

수삼추출물 첨가 배지에서 배양된 노루궁뎅이버섯 균사체 심부발효물 조다당획분의 면역 및 암전이 억제활성

김 훈¹ · 박창규¹ · 정재현¹ · 정헌상² · 이현용³ · 유광원^{1*}

¹충주대학교 식품생명공학부

²충북대학교 식품공학과

³강원대학교 생물소재공학전공

Immune Stimulation and Anti-Metastasis of Crude Polysaccharide from Submerged Culture of *Hericiium erinaceum* in the Medium Supplemented with Korean Ginseng Extracts

Hoon Kim¹, Chang-Kyu Park¹, Jae-Hyun Jeong¹, Heon-Sang Jeong²,
Hyeon-Yong Lee³, and Kwang-Won Yu^{1*}

¹Division of Food and Biotechnology, Chungju National University, Chungbuk 368-701, Korea

²Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

³Dept. of Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Gangwon-do 200-701, Korea

Abstract

To find the new use of Korean ginseng and mushroom, crude polysaccharides were prepared from submerged cultures of *Hericiium erinaceum* in the medium supplemented with Korean ginseng extracts. When we fractionated crude polysaccharides (HE-GE-CP-1, 3, and 5) from hot-water extracts of submerged cultures of *H. erinaceum* with ginseng extracts (1%, 3%, and 5% addition of total medium), the yields of HE-GE-CP-1, 3, and 5 were identified at 5.7, 5.1, and 4.8%, respectively. Among crude polysaccharide fractions, HE-GE-CP-5 was significantly higher (1.89-fold of the saline control) than those of HE-GE-CP-1 (1.64-fold) or HE-GE-CP-3 (1.76-fold) on mitogenic activity of splenocytes. HE-GE-CP-5 also had the more potent bone marrow cell proliferation (1.83-fold) rather than HE-CP or HE-GE-CP-1 or HE-GE-CP-3 (1.59- or 1.44- or 1.69-fold, respectively), and anti-metastatic activity as anti-cancer effect showed the highest prophylactic value (72.4% inhibition of tumor control) in 5% supplementation of ginseng extract. However, the lysosomal phosphatase of macrophage was significantly stimulated after HE-GE-CP-3 treatment (2.03-fold). In addition, the immunostimulating and anti-metastatic crude polysaccharide, HE-GE-CP-5, contained mainly neutral sugars (63.2%) with considerable amounts of uronic acid (19.3%) and a small amount of proteins (8.8%). HE-GE-CP-5 can stimulate immune system to inhibit tumor metastasis, and its anti-tumor metastasis may be associated with macrophages, splenocytes and Peyer's patch cells activation.

Key words: *Hericiium erinaceum*, Korean ginseng extract, submerged culture, crude polysaccharide, immunostimulation, anti-metastasis

서 론

버섯은 예로부터 식용이나 한방 및 민간에서 우수한 생약으로 사용되어 왔으며(1), 최근에 와서는 이들 버섯 중에 함유되어 있는 각종 유용성분이 규명되어, 버섯 유래 생리활성 물질의 개발과 이용은 산업적인 중요과제로 인식되었다(2,3). 한편, 균사체 배양물에서도 자실체에 함유되어 있는 유용성분이 함유되어 있음이 밝혀지면서, 자실체보다 배양하기가 용이한 균사체의 액체배양물로부터의 생리활성물질 생산이 널리 시도되고 있다(4,5). 또한 액체배양은 적은공간

에서 품질이 균일한 균사체를 적은 비용으로 단기간에 대량 생산할 수 있어, 자실체로부터 유용성분을 생산하는 방법보다 더 효과적인 생산방법으로 알려져 있다(6). 특히, 중국에서는 위염치료 등의 한약재로 유명하고(7) 일본에서는 활목 재배나 polyethylene병을 이용한 균사재배 방법 등 인공재배법이 확립되어 연중시장에 출하되고 있으며, 국내에서도 최근 인공재배가 시작된 노루궁뎅이버섯(*Hericiium erinaceum*)의 경우에는, Liu(8)에 의해 재배기술이 개발되어 인공재배가 가능해졌다. 그러나 버섯(자실체)의 생산은 광선, 온도, 습도의 제어를 필요로 하며 유효성분의 추출수율이

*Corresponding author. E-mail: kwyu@cjnu.ac.kr
Phone: 82-43-820-5333, Fax: 82-43-820-5272

낮아 식용이외의 산업화는 미비한 실정이다. 따라서 최근에는 자실체보다 배양이 용이한 자실체 발생이전 단계인 균사체의 액체배양에 의한 생리활성의 물질생산이 널리 시도되고 있다. *H. erinaceum*의 액체배양과 관련한 연구로서는 corn bran 또는 malt extract-peptone-glucose-agar(MPGA) 배지를 사용하여 균사체를 생산한 Arnone 등(9)의 연구와 국내에서 Baek(10)의 액체배양에 의한 균사체 생산을 위한 기초연구 및 Ha 등(11)의 식품부산물인 노루궁뎅이버섯 균사체의 액체배양 연구가 있다. 그러나 아직도 *H. erinaceum*의 액체배양과 관련한 연구개발은 다른 버섯류에 비해 매우 제한되어 있을 뿐만 아니라 액체배양 발효물의 생리활성과 관련하여 보고된 논문도 적은 실정이다(12,13). 따라서 생리활성 작용이 탁월한 버섯 균사체가 약리작용이 뛰어난 수삼을 영양원으로 이용하여 생육할 수 있다면, 균류가 지니고 있는 생물학적 변환능력(biotransformation)에 의해 수삼 및 균류가 지니고 있는 활성성분에 기인하는 각종 생리활성에서의 시너지 효과를 기대할 수 있으리라 예상된다. 따라서 수삼추출물이 첨가된 노루궁뎅이버섯 균사체 심부발효물의 다양한 생리활성의 검토는 기능성소재로서의 이용 가능성을 제시할 수 있을 뿐만 아니라, 노루궁뎅이버섯의 액체배양과 관련한 분야에서도 많은 연구를 발전시킬 수 있는 계기가 될 수 있다고 사료된다.

