

추출조건에 따른 차가버섯 생리활성 및 면역활성 다당

백길훈¹ · 정현상¹ · 김 훈² · 윤택준³ · 서형주⁴ · 유광원^{5*}

¹충북대학교 식품공학과, ²(주)코시스바이오
³유한대학교 식품영양학과, ⁴고려대학교 식품영양학과
⁵한국교통대학교 식품영양학과

Pharmacological Activity of Chaga Mushroom on Extraction Conditions and Immunostimulating Polysaccharide

Gil-Hun Baek¹, Heon-Sang Jeong¹, Hoon Kim², Taek-Joon Yoon³,
Hyung-Joo Suh⁴, and Kwang-Won Yu^{5*}

¹Dept. Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

²CosisBio Corporation Limited, Chungbuk 365-863, Korea

³Dept. Food and Nutrition, Yuhan College, Gyeonggi 422-749, Korea

⁴Dept. Food and Nutrition, Korea University, Seoul 136-703, Korea

⁵Dept. Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Chungbuk 368-701, Korea

Abstract

To investigate the pharmacological activity of chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) on extraction conditions, chaga was extracted using water (reflux at 50°C, decoction over 90°C, pressure at 121°C) or ethanol (reflux at 50, 70, or 90°C). When water extract was further fractionated into crude polysaccharide (IO-CP), yields of IO-CP (4.8~16.8%) were higher than those of ethanolic extracts (IO-E, 1.9~2.7%) at increased temperature. For antioxidant activity, crude polysaccharide (IO-CP-121) obtained by pressurized extraction showed the highest polyphenolic and flavonoid contents (35.10 mg TAE/g and 18.48 mg QE/g, respectively) as well as DPPH and ABTS free radical scavenging activities (26.08 and 27.99 mg AEAC/100 mg, respectively). Meanwhile, IO-CP-D (decoction) and IO-CP-50 (reflux) had more potent mitogenic effects (2.10- and 1.95-fold of saline control at 100 µg/mL) as well as intestinal immune system modulating activities (6.30- and 5.74-fold) compared to IO-CP-121, whereas ethanolic extracts showed no activity. Although no IO-CP showed cytotoxicity against RAW 264.7 cells at 0.1 mg/mL, IO-CP-121 significantly inhibited TNF-α and NO production as pro-inflammatory factors in LPS-stimulated RAW 264.7 cells (29.2 and 63.5%, respectively). Ethanolic extracts also showed no cytotoxicity at 0.1 mg/mL, whereas inhibition of TNF-α and NO production was significantly low compared to that of IO-CP-121. In addition, active IO-CP-D was further fractionated into an unadsorbed (IO-CP-I) and seven adsorbed fractions (IO-CP-II~VIII) by DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography in order to isolate immunostimulating polysaccharide. IO-CP-II showed the most potent mitogenic effect and macrophage stimulating activity (4.51- and 1.64-fold, respectively). IO-CP-II mainly contained neutral sugars (61.86%) in addition to a small amount of uronic acid (2.96%), and component sugar analysis showed that IO-CP-II consisted mainly of Glc, Gal, and Man (molar ratio of 1.00:0.55:0.31). Therefore, extraction conditions affect the physiological activity of chaga, and immunostimulating polysaccharide fractionated from chaga by decoction is composed mainly of neutral sugars.

Key words: chaga mushroom, extraction condition, solvent extract, crude polysaccharide, pharmacological activity

서 론

지구상에 수 만종이나 존재하는 귀중한 생물자원인 버섯은 다양한 효능이 알려져 오래전부터 한방 및 민간생약으로 사용되었을 뿐만 아니라 버섯 추출물이나 배양물이 체질개선이나 각종 질병의 예방 및 치료에 효과가 있는 것으로 보고되면서 최근에는 의약품 및 건강식품으로의 용도도 크게

증가하고 있는 추세이다(1-3). 버섯의 유용성분은 alkaloids, flavonoids 및 terpenoids와 같은 저분자 물질(4,5)뿐만 아니라 다당류, 단백질, tannin 등과 같은 고분자 물질(6-8)이 다양하게 혼재되어 있다. 저분자 물질이 갖는 생리활성과 이에 대한 연구는 비교적 상세히 과학적인 해명이 이루어져 왔지만 대부분 methanol 또는 ethanol과 같은 물 이외의 용매를 사용하여 추출함으로써(9,10), 식품 형태로 섭취하는 경우

*Corresponding author. E-mail: kwyu@ut.ac.kr
Phone: 82-43-820-5333, Fax: 82-43-820-5850

가공에서의 어려움을 초래할 뿐만 아니라 식품에 이용되는 활성 저분자 물질의 소재로서의 제약을 가져 왔다. 본 연구에서는 버섯의 식품소재로서 이용에 제약을 주는 이러한 요소들을 극복하기 위한 방법으로 오래전부터 생약재로 이용된 차가버섯을 물과 에탄올을 이용하여 다양한 온도와 추출 방법으로 추출한 후 생리활성을 비교함으로써 식품에 이용할 수 있는 추출물의 식품소재화 가능성을 모색하고자 하였다. 또한, 차가버섯 추출조건과 유효성분 추출수율 향상을 통한 생리활성 증가와의 관계를 연구한 경우도 거의 없었고, 시중에서는 고온보다 40~50°C의 저온처리가 차가버섯 생리활성 유효성분의 적합한 추출방법으로 소개되고 있어 이를 과학적으로 규명하는 것도 중요하다고 사료된다.

차가버섯(*Chaga*, *Inonotus obliquus*)은 Basidiomycetes의 Hymenochaetaceae에 속하며 러시아, 한국, 동유럽과 미국 북부지역의 자작나무 등에 자생하는 버섯으로 16세기 이후 민간에서 암, 위염, 궤양 및 결핵 치료 등에 사용되어 왔는데(11), 최근 연구에서는 polyphenolic 화합물, triterpenoid, steroid와 betulin 등이 다양한 생리활성을 갖는 것으로 확인되었다(12). Park 등(13)은 차가버섯의 polyphenolic 추출물이 인체 림프구에서 DNA로의 산화적 손상 예방효과를 보고하였으며, 차가버섯의 submerged culture로 배양된 균사체 다당류의 면역활성도 확인되었다(14). 그러나 국내에서 차가버섯을 이용한 가공제품은 단순한 추출·농축음료, 분말, 캡슐, 과립차 등이 주를 이루고 있어 유효성분이 증진된 기능성 고부가가치의 새로운 차가버섯 가공제품이 개발될 필요성에 관심이 모아지고 있다. 또한, 국내에서 유통되는 차가버섯은 다양한 산지와 경로를 통해 유입되어 거래되고 있는데, 그 기원이 불분명하고 단순한 추출진액을 벗어난 다양한 가공제품으로 개발은 거의 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 기원 및 출처가 분명한 차가버섯을 구입하여 다양한 생리활성이 증진될 수 있는 추출공정을 확립하고, 여러 생리활성 중 면역활성 다당소재의 식품 및 화장품 소재로서의 활용가능성을 검토하기 위해 면역활성이 높은 추출물로부터 산업적으로 이용 가능한 면역활성 다당의 분리조건과 특성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 연구에서는 향후 산업적인 이용 등을 고려하여 기원과 출처가 분명한 차가버섯(*I. obliquus*)을 (주)기능성다당연구소(Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 활성다당 분획을 위한 DEAE-Sephrose CL-6B는 Amersham Biosciences(Uppsala, Sweden)에서 입수하였고, 동물세포 배양에 필요한 RPMI 1640 배지와 penicillin, streptomycin, fetal bovine serum(FBS)은 GenDEPOT(Barker, TX, USA)로부터, fungizone과 amphotericin B는 Gibco-BRL Co.(Grand

Island, NY, USA)에서 입수하였다. 한편, 세포생존률 및 면역활성 측정을 위한 cell counting kit(CCK)-8은 Dojindo Laboratories(Kumamoto, Japan)로부터 구입하였다.

