출되어 상대적으로 단백질의 함량비가 줄어든 것으로 생각된다. 또한 추출시간이 8시간까지는 증가하다가 그 이후의 온도에서는 단백질의 함량 변화가 없는 것으로 나타났다. 추출온도의 영향은 추출온도가 50°C까지는 증가하다가 그 이후의 온도에서는 감소하는 것으로 나타났다.

Park과 Lee(24)는 표고버섯 균사체로부터 단백다당체들의 함량이 추출시간이 경과할수록 증가하다가 추출 2시간 이후부터 변화가 없다고 보고하였다.

최적추출조건

해송이버섯 분말로부터 단백다당체의 최적추출조건을 구하기 위해 ANOVA 분석을 하였다. 모든 독립변수의 특성값을 고려한 최적추출조건(Table 6)은 추출온도 51.3°C, 추출시간 8.2시간, 시료에 대한 추출용매비 46.7 mL/g이었고 이때 예측된 수율은 56.4%, 추출물 중의 단백질 함량은 21.3%로 나타났다.

또한 실제로 최적조건에서 해송이버섯 분말을 추출한 결과(Table 7), 추출수율은 59.5±3.2%, 추출물 중의 단백질 함량은 22.4±1.3%로 나타나 예측된 수율과 추출물 중의 단백질 함량보다 높았다.

중성다당체와 산성다당체의 분리

최적 조건에서 추출한 추출물에 알코올을 첨가하여 침전물을 얻은 후 dialysis tube를 이용하여 분자량 12,000 Da 이하의 물질을 제거하여 조다당체(CPS)를 얻었다. 현재 버섯 및 미생물 배양 등에서 단백다당류를 분리하는 방법으로 열수로 추출한 다음 에탄올로 침전시키는 방법이 주로 이용되고 있으며, 얻어진 침전물이 항암효과를 가지는 단백다당류로 일반적으로 인정되고 있다(25,26).

조다당체(CPS)를 DEAE-Sephacell resin이 충전된 ion exchange column에 적용시켜 중성다당체(NPS)와 산성다당체(APS)를 분리하였다.

Table 6. Optimal conditions of extraction from *Hypsizigus marmoreus* for protein lined polysaccharide

Independent variables	Critical value	
	Coded	Uncoded
Extraction temperature	0.05	51.3
Extraction time	0.61	8.2
Ratio of solvent to sample (mL/g)	0.67	46.7

Table 7. Experimental and predicted result of verification under optimized conditions

Dependent variables	Predicted value	Experimental value
Y ₁ (Extraction yield, %)	56.4	59.5±3.2
Y ₂ (Protein content, %)	21.3	22.4±1.3

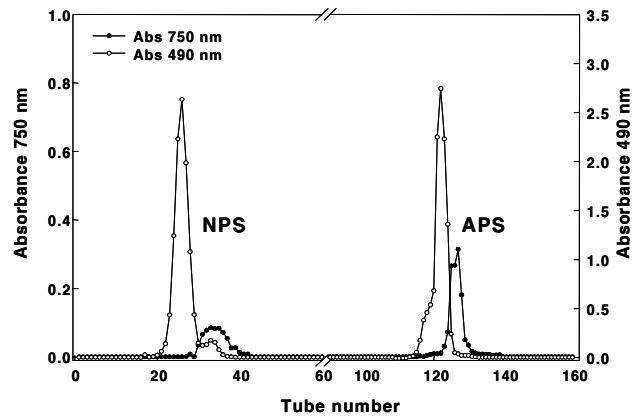


Fig. 3. Ion exchange chromatography of crude polysaccharide derived from fruit body of *Hypsizigus marmoreus* on DEAE-Sephacell column (3×45 cm). NPS, neutral fraction polysaccharides; APS, acidic fraction polysaccharides.