한편, 과학적인 실험결과에 기초하여 전통적으로 사용되어 오던 물질에 대한 활성이 인정되면서 전통생약의 사용이 증가되고 있다. 그러나 민간요법 혹은 한방에서 사용하였던 천연물은 다양한 추출방법과 단일성분이 아닌 여러 복합성분을 갖는 원료로서 동일한 활성이 나타나지 않아 임상에서는 쉽게 받아들여지지 않는 실정이다. 또한 활성성분 자체도 물질의 채취 시기나 지역에 따른 차이가 알려져 있기 때문에(14), 이러한 천연약재의 활성을 과학적으로 인정받기 위해서는 물질의 표준화가 선행되어야 할 것이다. 이를 위해 생리활성을 대표할 수 있는 지표물질의 분리 및 선정과 함께 정량법 개발도 우선적으로 고려되어야 할 사항으로 사료된다. 그러므로 본 연구에서는 수삼추출물이 첨가된 액체배지에서 유용균사체를 배양하여 얻은 심부발효물로부터 지표물질로 활용 가능한 조다당획분을 분리하고 각종 면역활성과 암전이 활성 등의 생리활성을 측정하여 수삼가공품의 새로운 기능성소재로서 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 수삼

본 연구에 사용한 노루궁뎅이버섯(*H. erinaceum*)의 균사체는 충청북도 농업기술원(청원군, 충북)으로부터 분양을 받아, potato dextrose agar(PDA, Difco, Detroit, MI, USA) 사면배지에서 25°C로 10일간 배양한 후 4°C에서 보존하였으며 4주마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 또한 본 연

구에서 액체배지에 첨가된 수삼추출물의 조제에 사용된 수삼은 2007년도에 증평균 일원에서 수확한 4~5년근 수삼을 증평균인삼연구회(증평균, 충북)에서 구입하여 사용하였으며, 상기 수삼을 열수추출 하여 65°Brix로 농축한 후 본 연구에 사용하였다.

수삼추출물이 첨가된 노루궁뎅이버섯 균사체의 심부배양

10여종의 다양한 기본배지에 65°Brix 수삼추출물을 0.5% 첨가한 후 온도와 pH에 따른 노루궁뎅이버섯 균사체의 생육을 검토한 결과, mushroom complete medium(MCM), pH 5.5와 25°C에서 10일간 배양으로 균사체 생육이 가장 우수함을 확인할 수 있었다. 한편, 수삼추출물이 다양한 농도로 첨가된 액체배지에서 노루궁뎅이버섯 균사체의 배양으로부터 얻은 배양액과 균사체를 모두 포함하는 심부발효물을 대량 조제하기 위하여 50 L jar fermenter system((주)퍼멘터, 청원군, 충북)을 사용하였다. 이때 배양조건은 선정된 기본배지인 MCM 액체배지에 65°Brix로 농축한 수삼추출물을 각각 1%, 3% 및 5%로 첨가하고 *H. erinaceum* 종균 접종비 10%, 온도 25°C, 교반속도 120 rpm과 통기속도 0.4 vvm으로 5일간 배양하였다.

심부발효물로부터 조다당획분의 분획 및 분석

수삼추출물이 다양한 농도로 첨가된 배지에서 노루궁뎅이버섯 균사체를 배양하여 얻은 심부발효물(균사체와 배양액 전부)을 homogenizer(Ultra-turrax T-50; Janke & Kunkel GmbH & Co., KG-IKA-Labortechnik, Staufen, Germany)로 균질화한 후 열수추출하고 여과지(No. 2, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 잔사를 분리하였다. 여과액은 원심분리(5,000×g에서 30분)를 통해 불용성 침전물을 제거하고 농축, 투석(Spectra/Por 4, MWCO 12,000~14,000, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) 및 동결건조 하여 열수추출물로 조제하였다. 회수한 열수추출물은 다시 증류수에 용해시키고 5배의 에탄올을 첨가하여 원심분리로 침전물을 회수한 후 소량의 증류수에 재용해하고 투석, 원심분리, 농축 및 동결건조를 거쳐 열수추출물의 조다당획분으로 조제하였다. 한편, 이와 같이 분획된 조다당획분의 중성당, 산성당 및 단백질은 phenol-H₂SO₄법(15), *m*-hydroxybiphenyl법(16)과 Bio-Rad dye(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용한 Bradford법(17)을 이용하여 분석하였다. 표준물질은 각각 glucose, galacturonic acid 및 bovine serum albumin(BSA, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였으며 표준곡선을 검량한 후 각 시료의 구성분 함량을 계산하였다.

실험동물과 세포배양

생후 6주령의 자성 C3H/He, BALB/c 또는 BKW 마우스를 (주)오리엔트바이오(성남, 경기도) 및 (주)나라바이오텍(평택, 경기도)에서 구입한 후, 사육조에 5마리씩 넣고 정수

된 물과 실험동물용 펠렛사료((주)삼양사, 인천)를 자유공급 하였으며 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다. 종양세포주인 colon 26-M3.1 carcinoma의 배양은 7.5% FBS, 비타민 용액, sodium pyruvate, 비필수아미노산 및 L-glutamic acid가 함유된 EMEM 배지를 이용하였으며 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C의 조건에서 배양하였다.

면역활성

마이토젠 활성: 6주령의 BALB/c 마우스를 경구탈추시킨 후 멸균적으로 비장을 적출하고 비장세포(splenocyte)를 회수하여 2×10^5 /mL의 농도로 조정하고 96-well plate 각 well에 100 μ L씩 분주하였다. 그 후 여러 농도로 조정된 시료를 동량 첨가하고 3일간 배양함으로써 비장세포에 미치는 시료의 활성을 조사하였다. 수삼추출물 첨가 배지를 이용하여 제조된 버섯 균사체 심부발효물의 조다당획분 시료에 대한 비장세포의 마이토젠 활성은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] assay법으로 수행하였다(18). 한편, 마이토젠 활성은 마우스로부터 직접 비장세포를 회수한 후 시료와의 초대배양(primary cell culture)을 통한 측정방법으로 검토되기 때문에 세포배양 및 시료에 의한 비장세포의 자극이 원활하게 이루어졌는지의 여부와 시료의 활성을 상대적으로 평가하기 위하여 endotoxin인 lipopolysaccharide(LPS, Sigma Co.)를 적당한 농도로 희석하여 positive control로 사용하였다(19).