추출조건에 따른 차가버섯 용매추출물 조제

차가버섯 추출방법과 온도 등 추출조건에 따른 용매추출물을 조제하기 위하여 차가버섯을 분쇄한 후 적당한 입자의 분말로 조제하였다. 물 추출물은 차가버섯 분말에 20배의 증류수를 첨가하고 homogenizer(KG-IKA Labortechnik, Staufen, Germany)로 5,000 rpm에서 10분간 균질화한 후 50°C는 stirring mantle(Misung S&I, Daejeon, Korea)을 이용하여 reflux법으로 2시간 동안 추출하였고 decoction은 90°C 이상의 온도에서 추출하였으며, 가압추출물은 auto-clave를 이용하여 121°C에서 추출하였다. 각 온도에서 추출된 물 추출액은 여과한 후 잔사와 추출액을 분리하고 잔사는 다시 동일한 과정으로 반복 추출하였다(2회). 추출액은 모두 합쳐 원심분리(7,600×g, 4°C, 30분)로 불용성 침전물을 제거하고 농축 및 동결건조 하여 각 추출온도에 따른 물 추출물로 조제하였다(IO-HW-50, IO-HW-D 및 IO-HW-121). 한편, 에탄올추출물은 차가버섯 분말에 5배의 95% 에탄올을 첨가한 후 50°C, 70°C 및 90°C 온도로 2시간 동안 reflux법으로 추출한 후 여과하여 잔사와 추출액으로 분리하였다. 잔사는 다시 동일과정으로 반복추출 하였으며(3회), 회수한 추출액은 모두 합쳐 원심분리, 농축 및 동결건조를 거쳐 추출온도에 따른 에탄올추출물로 조제하였다(IO-E-50, IO-E-70 과 IO-E-90).

차가버섯 물 추출물로부터 조다당획분 조제 및 활성획분 분획

물 추출물을 다당류, 단백질과 단백다당 등의 고분자 물질의 함량이 높은 획분으로 조제하기 위하여 각 추출온도에 따른 물 추출물을 다시 증류수에 용해시킨 후 5배의 에탄올을 첨가하여 교반하고 원심분리 하여 침전물을 분리하였다. 회수한 침전물을 소량 증류수에 재용해하고 투석, 원심분리, 농축 및 동결건조를 거쳐 추출온도에 따른 물 추출물의 조다당획분으로 조제하였다(IO-CP-50, IO-CP-D 및 IO-CP-121). 차가버섯의 다양한 생리활성 중 면역활성 다당소재의 활용가능성을 검토하기 위해 물 추출물 조다당획분 중 수율과 함께 면역활성이 높은 IO-CP-D를 물에 용해한 후 증류수로 평형화시킨 DEAE-Sephrose CL-6B column(CI form, 4.0×30.0 cm)에 loading하였다. 증류수로 비흡착 획분(IO-CP-I)을 용출시킨 후 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0과 2.0 M NaCl 용액으로 흡착획분을 용출시키고 투석, 농축 및 동결건조 하여 IO-CP-II~VIII의 획분으로 분획하였다.

조다당획분으로부터 분획된 활성획분의 구성분 및 구성당 분석

DEAE-Sephrose CL-6B로 분획된 면역활성 획분의 구성분은 중성당, 산성당 및 단백질 함량을 표준물질인 glu-

cose, galacturonic acid와 bovine serum albumin(BSA)을 이용하여 phenol-sulfuric acid법(15), *m*-hydroxybiphenyl 법(16)과 Bio-Rad dye(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용한 Bradford법(17)으로 분석하였다. 한편, 활성 다당획분의 구성당은 Jones와 Albersheim(18)의 방법으로 분석하였다. 즉, 시료를 2.0 M trifluoroacetic acid(TFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 121°C에서 1.5시간 가열하여 가수분해 시킨 후 NaBH₄(Sigma-Aldrich)를 이용하여 각 구성당을 alditol로 환원시키고 acetic anhydride(Sigma-Aldrich)를 첨가하여 alditol acetate 유도체로 전환시켰다. 합성된 유도체는 SP-2380 column(0.2 μm film thickness, 0.25 mm i.d.×30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 gas chromatography(Young Lin Co. Ltd., Anyang, Korea)를 이용하여 분석하였는데, 시료 구성당은 표준당의 retention time과 비교하여 분석하였고, 구성당 mole%는 각 peak 면적비와 alditol acetate 유도체 분자량으로 계산한 후 정량화하고 그 비율을 molar ratio로 표시하였다(19).

항산화 성분 분석 및 항산화 활성

다양한 추출방법에 따라 조제된 조다당획분과 에탄올추출물의 총 폴리페놀성 화합물 함량은 Folin-Ciocalteu법(20)을 이용하여 측정하였다. 즉, 시료 0.1 mL(1 mg/mL)에 2% Na₂CO₃ 2 mL를 첨가하고 3분간 방치한 후 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.1 mL를 잘 혼합하여 30분간 방치한 후 반응액의 흡광도를 750 nm에서 측정하였다. 표준물질로 tannic acid(Sigma-Aldrich)를 희석하여 사용하였으며, 검량선 작성 후 총 폴리페놀성 화합물 함량은 시료 1 g중 mg tannic acid equivalent(TAE)로 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 Jia 등(21)의 방법에 따라 시료 0.5 mL(1 mg/mL)에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1.0 M potassium acetate 0.1 mL와 에탄올 4.3 mL를 차례로 혼합하고 실온에서 40분간 정치한 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 quercetin을 사용하였으며 시료 1 g중 mg quercetin equivalent(QE)로 나타내었다. 한편, DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich) radical을 이용한 시료의 항산화 활성은 Cheung 등(22)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, DPPH radical 용액(0.2 mM)에 시료 50 μL를 가한 후 상온에서 30분 방치하고 517 nm에서 반응액의 흡광도 변화를 측정하였다. 표준물질로는 5 mM L-ascorbic acid를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 적정농도를 찾아 동량 첨가하였다. 총 산화력은 시료 100 mg중 표준물질인 ascorbic acid와 비교 산출한 ascorbic acid equivalent antioxidant capacity(AEAC)로 나타내었다. 또한, ABTS cation decolorization assay에 의한 총 항산화력은 Choi 등(23)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 7.4 mM 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS, Sigma-Aldrich)와 2.6 mM potassium persulphate를 하루 동안 암소에서 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도

값이 1.5가 되도록 몰 흡광계수($\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 이용하여 증류수로 희석하였다. 이 용액에 시료 50 μL를 가한 후 상온에서 60분간 방치하여 반응액의 흡광도 변화를 측정하였다. 표준물질로는 5 mM L-ascorbic acid를 사용하여 총 산화력은 DPPH와 동일하게 시료 100 mg중 AEAC로 나타내었다.