Table 8. Comparison of total carbohydrates and protein quantities of each fraction from *Hypsizigus marmoreus*

	CPS	NPS	APS
Protein contents (%)	19.54±2.11	5.74±1.09	18.47±1.56
Carbohydrates contents (%)	58.15±1.25	57.49±2.58	40.44±0.83

당체(APS)를 분리하였다. Fraction collector를 이용하여 분획된 시료를 분석한 결과 NPS와 APS의 분획시료들이 단백질과 당이 검출되어 이들은 모두 단백질과 결합되어있는 단백다당체일 것으로 사료되어진다(Fig. 3, Table 8).

그러나 단백질 함량은 APS가 18.47±1.56%로 NPS의 5.74±1.09%보다 높게 나타나 APS가 단백다당체의 함량이 더 높은 것으로 나타났다(Table 8). 이는 이온크로마토그래피 충전물인 DEAE Sephacell resin이 추출물의 단백질을 대부분 흡착시키기 때문인 것으로 생각된다(27).

또한 당의 함량은 NPS가 57.49±2.58%로 APS보다 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 Choi 등(27)이 보고한 아가리쿠스 버섯에서 추출 분리한 다당체들의 성분비와 비슷한 경향을 보였다. 이는 중성다당체 중의 단백다당체가 산성다당체보다 상대적으로 적기 때문에 당의 함량이 높은 것으로 사료된다.

분획별 암세포 성장억제효과

해송이버섯 추출물의 분획에 따른 위암세포주 AGS 세포, 간암세포주 HepG2, 결장세포주 SW480에 대한 세포증식 억제효과를 Table 9에 나타내었다.

위암세포주 AGS에는 산성다당체인 APS가 0.5 mg/mL의 농도에서 73.97±8.29%의 유의적으로 가장 높은 세포증식억제를 나타내었으며 해송이버섯 조추출물 CE와 조다당체 CPS가 각각 52.07±5.01%와 54.23±4.79%로 나타났으며 중성다당체인 NPS는 31.88±6.17%로 유의적으로 가장 낮은 세포증식 억제효과를 나타내었다. 이는 AGS 세포증식 억제효과를 나타내는 물질이 APS에 많이 있을 것으로 사료된다.

Table 9. Growth inhibitory effects of each polysaccharide from *Hypsizigus marmoreus* extracts for human cancer cells

Cell lines	Fractions	Concentration of extracts (mg/mL)		
		0.05	0.1	0.5
AGS cells	CE	3.89±9.94 ^{a1)}	5.51±11.83 ^b	52.07±5.01 ^b
	CPS	17.23±11.60 ^a	23.99±8.01 ^a	54.23±4.79 ^b
	NPS	4.04±3.94 ^a	11.48±9.99 ^b	31.88±6.17 ^c
	APS	19.54±26.97 ^a	25.92±8.05 ^a	73.97±8.29 ^a
HepG2 cells	CE	0.59±7.39 ^b	14.57±14.78 ^c	21.51±10.77 ^c
	CPS	48.19±11.82 ^a	77.42±5.88 ^a	82.45±5.74 ^a
	NPS	1.31±8.31 ^b	30.45±10.17 ^b	49.71±6.05 ^b
	APS	5.87±4.44 ^b	26.10±12.48 ^{bc}	43.73±6.58 ^b
SW480 cells	CE	0.34±4.34 ^a	-2.76±3.01 ^b	3.10±4.69 ^b
	CPS	2.44±5.25 ^a	3.67±6.70 ^{ab}	18.55±4.47 ^a
	NPS	2.76±2.16 ^a	9.41±8.34 ^a	15.16±5.74 ^a
	APS	2.07±2.96 ^a	5.14±4.75 ^a	4.61±5.82 ^a

¹⁾Values expressed are means±SD of triplicate measurements. Means in the same row with different letters were significantly different (p<0.05, ANOVA, Duncan's multiple range test).

되어진다. 또한 0.05 mg/mL의 농도에서는 모든 분획의 세포 증식억제효과가 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타났다.