골수세포 증식활성: 골수세포 증식활성은 Hong 등의 방법(20)에 의거하여 측정하였다. 즉, C3H/He 마우스의 소장벽 상에 존재하는 Peyer's patch를 조심스럽게 잘라내어 Hank's balanced salt solution(HBSS)이 담겨진 petridish에 옮기고 조직을 파괴하여 Peyer's patch 세포를 조제하고 급속체(No. 200)로 여과하였다. 여과된 세포현탁액은 RPMI 1640-FBS(5% FBS 함유)로 세척하여 2×10^5 cells/mL의 세포농도로 조정한 후 96 well plate에 180 μ L씩 분주하고 적당한 농도로 희석한 시료를 20 μ L씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 골수세포 증식활성에 사용하였다. 한편, 골수세포는 동일종 마우스의 대퇴부 뼈로부터 회수하여 여과, 세척하고 2.5×10^5 cells/mL RPMI 1640-FBS의 세포농도로 조정하고 96 well plate에 100 μ L씩 분주하였다. 분주된 골수세포에 Peyer's patch 세포와 시료의 반응으로부터 회수한 상등액과 RPMI 1640-FBS를 각각 50 μ L씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일간 배양하였다. 골수세포의 증식활성은 시료와 Peyer's patch 세포와의 반응으로부터 회수한 상등액을 골수세포와 반응시켜 골수세포가 증식되는 정도로서 나타내는데, 증식도 측정은 Alamar Blue™(Alamar Bio-Sciences Inc., Sacramento, CA, USA)가 골수세포에 의해 발색되는 측정법을 사용하였다(21). 즉, 배양종료 12시간 전에 Alamar Blue™ 20 μ L를 첨가한 다음 Fluoroskan II(Labsystems,

Helsinki, Finland)를 이용하여 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 형광도를 측정된 후 생리식염수를 시료대신 사용한 대조구와 골수세포의 증식도를 비교하여 정량화하였다. 골수세포 증식활성은 마우스의 Peyer's patch 세포 및 골수세포를 회수한 후 시료 또는 Peyer's patch 배양 상등액과의 초대배양으로 측정하기 때문에 Peyer's patch 및 골수세포배양과 시료에 의한 세포들의 자극이 원활하게 이루어졌는지 여부와 시료의 활성정도를 평가하기 위하여 endotoxin인 LPS를 적당한 농도로 희석하여 positive control로 사용하였다.

마크로파지 활성: 마크로파지 활성검색은 마크로파지의 lysosomal phosphatase의 활성측정을 이용하여 실시하였는데, 6주령 웅성 BKW mouse 복강에 1 mL의 thioglycollate medium을 주입한 뒤 48~72시간 후에 RPMI-1640 medium으로 마크로파지를 복강으로부터 회수하였다. 회수된 마크로파지를 RPMI-1640 medium으로 세척 후 세포수가 1×10^6 cells/mL RPMI-1640이 되도록 RPMI-1640 medium에 재분산시켰다. 이 분산액을 96-well plate의 각 well에 200 μ L씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하여 마크로파지 세포가 각각의 well plate의 기벽에 부착하여 monolayer를 형성시켰다(22). 두 시간 후, non-adherent cell들은 세척하여 제거하고 10% fetal bovine serum(FBS)을 함유한 RPMI-1640 medium을 각 well에 180 μ L씩 분주하고 시료 20 μ L를 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 재배양하여 마크로파지를 활성화시켰다. 이렇게 활성화된 마크로파지의 monolayer에 0.1% triton X-100(25 μ L)을 가하여 마크로파지의 세포막을 용해시키고 이때 분비되는 lysosome의 phosphatase 기질로서 100 mM *p*-nitrophenyl phosphate(150 μ L) 및 0.1 M citrate buffer(50 μ L)와 같이 넣어주어 1시간 동안 산성상태에서 반응시킨다. 다음으로 0.2 M borate buffer를 가하여 반응을 정지시킨 후 ELISA reader(Sunrise, TECAN, Grödingen, Austria)로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 phosphatase의 활성을 측정하였다(23). 또한, 마크로파지 활성에서도 마크로파지 배양과 시료에 의한 자극 및 시료 활성을 평가하기 위하여 positive control로서 LPS를 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

암전이 억제활성

시료의 항종양전이 효과는 colon 26-M3.1 carcinoma를 이용하는 실험동물 종양전이 모델을 이용하였다(24). 실험동물로 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 종양의 접종은 2.7×10^4 의 colon 26-M3.1 carcinoma 세포를 정맥주사(*i.v.*)하였다. 14일 후에 마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정시킨 후 종양의 군집 수를 측정하였다. 한편, 시료에 대한 항종양전이효과는 종양만 접종한 대조군과 비교함으로써 조사하였고 시료 단독의 활성은 종양접종 2일 전(예방효과) 혹은

1일 후(치료효과)에 1회 정맥주사 하였다.

통계처리

실험결과들은 4개 군에 대한 실험을 통하여 평균치±SD (standard deviation)로 나타내었고 Student's *t*-test를 이용, $p < 0.05$ 수준에서 saline 대조군과 고체발효물 시료, 시료 대조군인 HE-CP와 각 시료 및 시료들 간의 유의성을 검정함으로써 대조군 및 HE-CP에 대한, 수삼추출물이 다양한 농도로 첨가된 배지에서 노루궁뎅이버섯 균사체를 배양하여 얻은 심부발효물 조다당획분 시료의 활성정도로 나타내었다.