실험동물과 동물세포 배양

실험동물은 생후 6주령의 C3H/He, ICR 및 BALB/c 마우스(♀)를 (주)샘타코(Gyeonggi, Korea)에서 구입한 후 사육조에 넣고 정수된 물과 실험동물용 펠렛사료(Samyang Co., Incheon, Korea)를 자유공급 하였다. 한편, 항염증 실험에 사용된 RAW 264.7(murine macrophage cell line) 세포주는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받았으며, 10% FBS와 penicillin, streptomycin 및 fungizone과 amphotericin B를 함유한 DMEM(GenDEPOT) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기(Vision Scientific, Gyeonggi, Korea)에서 2~3일 간격으로 계대하면서 배양하였다. 또한, 항염증실험의 염증유도에 사용된 lipopolysaccharide(LPS from *Escherichia coli*)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였고 tumor-necrosis factor(TNF)-α를 정량하기 위한 ELISA kit는 BD Bioscience(San Diego, CA, USA)에서 입수하여 실험에 사용하였다.

면역활성

BALB/c 마우스를 경구달치시킨 후 멸균적으로 spleen을 적출하여 마쇄하고 0.2% NaCl로 적혈구를 용혈시킨 후 급속침(#200)으로 여과하여 splenocyte를 회수하고 penicillin, streptomycin, fungizone과 amphotericin B를 함유한 RPMI 1640으로 3회 세척한 다음 5×10^6 cells/mL로 세포현탁액을 조제하였다. 비장세포 현탁액을 96 well plate(SPL Life Science, Gyeonggi, Korea)에 90 μL씩 분주하고 적당한 농도로 희석한 시료 10 μL를 첨가하여 48시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 시료의 마이토젠 활성은 10배 희석한 CCK-8 kit 용액(24)을 100 μL 첨가하여 6시간 배양한 후 450 nm에서 ELISA reader(TECAN, Grödingen, Austria)로 흡광도를 측정하여 saline 대조군의 비장세포 증식도에 대한 relative activity(%)로 나타내었다. 마크로파지 활성은 효소(lysosomal phosphatase) 활성도와 마크로파지로부터 활성화에 관여하는 cytokine(IL-6와 TNF-α, BD Bioscience)의 생성능으로 검토하였다. 먼저, 효소활성도 측정방법은 ICR 마우스 복강에 3% thioglycollate(TG, Sigma-Aldrich)를 2 mL 주입하고 72시간 경과된 후에 유도된 복강 마크로파지를 회수하여 사용하였다. 마크로파지는 RPMI 1640으로 세척하고 1×10^6 cells/mL로 분산시킨 후 96 well plate에 200 μL씩 분주하여 마크로파지 monolayer를 형성시켰다(25). 2시간 후 상등액을 제거하고 non-adherent cell을 RPMI 1640으로 세척한 후 10% FBS가 함유된 RPMI-FBS 180 μL와 시료 20 μL를 분주하여 배양하면서 마크로파지를 자극하였

다. 24시간 후 상등액을 제거하고 남은 마크로파지에 0.1% Triton X-100 25 μ L로 세포막을 용해시켜 분비된 lysosomal phosphatase에 기질로서 100 mM *p*-nitrophenylphosphate(Sigma-Aldrich) 150 μ L와 0.1 M citrate buffer 50 μ L를 첨가하여 반응시켰다. 시료의 마크로파지 활성은 반응 30분 후 0.2 M borate buffer를 가하여 정지시키고 405 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여(26) saline 대조군에 대한 phosphatase 활성을 relative activity(%)로 나타내었다. 또한, 마크로파지 활성화에 관여하는 cytokine인 IL-6와 TNF- α 의 생성능은 ELISA kit를 이용하여 함량으로 표시하였다. 한편, Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성은 Yu 등의 방법(27)을 이용하여 측정하였는데, C3H/He 마우스 복부를 절개하여 소장벽 위의 Peyer's patch를 적출한 후 마쇄하고 금속망(#200)으로 여과하여 Peyer's patch 세포액으로 조제하였다. 세포현탁액은 10% FBS 함유 RPMI-FBS로 세척하여 2×10^6 cell/mL의 세포농도로 조정된 후 96 well plate에 180 μ L씩 분주하고 적당히 희석된 시료를 20 μ L 첨가하여 5일간 배양하고 상등액(conditioned medium)만을 회수하여 골수세포 증식실험에 사용하였다. 골수세포는 동일 마우스의 대퇴부 뼈에서 회수한 다음 여과, 세척하고 2.5×10^5 cells/mL로 조정하여 100 μ L씩 well에 분주하고 conditioned medium을 50 μ L씩 첨가하여 6일간 재배양하였다. 시료의 Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성은 배양액에 CCK-8 kit 용액 10 μ L를 첨가하고 6시간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 saline 대조군의 골수세포 증식도에 대한 relative activity(%)로 표시하였다.

항염증 활성

다양한 추출방법에 따라 조제된 조다당획분과 에탄올추출물에 대한 대표적인 염증성 cytokine인 TNF- α 와 nitric oxide(NO)의 생성 억제능을 측정하기 위해 먼저, 시료의 독성여부를 CCK-8 kit 용액을 사용하여 확인하고 saline 대조군에 대한 세포생존율(%)로 표시하였다. 한편, cytokine 생성 억제능 측정은 RAW 264.7 cell을 10% FBS 함유 DMEM-FBS에서 1×10^6 cells/mL로 조정하여 96 well plate에 200 μ L씩 분주한 다음 5% CO₂ incubator에서 배양하여 세포를 부착시켰다. 12시간 뒤 배양액을 모두 제거하고 새로운 DMEM-FBS 160 μ L와 시료 20 μ L를 함께 첨가하고 30분 후에 LPS를 처리하여 6시간(TNF- α) 및 48시간(NO) 배양하였다. LPS로 유도된 염증성 cytokine 및 NO측정은 세포 배양 상등액을 50~100 μ L 취하여 BD Bioscience의 사용방법 및 Griess 시약 반응법(28)을 이용하여 측정하고 LPS 처리군에 대한 억제율(%)로 나타내었다.