간암세포주 HepG2 에는 CPS가 다른 분획의 시료들보다 세포증식억제효과가 모든 농도에서 높은 것으로 나타났으며 0.5 mg/mL의 농도에서는 82.45±5.74%의 세포증식억제효과가 있는 것으로 나타났다. 그러나 APS와 NPS의 세포증식억제효과는 0.5 mg/mL에서 각각 43.73±6.58%와 49.71±6.05%로 나타났으나 유의적으로는 차이가 없었다.

Chun 등(28)은 아가리쿠스버섯 열수추출물에 대한 간암 세포주 성장저해 활성 측정에서 농도가 증가함에 따라 암세포 손상정도가 증가한다고 보고하였는데 본 연구결과와 유사하였다. 반면, 결장암세포주 SW480에서는 모든 분획의 시료들이 0.5 mg/mL의 농도에서도 모두 20%미만의 세포증식 억제효과를 나타내어 해송이버섯 추출물이 SW480 cell 에는 세포증식 억제효과가 없는 것으로 생각된다.

요 약

해송이버섯 분말의 암세포성장억제효과의 증진을 위한 성분의 추출조건을 최적화하기 위하여 반응표면분석법을 사용하였다. 중심합성계획에 따라 추출조건의 독립변수(추출온도, 추출시간, 용매비)와 이에 따라 영향을 받는 수율과 추출물의 단백질 함량을 종속변수로 설정하였다. 수율과 단백질 함량이 높은 조건을 충족시키는 최적조건은 추출온도 51.3°C, 추출시간 8.2시간, 그리고 추출용매비는 46.7 mL/g 으로 나타났다. 최적조건에서 추출되어진 조추출물을 이용하여 알코올을 이용하여 침전한 후 dialysis tube를 이용하여 저분자물질을 제거하여 조다당체를 얻었으며 조다당체를 이용하여 이온교환수지를 이용하여 산성다당체와 중성다당체를 얻어 각각의 다당체의 암세포성장억제효과를 알아보았다. 위암세포주 AGS에는 산성다당체가 0.5 mg/mL의 농도에서 73.97%로 가장 높은 세포증식억제효과를 보였으며 간암세포주 HepG2에는 조다당체가 0.5 mg/mL의 농도에서

82.45%로 가장 높은 효과를 보였다. 그러나 결장암세포주 SW480에서는 모든 분획의 시료가 20%미만의 세포성장 억제효과를 보였다.

문 헌

1. Park HS, Min KJ, Cha CG, Song JW, Son JC. 2007. Antimicrobial activities against oral microbes and growth-inhibitory effect on oral tumor cell by extract of *Paeonia lactiflora*. *Korean J Environ Health* 33: 21-29.
2. Jo MJ, Min KJ. 2007. Antimicrobial activities against oral microbes and growth-inhibitory effect on oral tumor cell of extract of *Perilla* and *Mugwort*. *Korean J Environ Health* 33: 115-122.
3. Song JH, Lee HS, Hwang JK, Chung TY. 2003. Physiological activities of *Phellinus ribis* extracts. *Korean J Food Sci Technol* 35: 690-695.
4. Misuno T. 1990. Antitumor activity and some properties of water soluble polysaccharides from fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric Biol Chem* 54: 2889-2896.
5. Hirokazu K, Ryuichi I, Teturo K, Takashi M. 1989. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr Res* 186: 267-273.
6. Sasaki T, Takasuka N. 1976. Further studies of the structure of lentinan, an antitumor polysaccharides form *Lentinus edodes*. *Carbohydr Res* 47: 99-106.
7. Komatsu N, Okubo S, Kikumoto S, Kimura K, Saito G, Sasaki S. 1969. Host mediated antitumor action of *Schizophyllum commune*. *Gann Jpn J Cancer Res* 60: 557-563.
8. Tsugagoshi S, Ohashi F. 1974. Protein-bound polysaccharides preparation, PS-K, effective against sarcoma 180 and rat asites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann Jpn J Cancer Res* 65: 557-565.
9. Mizuno T, Unagaki R, Kanto T, Hagiwara T, Nakamura T, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Asakura A. 1990. Antitumor activity and some properties of water-insoluble polysaccharides from *Himematsutake*, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric Biol Chem* 54: 2897-2905.
10. Maziero R, Bononi VL. 1995. *Science and cultivation of edible fungi*. Balkema, Rotterdam, Netherlands. p 887-892.
11. Lee YL, Yen MT, Mau JL. 2007. Antioxidant properties of