결과 및 고찰

수삼추출물 첨가 배지에서 배양된 노루궁뎅이버섯 균사체 심부발효물의 조다당획분

생리활성 작용이 우수한 수삼과 유용균사체를 기능성식품의 소재로 활용하기 위하여 50 L jar fermenter에서 MCM 기본배지에 65°Brix로 농축한 수삼추출물을 1%, 3% 및 5%로 첨가한 후 노루궁뎅이 균사체를 배양하여 심부발효물을 조제하였다. 수삼추출물 첨가 농도에 따른 건조 균체량은 5% 첨가군이 가장 높은 수준(4.93 g/L)으로 확인되었는데, 이는 수삼추출물의 첨가량이 증가하면서 추출물에 함유된 당과 아미노산 등의 다양한 영양소 함량(C와 N의 급원)도 증가하기 때문인 것으로 추정된다. 이와 같이 조제된 노루궁뎅이 균사체의 심부발효물은 열수추출물로 조제한 후(1% 첨가: HE-GE-HW-1, 수율 20.5%; 3% 첨가: HE-GE-HW-3, 28.5%; 5% 첨가: HE-GE-HW-5, 32.3%), 조다당획분으로 분획하여(HE-GE-CP-1, 수율 5.7%; HE-GE-CP-3, 5.1%; HE-GE-CP-5, 4.8%) 면역 및 압전이 억제활성의 시료로 사용하였다. 수삼추출물이 다양한 농도로 첨가된 배지에서 노루궁뎅이버섯 균사체를 배양하여 얻은 심부발효물 조다당획분의 수율은 수삼 조다당 또는 수삼추출물이 첨가되지 않은 MCM 액체배지만의 균사체 심부발효물 조다당획분(WG-CP, 6.1%; HE-CP, 5.8%)보다 상대적으로 감소된 결과를 보여주었다(Table 1). 일반적으로 EtOH 침전에 의해 조제되는 조다당획분은 주성분으로 고분자물질이 함유

되어져 있는 것으로 보고되고 있는데(19,25), 발효과정으로 인하여 이러한 수삼추출물의 고분자물질이 분해되는 것에 의해 수율이 감소한 것으로 생각된다. 또한, 위에서 언급한 것처럼 수삼추출물의 첨가량이 증가할수록 심부발효물 열수추출물(수용성 고분자 및 저분자 함유)의 수율은 증가하였으나, EtOH 침전에 의한 조다당획분(주로 고분자 함유)은 수삼추출물의 농도증가에 따라 수율이 감소된 것도 이러한 결과를 뒷받침해주는 것으로 사료된다. 또한, 이러한 결과는 균체량 증가와 함께 균사체로부터 amylase, protease 또는 polygalacturonase 등의 고분자물질 분해효소의 분비가 증가되고 이로 인해 고분자물질의 분해가 촉진될 수 있다는 보고(26,27)와 일치되는 것으로 보인다.

한편, EtOH 침전에 의해 분획된 조다당획분은 주로 다당류 또는 단백다당의 고분자물질로 구성되어 있으므로(19, 25), 이들획분의 구성분으로서 중성당, 산성당 및 단백질을 분석하였다. 수삼추출물이 1% 첨가된 배지에서 배양하여 얻은 심부발효물의 조다당획분(HE-GE-CP-1)은 68.8%의 중성당과 15.3%의 산성당 및 7.5%의 단백질을 구성되어 있었다(Table 1). 한편, 3%와 5%가 첨가된 조다당획분의 중성당은 65.9%와 63.2%를 함유하고 있었으며 산성당은 15.2%와 19.3%를, 단백질은 6.9%와 8.8%를 함유하고 있음을 확인할 수 있었다(Table 1). 또한 시료 대조군인 수삼 조다당획분 및 수삼추출물이 첨가되지 않은 균사체만의 심부발효물로부터 분획된 조다당획분의 경우에는 중성당이 63.6%와 78.8%, 산성당이 18.5%와 15.8%로 구성되어져 있으며 단백질은 11.5%와 2.9%를 함유하고 있음을 알 수 있었다(Table 1). 이러한 결과로부터 배양 후 균체량이 가장 높았던, HE-GE-CP-5로부터 대조군인 HE-CP와 비교할 때 중성당이 현저히 감소되면서 상대적으로 산성당과 단백질의 양이 증가됨을 보여주고 있기 때문에 발효를 통한 생물학적 전환이 유도되고 있음을 확인할 수 있었다.

수삼추출물 첨가농도별로 조제된 심부발효물 조다당획분의 면역 활성

수삼추출물을 농도별(1%, 3%와 5%)로 액체배지에 첨가한 후 50 L jar fermenter에서 노루궁뎅이 균사체를 5일간 배양하여 배양액과 균사체가 모두 포함된 심부발효물의 열

Table 1. Physicochemical properties of crude polysaccharides from submerged cultures of *Hericium erinaceum* in mushroom complete medium (MCM) supplemented with ginseng extract

Characteristics	WG-CP ¹⁾	HE-CP	HE-GE-CP-1	HE-GE-CP-3	HE-GE-CP-5	
Yield (%)	6.1	5.8	5.7	5.1	4.8	
Contents (%) ²⁾	Neutral sugar	63.6	78.8	68.8	65.9	63.2
	Uronic acid	18.5	15.8	15.3	15.2	19.3
	Protein	11.5	2.9	7.5	6.9	8.8

¹⁾WG-CP: crude polysaccharide from Korean ginseng, HE-CP: crude polysaccharide from submerged culture of *H. erinaceum* without ginseng extracts, HE-GE-CP-1, 3, and 5: crude polysaccharide from submerged culture with *H. erinaceum* in MCM supplemented with 1%, 3%, and 5% of ginseng extract.

²⁾Neutral sugar: phenol-H₂SO₄ method as Glc, Uronic acid: *m*-hydroxybiphenyl method as GalA, Protein: Bradford method as BSA.