통계처리

실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 실험결과의 평균과 표준편차

를 산출하고 평균치 \pm SD로 나타내었으며, 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 각 측정값간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

결과 및 고찰

추출조건에 따른 차가버섯 용매추출물의 생리활성

천연물은 추출조건에 따라 용출되는 성분과 수율이 다르기 때문에 활성에 영향이 큰 것으로 알려져 천연물의 추출조건 확립은 대단히 중요한 과정 중 하나이다. 본 연구에서는 차가버섯을 이용하여 추출조건에 따른 생리활성을 검토함으로써 생리활성에 따른 추출조건을 확립하고자 하였다. 식품과 화장품 등에 적용되는 소재로서의 적성을 고려하여 물은 50°C reflux(IO-HW-50), 90°C 이상의 decoction(IO-HW-D) 및 121°C에서의 가압추출(IO-HW-121) 방법을 이용하였으며, 에탄올의 경우에는 50, 70 및 90°C에서 reflux로 추출(IO-E-50, 70과 90)하여 용매추출물을 조제한 후 항산화, 면역활성 및 항염증활성을 검토하였다. 추출조건에 따른 용매추출물 수율은 물과 에탄올추출물 모두 온도가 증가함에 따라 증가되는 경향을 나타내었는데 에탄올추출물(1.9~2.7%)보다는 물 추출물(12.7~36.8%)에서 온도증가에 따른 수율 증가가 컸으며, 에탄올추출보다 물 추출에서 수율이 크게 증가함을 확인할 수 있었다(Table 1). 또한, 물 추출물의 경우 reflux와 decoction(12.7과 19.9%)보다는 가압추출물(36.8%)의 수율이 크게 증가되고 있음을 알 수 있었다. 이러한 추출물의 생리활성을 검토하기 위하여 먼저 항산화 성분 함량 및 라디칼 소거능의 항산화 활성을 검토한 결과(Table 1), 총 폴리페놀 함량은 가압추출된 물 추출물(IO-HW-121)이 26.81 mg TAE/g로 가장 높았으며, 총 플라보노이드 함량에서는 70°C reflux의 에탄올추출물(IO-E-70)이 13.11 mg QE/g로 가장 높은 함량을 나타내었다. 한편, DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 통한 항산화력에서도 IO-HW-121과 IO-E-70이 항산화 성분에서처럼 다른 용매추출물보다 우수한 활성을 나타내었다(Table 1). 에탄올추출물은 수율은 적으나 항산화 성분 및 활성이 우수한 결과로부터 추출물에 항산화에 관여하는 저분자 물질이 다량 추출된 것으로 보이며 IO-E-90에서 IO-E-70보다 항산화 성분과 활성이 다소 감소된 것은 온도에 불안정한 활성성분의 특성을 보여주는 것으로 생각된다. 또한, 물 추출물의 경우에는 가압 추출된 IO-HW-121이 유의적으로 가장 높은 폴리페놀 함량과 에탄올추출물(특히 IO-E-70)과 유의적인 차이는 없으나 우수한 항산화 활성을 나타냄으로써 고 수율과 함께 reflux 또는 decoction보다 가압추출에서 조직이 충분히 파쇄되어 유리형뿐만 아니라 결합형 폴리페놀과 플라보노이드도 다량 회수된 것으로 추정된다(29).

한편, 마크로파지, 마이토젠 및 장관면역 활성 등의 면역활성에서 에탄올추출물은 saline 대조군과 유사한 정도의 낮

Table 1. Antioxidant component contents and antioxidant activities of crude polysaccharide fractions and solvent extracts from *Inonotus obliquus* on extraction temperatures

Extract ¹⁾		Total polyphenol (mg TAE/g)	Total flavonoid (mg QE/g)	DPPH (mg AEAC/100 mg)	ABTS (mg AEAC/100 mg)	Yield (%) ²⁾
Hot-water extract (HW)	IO-HW-50	12.47±0.20 ^{a3)}	5.80±0.43 ^a	7.00±0.42 ^a	10.93±1.68 ^a	12.7
	IO-HW-D	21.58±0.20 ^c	9.92±0.61 ^b	13.70±0.99 ^{bc}	17.92±0.21 ^c	19.9
	IO-HW-121	26.81±0.31 ^f	10.73±0.18 ^{bc}	18.78±0.96 ^{ef}	22.82±0.50 ^f	36.8
Crude polysaccharide (CP)	IO-CP-50	21.83±0.16 ^c	12.75±0.22 ^d	12.26±0.55 ^b	16.14±1.93 ^b	4.8
	IO-CP-D	23.86±0.31 ^{de}	14.75±0.88 ^e	13.97±0.12 ^c	18.26±0.65 ^c	9.1
	IO-CP-121	35.10±0.92 ^g	18.48±0.78 ^f	26.08±2.00 ^g	27.99±1.16 ^g	16.8
EtOH extract by reflux (E)	IO-E-50	20.04±0.68 ^b	11.54±0.35 ^c	15.98±0.61 ^d	19.07±0.43 ^{cd}	1.9
	IO-E-70	24.38±1.38 ^e	13.11±0.31 ^d	19.72±0.66 ^f	22.31±0.60 ^{ef}	2.4
	IO-E-90	22.58±1.29 ^{cd}	12.72±0.37 ^d	17.95±0.38 ^e	20.58±0.39 ^{de}	2.7

TAE: tannic acid equivalents, QE: quercetin equivalents, AEAC: ascorbic acid equivalent antioxidant capacity.

¹⁾IO-HW-50 was prepared by reflux at 50°C; IO-HW-D by decoction over 90°C, IO-HW-121 by pressurized extraction at 121°C. IO-CP-50, D and 121 were prepared by EtOH precipitation from IO-HW-50, IO-HW-D and IO-HW-121, respectively.

²⁾Yield (w/w%) against raw materials.

³⁾Results are expressed as mean±SD of quadruplicate samples, and the different superscripts are significantly different (p<0.05) in each column.

은 활성을 나타낸 반면, 물 추출물은 측정하는 활성종류에 따라 추출온도별 활성차이는 있었으나 모든 활성에서 saline 대조군 또는 에탄올추출물보다 유의적으로 면역활성이 높아 저분자보다는 물에 추출되는 고분자 물질이 주로 면역활성에 관여하는 것으로 확인되었다(Table 2). 특히, decoction으로 추출된 IO-HW-D의 경우에는 마이토젠 및 Peyer's patch를 경유하는 장관면역 활성에서 가장 우수하였으며 (saline 대조군의 1.57배와 4.80배, 100 µg/mL), 50°C reflux로 추출된 IO-HW-50은 마크로파지 활성에서 가장 높은 활성(1.30배)을 나타내었으나 IO-HW-D(1.26배)와 유의적으로 큰 차이를 보이지는 않았다(Table 2). 항산화활성이 우수하였던 IO-HW-121은 마이토젠과 마크로파지에서는 IO-HW-D와 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 장관면역 활성에서는 유의적으로 현저히 낮은 활성을 보여주었는데(Table 2), 이는 활성성분 즉, 다당류 또는 단백다당 등의 고분자 화합물이 가압고온에서 파괴 또는 구조에 영향을 받아 활성

이 감소한 것으로 생각된다. 일반적으로 천연물로부터 추출된 고분자류의 생리활성은 추출조건에 의해 영향을 받는데, 특히 추출온도가 증가하면서 추출량은 증가하나 높은 온도에서의 장시간에 걸친 추출이 오히려 고분자류 결합을 해리시켜 고분자류 분자량이 감소하면서 물 추출물의 생리활성을 감소시키는 것으로 보고(30)되고 있기 때문에 면역활성 소재로서는 IO-HW-D가 가장 적당한 것으로 확인되었다.