- various extracts from *Hypsizigus marmoreus*. *Food Chem* 104: 1-9.
12. Stamets P. 1993. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten Speed Press, Berkeley, CA.
 13. Xu ML, Choi JY, Jeong BS, Li G, Lee KR, Lee CS, Woo MH, Lee ES, Jahng YD, Chang HW, Lee SH, Son JK. 2007. Cytotoxic constituents isolated from the fruit bodies of *Hypsizigus marmoreus*. *Arch Pharm Res* 30: 28-23.
 14. Matsuzawa T, Sano M, Tomita I, Saitoh H, Ohkawa M, Ikekawa T. 1998. Studies on antioxidants of *Hypsizigus marmoreus*. II. Effects of *Hypsizigus marmoreus* for antioxidant activities of tumor-bearing mice. *Yakugaku Zasshi* 118: 467-481.
 15. Ikekawa T, Saitoh H, Feng W, Zhang H, Li L, Matsuzawa T. 1992. Antitumor activity of *Hypsizigus marmoreus*. I Antitumor activity of extracts and polysaccharides. *Chem Pharm Bull* 40: 1954-1957.
 16. Lam SK, Ng TB. 2001. Hypsin, a novel thermostable ribosome-inactivating protein with antifungal and anti-proliferative activities from fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizigus marmoreus*. *Biochem Biophys Res Comm* 285: 1071-1075.
 17. Xu XM, Jun JY, Jeung IH. 2007. A study on the antioxidant activity of Hae-Songi mushroom (*Hypsizigus marmoreus*) hot water extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1351-1357.
 18. Gontard N, Guilbert S, Cuq JL. 1992. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J Food Sci* 57: 190-196.
 19. Lee GD, Lee JE, Kwon JH. 2000. Application of response surface methodology in food industry. *Food Ind* 33: 33-45.
 20. Saha SK, Brewer CF. 1994. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr Res* 254: 157-167.
 21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ. 1954. Protein measurement with the Folin phenol reagents. *J Biol Chem* 193: 265-275.
 22. Green LM, Reade JL, Ware CF. 1984. Rapid colometric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Methods* 70: 257.
 23. Choi KH. 2008. Extraction and purification of polysaccharides from *Phellinus linteus* mycelia. *Korean Chem Eng Res* 46: 430-435.
 24. Park KM, Lee BW. 1998. Extraction and purification of antitumor protein-bound polysaccharides from mycelia of *Lentinus edodes*. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1236-1242.
 25. Cho SM, Lee JH, Han SB, Kim HM. 1995. Immuno-stimulating polysaccharides from the fruiting bodies of *Formitella fraxinea* (II). *Korean J Mycol* 23: 340-347.
 26. Park KS, Lee JY, Lee SJ, Kim SH, Lee JS. 1992. Extraction and separation of protein-bound polysaccharide produced by *Coriolus versicolor* (Fr) Quel. *Korean J Mycol* 20: 72-76.
 27. Choi JW, Ryu DY, Kim YK, Hong EG, Kwun MS, Han JS. 2000. Extraction and purification of bioactive materials from *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Korean J Biotechnol Bioeng* 15: 293-298.
 28. Chun HS, Choi EH, Kim HJ, Choi CW, Hwang SJ. 2001. *In vitro* and *in vivo* antitumor activities of water extracts from *Agaricus blazei* Murill. *Food Sci Biotechnol* 10: 335-340.

(2008년 10월 6일 접수; 2008년 10월 30일 채택)