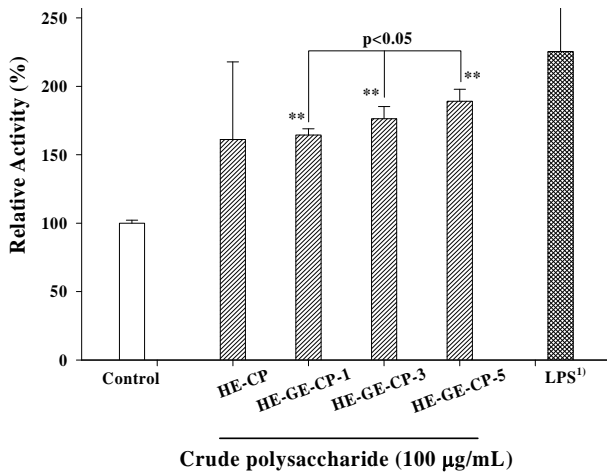


Fig. 1. Effect of crude polysaccharides from submerged cultures of *Hericium erinaceum* in mushroom complete medium (MCM) supplemented with ginseng extracts on mitogenic activity. HE-CP: crude polysaccharide from submerged culture of *H. erinaceum* without ginseng extracts, HE-GE-CP-1, 3, and 5: crude polysaccharide from submerged culture with *H. erinaceum* in MCM supplemented with 1%, 3%, and 5% of ginseng extract. ⁽¹⁾LPS: lipopolysaccharide (positive control, 1 μ g/mL). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$; significant difference between the control and sample.

수추출물로부터 조다당획분을 분획하여 면역 활성을 측정하였다. Saline control과 함께 수삼추출물 첨가농도별 조다당획분의 시료대조군으로서 노루궁뎅이버섯 균사체만의 심부발효물 조다당획분인 HE-CP와 비교하였다. 비장세포를 이용한 mitogenic activity의 경우에는 시료대조군인 HE-CP가 saline 대조군의 1.61배를 보인 반면, 수삼추출물이 3%와 5% 첨가된 노루궁뎅이버섯 균사체 심부발효물의 조다당획분(HE-GE-CP-3과 5)은 1.76배와 1.89배의 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1). 그러나 수삼추출물이 1% 첨가된 노루궁뎅이버섯 균사체 심부발효물의 조다당획분(HE-GE-CP-1)의 경우에는 saline 대조군보다는 높은 1.64배의 활성을 보였으나 HE-CP와는 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과로부터 수삼추출물이 3% 이상 첨가된 노루궁뎅이버섯 균사체 심부발효물의 조다당획분은 비장세포를 자극하여 마이토젠 활성을 증가시키고 있음을 알 수 있었다. 한편, 소장 내 중요한 국소 면역조직 중 하나인 Peyer's patch를 경유한 조혈세포인 골수세포의 증식활성을 측정한 결과에서도, HE-GE-CP-5가 saline 대조군보다 1.83배의 높은 활성을 나타내어 생리활성 증진에 발효공정이 중요함을 확인할 수 있었다. 또한 통계학적으로 유의차는 없었으나 마이토젠 결과와 유사하게 HE-GE-CP-3(1.69배)도 HE-CP(1.59배)보다 우수한 결과를 나타내었으나 수삼추출물 1% 첨가군에서는 1.44배의 활성을 나타내어 HE-CP보다도 활성이 낮음을 보여주었다(Fig. 2). 일반적으로 구강으로 섭취되어 기능성을 발휘하는 소재의 경우에는 소장에서 소화되지 않은 채 Peyer's patch의 M cell에 의해 phagocytosis되어 면역세포를 활성화시키는데, 이와

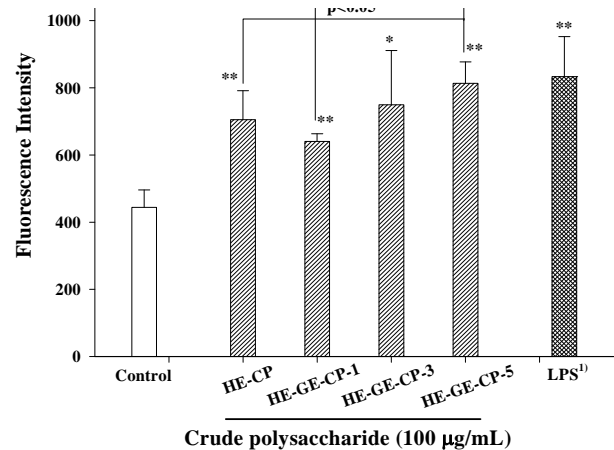


Fig. 2. Effect of crude polysaccharides from submerged cultures of *Hericium erinaceum* in mushroom complete medium (MCM) supplemented with ginseng extracts on bone marrow cell proliferating activity through Peyer's patch. HE-CP: crude polysaccharide from submerged culture of *H. erinaceum* without ginseng extracts, HE-GE-CP-1, 3, and 5: crude polysaccharide from submerged culture with *H. erinaceum* in MCM supplemented with 1%, 3%, and 5% of ginseng extract. ⁽¹⁾LPS: lipopolysaccharide (positive control, 10 μ g/mL). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$; significant difference between the control and sample.

같이 활성화된 면역세포는 전신을 순환하면서 면역계를 자극하게 됨으로써 Peyer's patch는 면역 활성화에 대단히 중요한 의의를 갖는 기관으로 알려져 있다(28,29). 따라서 수삼추출물이 3% 이상 첨가된 노루궁뎅이버섯 균사체 심부발효물은 이러한 기능을 충분히 수행하는 것으로 보이므로 기능성소재로서의 활용 가능성은 높다고 할 수 있다. 마지막으로 천천면역계의 대표적인 면역세포인 복강 내 마크로파지의 활성을 측정한 결과에서는 HE-GE-CP-3이 saline 대조군의 2.03배로 가장 높은 마크로파지 활성을 보였으며 HE-GE-CP-1은 1.81배의 활성을, 수삼추출물 5% 첨가군(HE-GE-CP-5)은 1.86배의 활성을 보여주었다(Fig. 3).