차가버섯 용매추출물의 LPS 자극에 의한 RAW 264.7 세포주에 대한 항염증 활성을 검토하기 위하여 시료의 RAW 264.7 세포주에 대한 독성활성을 검토한 결과(Fig. 1), 0.1 mg/mL의 시료농도에서는 모든 용매추출물에서 독성을 나타내지 않아 이 농도에서 염증성 cytokine인 TNF-α와 NO 생성능에 대한 억제활성을 측정하였다. TNF-α 생성 억제능에서는 물과 에탄올추출물 모두 추출온도 간 유의적인 차이를 보이지는 않았으나 IO-HW-121이 LPS 처리군과 비교하여 유의적으로 가장 높은 억제능(LPS 처리군의 17.0%)을

Table 2. Immunostimulating activities of crude polysaccharide fractions and solvent extracts from *Inonotus obliquus* on extraction temperatures (sample 100 µg/mL)

Extract ¹⁾	Immunostimulating activity (relative activity, %) ²⁾			
	Mitogen	Macrophage	Intestinal immune	
Saline control	100±2.17 ^{a3)}	100±1.40 ^a	100±2.23 ^a	
Hot-water	IO-HW-50	133.38±2.99 ^b	130.13±2.53 ^c	315.89±16.23 ^{bc}
	IO-HW-D	157.10±10.58 ^c	126.21±8.13 ^c	479.63±37.16 ^d
	IO-HW-121	149.49±7.25 ^{bc}	121.99±2.61 ^{bc}	291.57±18.04 ^b
Crude polysaccharide	IO-CP-50	195.25±10.54 ^d	127.16±1.60 ^c	573.86±38.81 ^e
	IO-CP-D	209.74±18.25 ^d	126.88±5.89 ^c	630.24±53.20 ^f
	IO-CP-121	144.55±14.67 ^{bc}	119.73±5.86 ^{abc}	447.20±31.85 ^d
EtOH	IO-E-50	101.31±2.17 ^a	109.58±11.03 ^{abc}	100.36±4.46 ^a
	IO-E-70	111.13±7.31 ^a	103.04±8.24 ^{ab}	98.57±2.84 ^a
	IO-E-90	104.25±11.64 ^a	102.18±5.36 ^{ab}	103.21±5.90 ^a

¹⁾Extract refer to Table 1.

²⁾Relative activity (%)=[(absorbance of sample)/ (absorbance of saline control)]×100.

³⁾Results are expressed as (mean±SD of quadruplicate samples, and different superscripts are significantly different (p<0.05) in each activity.

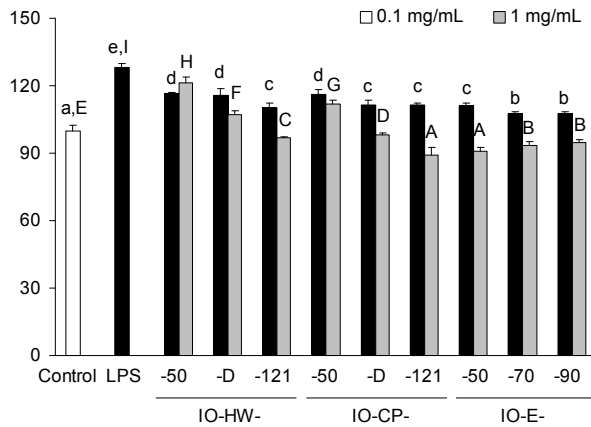


Fig. 1. Cell viability effects of crude polysaccharide fractions and solvent extracts from *Inonotus obliquus* on extraction temperatures in RAW 264.7 cell lines. IO-HW-50, D and 121 were extracted using water by reflux at 50°C, decoction over 90°C and pressure at 121°C; IO-E-50, 70 and 90 were prepared by EtOH reflux at 50°C, 70°C and 90°C; IO-CP-50, D and 121 were fractionated by EtOH precipitation from IO-HW-50, D and 121, respectively. Control, only saline without any extract; LPS, LPS-treated cell line. Results are expressed as mean±SD of quadruplicate samples, and the different letters are significantly different ($p < 0.05$) in each concentration (small letters, 0.1 mg/mL; large letters, 1 mg/mL).

보인 반면, 에탄올추출물의 경우에는 LPS 처리군을 유의적으로 억제하지 않았다(2.6~7.8%, Table 3). NO 생성 억제능의 경우에서도 물 추출물인 IO-HW-D가 추출온도 중 유의적으로 가장 높은 억제능(LPS 처리군의 56.2%)을 나타내었으나, 에탄올추출물은 추출온도 간 유의성을 보이지 않으면서 15.5~18.6%의 억제능으로 물 추출물보다 현저히 낮은 활성을 나타내었다(Table 3). 이러한 결과로부터 항염증 활성도 면역활성과 마찬가지로 에탄올추출물보다 고분자가 다량 함유되어 있는 물 추출물 성분에 의해 증가됨을 알 수 있었다. 또한, 추출온도와 방법에 따라 생산을 억제하는 염

증성 인자의 종류가 다를 것을 보여주었는데, 향후 염증성 인자 종류에 따른 활성성분과의 기작연구를 통해 이러한 차이점을 규명하고자 한다.

결론적으로 다양한 추출조건에 따라 조제된 차가버섯 추출물과 생리활성의 상관관계를 검토한 결과, 에탄올추출물 보다는 물 추출물에서 현저히 높은 수율을 나타낼 뿐만 아니라 검토된 모든 생리활성에서 전반적으로 높은 활성을 나타내었다. 또한, 물 추출물 경우에도 생리활성이 추출방법에 따른 추출온도와 밀접한 관계를 가지고 있음을 나타내어 목적하는 생리활성에 따라 추출조건을 확립하는 것이 중요함을 확인할 수 있었다.

차가버섯 물 추출물의 조다당획분 조제와 생리활성

추출조건에 따른 용매추출물의 생리활성 결과로부터 물 추출물이 우수한 생리활성을 나타내었기 때문에 생리활성을 증진시키기 위하여 물 추출물을 조다당획분으로 분획하고 다양한 생리활성을 검토하였다. 물 추출물은 높은 수율에도 불구하고 여러 종류의 수용성 물질이 포함되어 활성에 영향을 줄 수 있기 때문에 저분자가 주성분인 에탄올추출물과 대조적으로 물 추출물을 고분자 물질 함량이 높은 조다당획분으로 분획하여 활성의 증진여부를 검토하고자 하였다. 일반적으로 조다당획분은 물 추출물을 에탄올 침전시켜 분획함으로써 다당류, 단백질 및 단백당류 등의 고분자 물질이 다량으로 함유된 획분으로 보고되고 있다(31). 이러한 조다당획분은 단순 물 추출물(또는 엑기스)보다 생리활성 증강에 따른 기능성식품 소재로서의 활용성이 높을 뿐만 아니라 산업적으로도 공정추가에 경제적인 부담이 없어 적용이 용이한 공정이다. 조다당획분(IO-CP) 수율도 물 추출물에서처럼 온도에 따라 증가하는 경향을 나타내어 IO-HW-50 으로부터 분획된 IO-CP-50은 4.8%를 보인 반면, IO-CP-D와 IO-CP-121은 9.1과 16.8%로 일반적인 천연물 수준보다