이러한 결과로부터 수삼추출물을 농도별로 액체배지에 첨가하여 조제한 노루궁뎅이버섯 균사체 심부발효물의 열수추출물로부터 분획된 조다당획분은 다양한 면역 활성화에서 saline 대조군보다 높은 활성을 나타내었다. 또한, 골수세포 증식활성의 HE-GE-CP-5를 제외하고는 통계학적인 유의차($p < 0.05$)는 없었으나 노루궁뎅이버섯 균사체만의 심부발효물 조다당획분(HE-CP)보다 활성이 상당히 증가하고 있음을 보여주었다. 따라서 수삼추출물이 첨가된 액체배지에서 노루궁뎅이버섯 균사체의 발효과정은 면역 활성화에 관여하는 생리활성 성분을 증진시키고 있음을 보여주었다. 한편, 수삼추출물의 첨가량은 3% 이상에서 면역 활성화에 효과를 나타내었으며, 1% 첨가만으로는 그다지 뚜렷한 차이를 보이지는 않았는데, 조다당획분의 구성분 분석결과(Table 1)로부터 활성획분은 중성당이 감소하고 산성당이 약간 높아지는 조성을 나타내어 활성물질의 구성분이 다름을 보여주었다. 따라서 향후에 활성을 갖는 심부발효물의 조다당획분으로써

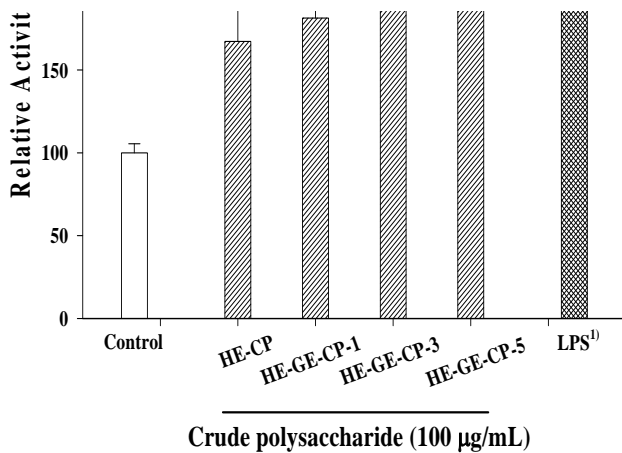


Fig. 3. Effect of crude polysaccharides from submerged cultures of *Hericium erinaceum* in mushroom complete medium (MCM) supplemented with ginseng extracts on macrophage stimulating activity. HE-CP: crude polysaccharide from submerged culture of *H. erinaceum* without ginseng extracts, HE-GE-CP-1, 3 and 5: crude polysaccharide from submerged culture with *H. erinaceum* in MCM supplemented with 1%, 3% and 5% of ginseng extract, ¹⁾LPS: lipopolysaccharide (positive control, 10 µg/mL). **p<0.05; significant difference between the control and sample.

터 활성획분을 정제하고 이들의 구조적인 특성을 검토하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

수삼추출물 첨가 심부발효물 조다당획분의 암전이 억제 활성

지금까지 보고된 BRM(biological response modifier) 활성을 가지는 다양한 종류의 물질은 항암제의 종양치료에서 면역자극활성에 기인되는 상승활성을 유도한다는 것이 잘 알려져 있다(30,31). 또한, 화학요법에 사용되는 항암제는 대부분 면역억제작용이 있기에 면역자극 혹은 조절제를 병용 투여하는 방법(chemoimmunotherapy)은 성공적인 임상에의 적용을 위하여 필수적인 요소로 고려되어 왔다. 그러나 본 실험에서 사용한 수삼추출물이 첨가된 노루궁뎅이 균사체 심부발효물의 조다당획분에 대한 보고는 거의 없으므로, 동물실험모델을 이용하여 이에 기인되는 종양의 예방 및 치료활성을 측정하였다. Colon 26-M3.1 carcinoma 모델에서 면역자극물질의 전신투여에 의한 암전이 억제활성은 주로 비특이적인 면역자극 활성에 의하여 유도된다는 것은 잘 알려져 있기 때문에(24,32), 본 연구에서는 지금까지의 면역활성 결과를 토대로 colon 26-M3.1 carcinoma 모델을 이용하여 수삼추출물 첨가농도별 노루궁뎅이 균사체 심부발효물 조다당획분의 암전이 억제활성을 검토하였다. 식품소재로서의 항종양전이 활성에 대한 가능성을 타진하기 위하여 경구투여를 통한 결과를 검토하여야 하나, 경구투여 기간에 따른 시료가 충분히 확보되지 않았고 정제되지 않은 시료에 대한 활성의 유무를 신속히 측정하기 위한 방법으로서 정맥 주사를 통한 실험들이 많이 보고(24,32-35)되고 있기 때문에

본 논문에서도 정맥주사로 시료를 주입하여 항종양전이 활성을 검토하였다. 항후 정제된 시료를 이용한 경구투여 실험을 통하여 식품소재로서의 가능성을 재확인하고자 한다. 종양 접종 2일전에 50 µg/mouse의 HE-GE-CP-1, 3 및 5를 각각 1회 정맥투여 한 결과(Table 2), 47.2%, 63.1% 및 72.4%의 통계적으로 유의한 예방적 전이억제 활성을 나타내었다. 또한, 수삼추출물이 5% 첨가된 노루궁뎅이 균사체 심부발효물 조다당획분이 가장 높은 암전이 억제활성을 보여준 반면, HE-GE-CP-1은 시료대조군인 균사체의 심부발효물 조다당획분(HE-CP, 42.8%)과 유사한 활성(47.2%)을 나타내었다. 한편, 종양 접종 1일 후에 조다당획분을 동일한 농도로 투여한 결과는, 예방적 투여의 결과에 비하여는 낮은 활성을 보였으나 HE-GE-CP-5를 50 µg/mouse의 농도로 투여한 경우에 51.2%의 비교적 우수한 치료적 억제활성을 보였으나, HE-GE-CP-3의 경우(32.7%)에는 통계적인 유의성이 없었다. 이러한 결과로 HE-GE-CP-5의 투여가, 암 전이를 억제하는 항종양 활성을 유도한다는 것을 알 수 있었으며, 실험에 적용한 농도에서 외형상 어떠한 부작용도 관찰되지 않았다. 혈관을 통하여 전이되는 암은 숙주로부터 암의 제거에 작용하는 macrophage, lymphocytes 및 NK-cell 등과 접촉하게 된다(36). 따라서 HE-GE-CP-3과 5 등의 수삼추출물이 첨가된 노루궁뎅이 심부발효물의 조다당획분이 치료적인 것보다 예방적인 측면에서 높은 활성을 유도한 것(Table 2)은 접종된 암세포가 목표기관(target organ)인 폐에 정착하여 증식되기 전에 이미 활성화된 종양관련 작동세포가 혈관으로 접종된 암세포와 접촉함으로써 유도되는 현상으로 사료된다.