Table 3. Inhibitory effects of crude polysaccharide fractions and solvent extracts from *Inonotus obliquus* on the secretion of pro-inflammatory cytokine and production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cell line (sample 0.1 mg/mL)

Extract ¹⁾		Productions of pro-inflammatory factors	
		TNF- α (pg/mL)	NO (μ M)
Saline control		17.79±6.09 ^{a2)}	2.26±0.60 ^a
LPS-stimulated		8,626.45±1,173.38 ^f (0.0) ³⁾	55.35±2.03 ^e (0.0)
Hot-water	IO-HW-50	7,738.72±912.31 ^{cdef} (10.3)	30.69±0.50 ^e (44.6)
	IO-HW-D	8,119.59±730.59 ^{ef} (5.9)	24.26±1.73 ^c (56.2)
	IO-HW-121	7,157.16±565.85 ^{bcd} (17.0)	27.90±0.73 ^d (49.6)
Crude polysaccharide	IO-CP-50	6,953.79±585.52 ^{bcd} (19.4)	21.95±0.39 ^b (60.3)
	IO-CP-D	6,774.83±429.87 ^{bc} (21.5)	20.33±0.31 ^b (63.3)
	IO-CP-121	6,105.67±378.41 ^b (29.2)	20.23±1.27 ^b (63.5)
EtOH	IO-E-50	8,398.95±249.78 ^f (2.6)	45.03±1.70 ^f (18.6)
	IO-E-70	8,162.69±475.91 ^{ef} (5.4)	46.76±1.02 ^f (15.5)
	IO-E-90	7,954.99±212.49 ^{def} (7.8)	45.04±0.76 ^f (18.6)

¹⁾Extracts refer to Table 1.

²⁾Results are expressed as mean±SD of quadruplicate samples, and different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) in each column.

³⁾Inhibition (%) = [(concentration of LPS-stimulated group) - (concentration of sample-stimulated group)] / (concentration of LPS-stimulated group) × 100.

높은 수율을 나타내었다(Table 1). 특히, 가압추출로 조제된 IO-HW-121로부터 분획된 조다당획분(IO-CP-121)은 항산화 성분인 총 폴리페놀 화합물(35.10 mg TAE/g)과 총 플라보노이드 함량(18.48 mg QE/g)이 용매추출물 중 가장 높았던 IO-HW-121 및 IO-E-70보다도 유의적으로 증가되어 조다당획분 중 가장 높은 항산화 성분 함량을 나타내었다(Table 1). 항산화 활성에서도 IO-CP-121로의 분획은 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능(26.08과 27.99 mg AEAC/100 mg)을 다른 조다당획분 또는 용매추출물보다 유의적으로 증진시킴을 알 수 있었다(Table 1).

면역활성에서도 조다당획분으로의 분획은 활성증가에 중요하게 작용하였는데, 비장세포의 마이토젠 활성에서는 용매추출물 중 가장 우수하였던 IO-HW-D(saline 대조군의 1.57배, 100 µg/mL)보다 분획된 IO-CP-D가 유의적으로 증가된 활성(2.10배)을 나타내었으며, IO-CP-50(1.95배)도 IO-HW-50(1.33배)에 비해 증가되었다(Table 2). 그러나 IO-CP-121은 IO-HW-121과 유의적인 차이를 보이지 않아(1.50과 1.45배) 높은 수율(16.8%)에도 불구하고 가압추출은 고분자 물질의 부분적인 분해와 구조적인 영향으로 조다당획분으로의 분획이 활성증진에 기여하지 못하는 것으로 생각되어, 마이토젠에 관여하는 주요 활성성분은 다당류 등의 고분자 물질인 것으로 추정되었다(Table 2). 또한, Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성도 모든 추출온도에서 물 추출물에 비해 조다당획분으로 분획 시 활성이 증가하는 결과를 나타내어 IO-HW-50, IO-HW-D 및 IO-HW-121(3.16, 4.80 및 2.92배, 100 µg/mL)에서 분획된 조다당획분인 IO-CP-50, IO-CP-D 및 IO-CP-121은 5.74, 6.30 및 4.47배로 유의적으로 활성이 증가됨을 확인할 수 있었다(Table 2). 그러나 마크로파지 활성에서는 다른 면역활성과는 달리 모든 추출조건에서 조다당획분으로의 분획이 활성을 증가시키지 못하고 물 추출물과 유의적인 차이를 나타내지 않았는데(1.20~1.27배), DEAE 등 column을 이용한 분획 후 효소활성도 및 cytokine 측면에서의 활성 변화를 검토하는 것이 필요하다고 생각된다.

한편, RAW 264.7 세포주에 대한 시료의 독성은 용매추출물에서와 마찬가지로 0.1 mg/mL 농도에서 어떤 조다당획분도 독성을 나타내지 않았으나 1 mg/mL에서는 독성을 나타내어(Fig. 1), 조다당획분의 염증성 cytokine 및 NO 생성 억제능은 0.1 mg/mL 농도에서 측정하였다. TNF- α 생성 억제능의 경우, 물 추출물에서 가장 우수한 억제능을 나타낸 IO-HW-121(LPS 처리군의 17.0%)보다 IO-CP-121에서 유의적인 차이는 없었으나 증가된 억제능을 나타내었으며(29.2%), NO 억제능에서도 조다당획분 간 유의적인 차이는 없었으나(60.3~63.5%의 억제능) 물 추출물(44.6~56.2%)보다는 염증성 인자의 생성 억제능이 유의적으로 증가됨을 알 수 있었다(Table 3).

이러한 결과로부터 차가버섯 물 추출물의 조다당획분으

로의 분획은 산업적으로도 에탄올 침전 공정추가에 따른 소재화가 복잡하지 않으면서 높은 수율을 얻을 수 있는 점과 열수추출물 또는 엑기스의 단순형태보다 생리활성이 증강된다는 점에서 기능성소재로서의 활용가능성이 충분하다고 사료된다.