결론적으로 수삼추출물이 3% 이상 첨가되어 배양된 노루궁뎅이버섯 균사체 심부발효물의 조다당획분은 동물실험에

Table 2. Effect of crude polysaccharides from submerged cultures of *Hericium erinaceum* in mushroom complete medium (MCM) supplemented with ginseng extracts on anti-metastatic activity

Crude polysaccharide	No. of lung metastasis of colon 26-M3.1 ¹⁾ [mean±SD, (inhibition %)]	
	Prophylactic effect	Therapeutic effect
Tumor control ²⁾	140.3±29.1 (0)	64.6±7.4 (0)
HE-CP	80.3±18.3 (42.8)*	47.2±6.2 (26.9)*
HE-GE-CP-1	74.1±12.7 (47.2)*	44.4±8.5 (31.2)*
HE-GE-CP-3	51.8±9.0 (63.1)* ⁺	43.5±24.3 (32.7)
HE-GE-CP-5	38.8±12.6 (72.4)* ⁺	31.5±5.6 (51.2)* ⁺

¹⁾Five BALB/c mice per group were administered *i.v.* with sample (50 µg/mouse) 2 days before (prophylactic effect) or 1 day after (therapeutic effect) *i.v.* inoculation of colon 26-M3.1 carcinoma cells (2.7×10^4 /mouse). Mice were killed 14 days after tumor inoculation for evaluation.

²⁾For lung metastasis inhibition, control is tumor-bearing one without sample administration. *p<0.01; significant difference between the tumor control and each sample, and ⁺p<0.05; significant difference between HE-CP and submerged culture supplemented with ginseng extract.

서 강한 면역자극활성을 나타내며, colon 26-M3.1 carcinoma 모델에서 암전이 억제활성을 증진시키는 상승작용을 유도함으로써 BRM으로서 응용이 가능한 기능성소재임을 보여주었다. 또한 유용균사체의 발효과정이 수삼추출물이 첨가된 액체배지에서 생리활성의 증진효과를 유발하는 중요한 공정이라는 사실도 확인할 수 있었다. 향후 조다당획분의 정제를 통한 활성물질의 구조적 특성과 식품에 대한 산업적 적용 등에 대한 연구를 수행하고자 한다.

요 약

수삼과 버섯의 새로운 용도를 개발하기 위하여, 수삼추출물이 첨가된 액체배지에서 배양된 노루궁뎅이버섯 균사체 심부발효물의 열수추출물로부터 조다당획분을 조제하였다. 수삼추출물이 액체배지 전체양의 1%, 3%와 5% 첨가된 노루궁뎅이버섯 균사체 심부발효물의 열수추출물로부터 조다당획분(HE-GE-CP-1, 3과 5)이 분획되었을 때, 수율은 각각 5.7, 5.1과 4.8%이었다. 이러한 조다당획분 중 HE-GE-CP-5(saline 대조군의 1.89배)는 HE-GE-CP-1(1.64배)과 HE-GE-CP-3(1.76배)보다 유의적으로 높은 비장세포의 마이토젠 활성을 보여주었다. 또한 HE-GE-CP-5(1.83배)는 소장 국소 면역조직인 Peyer's patch를 경유한 골수세포 증식활성에서도 HE-CP(1.59배), HE-GE-CP-1(1.44배)과 HE-GE-CP-3(1.69배)보다 높은 활성을 나타내었으며, 항암효과로서의 암전이 억제활성 측정에서는 수삼추출물이 5% 첨가된 조다당획분에서 72.4%의 높은 암전이 억제활성도 보여주었다. 그러나 복강 내 마크로파지의 lysosomal phosphatase의 활성측정에서는 HE-GE-CP-3에서 2.03배의 가장 높은 마크로파지 자극활성을 확인할 수 있었다. 한편, 이러한 면역 및 암전이 억제활성을 갖는 조다당획분인 HE-GE-CP-5는 중성당(63.2%)과 함께 상당량의 산성당(19.3%)을 함유하였으며 단백질은 8.8%가 구성분으로 분석되었다. 이러한 결과로부터 HE-GE-CP-5는 암전이를 억제하기 위한 면역계를 자극할 수 있음이 확인되었으며, 이러한 암전이 억제의 항종양 활성은 마크로파지, 비장세포 및 Peyer's patch cell 등의 활성화 기작과 연계되어 있음을 추정할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20080401-034-033-009-03-00)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Chang ST. 1993. Mushrooms and mushroom biology. In