차가버섯 조다당획분으로부터 면역활성 다당의 분리

차가버섯 물 추출물로부터 분획된 조다당획분은 항산화, 면역 및 항염증 활성이 용매추출물보다 증가되어 산업적 측면에서 조다당획분 자체만으로도 기능성소재로서의 이용가능성은 충분한 것으로 보인다. 그러나 이러한 조다당획분으로부터 생리활성에 관여하는 주요 성분을 분리하고 이들의 구조적인 특성을 밝혀 향후 특정 기능성소재로서의 활용가능성을 제시할 수 있다면 부가가치 창출측면에서 또 다른 의의를 찾을 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 조다당획분에 주로 함유된 다당류 등의 고분자 물질에 활성성분의 초점을 맞추어 면역활성을 대상으로 다당성분을 분리하고 활성획분의 구조적인 특징을 알아보려 하였다. 추출조건에 따라 조제된 물 추출물의 조다당획분 중 유의적으로 다양한 면역활성을 가지면서 수율도 높은 획분은 IO-CP-D(Table 2)였으므로 이 획분을 DEAE-Sepharose CL-6B column(Cl⁻ form)에 loading하여 증류수로 용출되는 비흡착 획분(IO-CP-I)과 0.1~2.0 M NaCl을 순차적으로 용출시킨 흡착획분(IO-CP-II~VIII)으로 분획하였다(data not shown). DEAE-분획물의 면역활성을 검토한 결과, 마이토젠 활성에서는 조다당획분인 IO-CP-D(1.96배)에 비해 0.1 M NaCl에서 용출된 획분인 IO-CP-II(4.51배)에서 조다당획분보다 활성이 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 한편, 마크로파지 활성의 경우에는 IO-HW-D와 조다당획분인 IO-CP-D의 활성차이가 크지 않았으나(Table 2, Fig. 2), DEAE로 분획하였을 때 모든 분획물에서 증가된 활성을 나타내었으며 마이토젠 활성과 마찬가지로 IO-CP-II(1.64배)에서 조다당획분보다 활성이 유의적으로 증가됨을 확인하여(Fig. 2B) open column chromatography를 통한 활성획분의 분획이 활성증가에 중요하게 작용함을 확인할 수 있었다. 조다당획분 분획과는 달리 column 분획 후에 마크로파지 활성이 증가되는 결과를 재확인하기 위해 마크로파지 활성화에 작용하는 cytokine인 IL-6와 TNF- α 의 생성능을 실험한 결과에서도 saline 대조군과 비교하여 IO-CP-D는 유의적인 차이를 보이지 않은 반면, IO-CP-II에서는 활성화 cytokine의 분비능이 유의적으로 촉진되고 있음을 나타내어(Table 4), 마이토젠과는 달리 조다당획분에 함유된 많은 성분들이 마크로파지 활성증진에 크게 작용을 못하다가 DEAE 분획에 의해 활성에 관여하는 성분함량이 상대적으로 높아지면서 활성이 증가된 것으로 생각된다. 한편, 장관면역 활성의 경우에는 분획 후에 오히려 IO-CP-D보다 현저하게 활성이 감소(data not shown)됨을 나타내어 마크로파지 활성과는 반대로 장관면역 활성에 관여하는 성분은

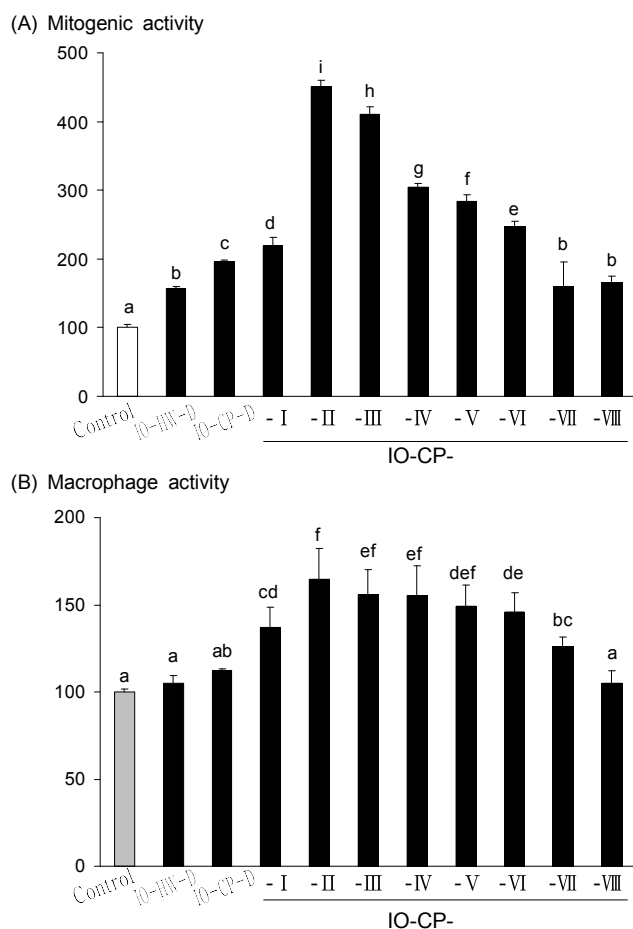


Fig. 2. Immunostimulating activities of subfractions (IO-CP-I~VIII) from IO-CP-D on DEAE-Sephacose CL-6B column chromatography (CI⁻ form). Final concentration of sample is 100 μ g/mL. Results are expressed as mean \pm SD of quadruplicate samples, and the different small letters are significantly different ($p < 0.05$) in each activity.

Table 4. Interleukin-6 (IL-6) and TNF- α production from macrophage of the active subfractions from IO-CP-D on DEAE-Sephacose CL-6B column chromatography (sample 100 μ g/mL)

Subfraction	Productions of macrophage activator cytokine	
	IL-6 content (pg/mL)	TNF- α content (pg/mL)
Saline control	18.85 \pm 0.38 ^{a1}	48.58 \pm 1.08 ^a
LPS	903.87 \pm 64.81 ^b	743.08 \pm 117.83 ^b
IO-CP-D ²⁾	20.85 \pm 0.77 ^a	47.20 \pm 0.20 ^a
IO-CP-II	1,368.70 \pm 31.75 ^d	1,466.31 \pm 80.64 ^d
IO-CP-III	1,100.00 \pm 89.66 ^c	1,056.77 \pm 68.28 ^c
IO-CP-IV	59.61 \pm 4.07 ^a	52.00 \pm 1.86 ^a

¹⁾Results are expressed as mean \pm SD of quadruplicate samples, and different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) in each column.

²⁾IO-CP-D was prepared by EtOH precipitation from IO-HW-D.

DEAE 분획과 함께 활성성분이 분산되어 활성이 감소함으로써 다양한 성분들이 복합적으로 작용하고 있는 것으로 추정된다. 따라서 장관면역 활성 소재로서의 차가버섯 활용성

은 DEAE로 분획하기보다는 조다당획분 자체를 이용하는 것이 훨씬 유용한 것으로 판단되었다. 따라서 측정하는 면역활성의 종류에 따라서 고분자 물질이 활성에 관여하더라도 조다당획분 및 DEAE column 분획이 활성에 영향을 미치지므로 추출조건과 함께 면역활성 획분의 분획과정 최적화가 반드시 필요하다고 생각된다.

한편, decoction 추출과정을 거쳐 고분자 물질이 주로 함유되어 있는 조다당획분으로 분획한 IO-CP-D를 DEAE-Sephacose CL-6B column chromatography에서 분리한 마이토젠 및 마크로파지 활성이 높은 IO-CP-II의 구조적인 특성을 파악하기 위하여 주요 구성분을 분석한 결과, IO-CP-II는 주성분으로서 중성당(61.86%)을 함유하고 있으며 소량의 산성당(2.96%)과 단백질(1.85%)이 함유된 다당류 소재임을 알 수 있었다(Table 5). 또한, IO-CP-II를 TFA로 가수분해 시킨 후 각 구성당을 alditol acetate 유도체로 조제하고 GC로 분석한 결과, IO-CP-II는 중성당인 Glc, Gal와 Man (molar ratio; 1.00:0.55:0.31)이 주요 구성당으로 분포하고 있음을 확인하여 중성당 함량이 높은 다당류가 면역활성에 관여하고 있음을 알 수 있었다(Table 5).