- Genetics and Breeding of Edible Mushrooms*. Chang ST, Buswell JA, Miles PG, eds. Gordon & Breach Science Publisher, Philadelphia, USA. p 1-13.
- Soccol CR, Dalla Santa HS, Rubel R, Vitola FM, Leifa F, Pandey A. 2008. Mushrooms - A promising source to produce nutraceuticals and pharmaceutical byproducts. In *Current Topics on Bioprocesses in Food Industry*. Koutinas AA, Pandey A, Larroche C, Larroche A, eds. Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India. p 439-448.
 - Kidd PM. 2000. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer mushroom. *Alter Med Rev* 5: 4-27.
 - Zhong JJ, Tang YJ. 2004. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 87: 25-59.
 - Kim SW, Hwang HJ, Park JP, Cho YJ, Song CH, Yun JW. 2002. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushroom under different media. *Lett Appl Microbiol* 34: 56-61.
 - Sugihara TF, Humfeld H. 1954. Submerged culture of the mycelium of various species of mushroom. *Appl Microbiol* 2: 170-172.
 - Yang XM. 1988. *The cultivation of edible mushrooms in China*. Agriculture Press, Beijing, China.
 - Liu CY. 1981. Technique of cultivation of monkey head mushroom. *Edible Fungi* 4: 33-34.
 - Arnone A, Cardillo R, Nasini G, de Pava OV. 1994. Secondary mold metabolites: Part 46. Hericenones A-C and erinapyrone C, new metabolites produced by the fungus *Herichium erinaceum*. *J Nat Prod* 57: 602-606.
 - Baek GY. 2001. Studies on the growth characteristics and functional screening of mycelia and fruiting body of *Herichium erinaceum*. *MS Thesis*. Chungju National University, Chungbuk, Korea.
 - Ha TM, Ji JH, Jeong HK. 1996. A liquid cultivation of *Herichium erinaceum* hyphae using by-product of food, and health drink compositions containing hyphae extract thereof. *Korean Patent* 10-0187892.
 - Malinowska E, Krzyczkowski W, Herold F, Lapienis G, Ślusarczyk J, Suchocki P, Kuraś M, Turło J. 2009. Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with anti-oxidant activity in liquid culture of *Herichium erinaceum*. *Enz Micro Technol* 44: 334-343.
 - Ko HG, Park HG, Park SH, Choi CW, Kim SH, Park WM. 2005. Comparative study of mycelial growth and basidiomata formation in seven different species of the edible mushroom genus *Herichium*. *Bioresour Technol* 96: 1439-1444.
 - Chung JY, Kim CS. 2008. Antioxidant activities of domestic garlic (*Allium sativum* L.) stems from different areas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 972-978.
 - Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
 - Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal Biochem* 54: 484-489.
 - Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
 - Sugawara I, Kimoto M, Fujimoto M, Ishizaka S, Tsuji T, Nishiyama T. 1984. MTT assay, rapid colorimetric assay applicable to cellular proliferation and cytotoxicity assay. *Igakuno Ayumi* 123: 733-735.
 - Yu KW, Kim YS, Shin KS, Kim JM, Suh HJ. 2005. Macrophage-stimulating activity of exo-biopolymer from

- cultured rice bran with *Monascus pilosus*. *Appl Biochem Biotechnol* 126: 35-48.
20. Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. 1998. Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To". *Phytomedicine* 5: 353-360.
 21. Pagé B, Pagé M, Noël C. 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *Int J Oncol* 3: 473-476.
 22. Conrad RE. 1981. Induction and collection of peritoneal exudates macrophages. In *Manual of Macrophage Methodology*. Herscovitz BH, Holden HT, Bellanti JA, Ghaffar A, eds. Marcel Dekker Incorporation, New York, NY. p 5-11.
 23. Suzuki I, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M, Yadomae T. 1990. Effect of orally administered-glucan on macrophage function in mice. *Int J Immunopharmacol* 12: 675-684.
 24. Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YU, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I, Kim JB. 1998. Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int J Immunopharmacol* 20: 163-172.
 25. Yang HS, Yu KW, Choi YM. 2004. Isolation of polysaccharides modulating mouse's intestinal immune system from peels of *Citrus unshiu*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1476-1485.
 26. Xavier-Santos S, Carvalho CC, Bonfá M, Silva R, Capelari M, Gomes E. 2004. Screening for pectinolytic activity of wood-rotting basidiomycetes and characterization of the enzymes. *Folia Microbiol (Praha)* 49: 46-52.
 27. Han J. 2003. Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Hericium erinaceum* for degrading starch and upgrading nutritional value. *Int J Food Microbiol* 80: 61-66.
 28. Mowat AM, Viney JL. 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156: 145-166.
 29. Trier JS. 1991. Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterol Clin North Am* 20: 531-547.
 30. Kadhim S, Penney C, Lagraoui M, Heibein J, Attardo G, Zacharie B, Connolly T, Gagnon L. 2000. Synergistic anti-tumor activity of a novel immunomodulator, BCH-1393, in combination with cyclophosphamide. *Int J Immunopharmacol* 22: 659-671.
 31. Kudo C, Saito M, Yoshida T. 1995. Curative treatments of murine colon 26 solid tumors by immunochemotherapy with G-CSF and OK-432. *Immunopharm* 29: 235-243.
 32. Yoo YC, Saiki I, Sato K, Azuma I. 1994. MDP-Lys (L18), a lipophilic derivative of muramyl dipeptide, inhibits the metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumors in mice. *Vaccine* 12: 175-180.
 33. Ha ES, Hwang SH, Shin KW, Yu KW, Lee KH, Choi JS, Park WM, Yoon TJ. 2004. Anti-metastatic activity of glycoprotein fractionated from *Acanthopanax senticosus*, involvement of NK-cell and macrophage activation. *Arch Pharm Res* 27: 217-224.
 34. Yoon TJ, Sung JY, Yu KW, Lee H, Lee KH. 2007. Induction of enhancement of anti-tumor immunity by polysaccharides fractionated from *Acanthopanax senticosus*. *Kor J Pharmacogn* 38: 117-122.
 35. Yoon TJ, Yu KW, Shin KS, Suh HJ. 2008. Innate immune stimulation of exo-polymers prepared from *Cordyceps sinensis* by submerged culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 80: 1087-1093.
 36. Fidler IJ. 1985. Macrophage and metastasis—a biological approach to cancer therapy. *Cancer Res* 45: 4714-4726.

(2009년 7월 15일 접수; 2009년 11월 10일 채택)