지금까지의 결과를 토대로 차가버섯의 산업적인 추출조건은 생리활성 소재개발에 있어서 대단히 중요한 의미를 가지고 있음을 알 수 있었으며, 특히 물 추출물로부터 분획된 조다당획분의 경우에는 다양한 생리활성을 나타내고 있어 기능성 소재로서의 개발가능성이 매우 높음을 확인할 수 있었다. 향후 면역활성이 높은 조다당획분으로부터 분리한 활성 다당획분은 완전정제를 통하여 활성에 작용하는 active site와 구조적인 특성을 규명함으로써 고부가가치 소재로의 이용가능성을 검토하고자 한다.

Table 5. Chemical components and component sugar analysis of the active subfractions from IO-CP-D on DEAE Sephacose CL-6B column chromatography

Subfraction	Chemical components (%)		
	Neutral sugar	Uronic acid	Protein
IO-CP-D	24.85 \pm 0.77 ^{d1)}	11.42 \pm 1.42 ^d	3.43 \pm 0.13 ^f
IO-CP-II	61.86 \pm 1.66 ^e	2.96 \pm 0.15 ^a	1.85 \pm 0.03 ^{cd}
IO-CP-III	41.94 \pm 0.68 ^f	11.12 \pm 0.27 ^d	1.01 \pm 0.02 ^b
IO-CP-IV	26.05 \pm 0.49 ^{de}	11.00 \pm 0.63 ^d	0.15 \pm 0.14 ^e
	Component sugar (mole %)		
	Rhamnose		2.37
	Fucose		3.92
	Arabinose		3.28
IO-CP-II ²⁾	Xylose		8.35
	Mannose		13.49
	Galactose		24.43
	Glucose		44.16

¹⁾Results are expressed as mean \pm SD of quadruplicate samples, and different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) in each component.

²⁾IO-CP-D-II: the immunostimulating polysaccharide fraction eluted by 0.1 M NaCl from IO-CP-D on DEAE-Sephacose CL-6B.

요 약

추출조건에 따른 생리활성 영향을 검토하기 위하여 차가버섯(*Inonotus obliquus*)을 물(50°C reflux, 90°C 이상 decoction, 12°C 가압추출)과 에탄올(50, 70과 90°C reflux)로 추출한 후 물 추출물을 조다당획분(IO-CP)으로 분획하였을 때 IO-CP(4.8~16.8%)의 수율은 에탄올추출물(IO-E, 1.9~2.7%)보다 높았으며 추출온도 증가에 따라 그 차이는 더 컸다. 가압추출로 조제된 조다당획분(IO-CP-121)은 가장 높은 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량(35.10 mg TAE/g와 18.48 mg QE/g)과 DPPH와 ABTS를 이용한 자유 라디칼 소거능(26.08과 27.99 mg AEAC/100 mg)을 나타내었다. IO-CP-D(decoction)와 IO-CP-50(reflux)은 IO-CP-121보다 유의적으로 높은 마이토젠(saline 대조군의 2.10과 1.95배, 100 µg/mL)과 장관면역 활성(6.30과 5.74배)을 보였으나 에탄올추출물 활성은 확인되지 않았다. 또한, 모든 IO-CP는 0.1 mg/mL 농도에서 RAW 264.7 세포주에 대하여 독성을 나타내지 않았으나, IO-CP-121이 LPS-자극 RAW 264.7 세포주에 대하여 가장 유의적으로 염증성 인자인 TNF-α와 nitric oxide(NO) 생성을 억제하였다(29.2와 63.5%). 에탄올추출물도 0.1 mg/mL 농도에서 독성을 보이지 않았으나 TNF-α와 NO의 생성 억제능은 IO-CP-121보다 현저히 낮음을 알 수 있었다. 한편, 활성 다당획분을 분리하기 위하여 면역활성 획분인 IO-CP-D를 DEAE-Sephrose CL-6B column에서 비흡착 획분(IO-CP-I)과 7개의 흡착 획분(IO-CP-II~VIII)으로 분획한 결과, IO-CP-II가 가장 우수한 마이토젠과 마크로파지 활성(4.51과 1.64배)을 나타내었다. 이와 같이 분리된 면역활성 획분인 IO-CP-II는 주로 중성당(61.86%)과 함께 소량의 산성당(2.96%)을 포함하고 있는 다당류임이 밝혀졌으며, 주요 구성당으로서 Glc, Gal와 Man(molar ratio of 1.00:0.55:0.31)를 포함하고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 추출조건은 차가버섯 생리활성에 중요하게 작용하고 있으며, decoction 추출방법으로 제조하여 분획한 면역활성 획분으로부터 차가버섯 면역활성은 적어도 중성 다당류가 관여하고 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 2011년도 중소기업청 산학연공동기술개발사업(창엽11-14)의 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

- Chang ST. 1999. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: non-green revolution. *Int J Med Mushrooms* 1: 1-8.
- Wasser SP. 2002. Medicinal mushrooms as a source of anti-tumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 258-274.
- Sanchez C. 2004. Mini-review: modern aspects of mushroom culture technology. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 756-762.
- Ribeiro B, Lopes R, Andrade PB, Seabra RM, Gonçalves RF, Baptista P, Quelhas I, Valentão P. 2008. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food Chem* 110: 47-56.
- Wang Y, Bao L, Yang X, Li L, Li S, Gao H, Yao XS, Wen H, Liu HW. 2012. Bioactive sesquiterpenoids from the solid culture of the edible mushroom *Flammulina velutipes* growing on cooked rice. *Food Chem* 132: 1346-1353.
- Bao X, Liu C, Fang J, Li X. 2001. Structural and immunological studies of a major spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Carbohydr Res* 332: 67-74.
- Daba AS, Ezeronye OU. 2003. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *Afr J Biotechnol* 2: 672-678.
- Tong H, Xia F, Feng K, Sun G, Gao X, Sun L, Jiang R, Tian D, Sun X. 2009. Structural characterization and *in vitro* antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technol* 100: 1682-1686.
- Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P. 2009. In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Innovative Food Sci Emerging Technol* 64: 756-762.
- Moro C, Palacios I, Lozano M, D'Arrigo M, Guillamón E, Villares A, Martínez JA, García-Lafuente A. 2012. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem* 130: 350-355.
- Huang NL. 2002. A mysterious medicinal fungus in Russia *Inonotus obliquus*. *Chinese J Edible Mushroom* 21: 7-8.
- Ju HK, Chung HW, Hong SS, Park JH, Lee J, Kwon SW. 2010. Effect of steam treatment on soluble phenolic content and antioxidant activity of the Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*). *Food Chem* 119: 619-625.
- Park YK, Lee HB, Jeon EJ, Jung HS, Kang MH. 2004. Chaga mushroom extract inhibits oxidative DNA damage in human lymphocytes as assessed by comet assay. *Biofactors* 21: 109-112.
- Kim YO, Han SB, Lee HW, Ahn HJ, Yoon YD, Jung JK, Kim HM, Shin CS. 2005. Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Life Sci* 77: 2438-2456.
- 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.
- Jones TM, Albersheim P. 1972. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol* 49: 926-936.
- Zhao JF, Kiyohara H, Yamada H, Takemoto N, Kawamura H. 1991. Heterogeneity and characterization of mitogenic and anti-complementary pectic polysaccharides from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch et D.C. *Carbohydr Res* 219: 149-172.
- Velioglu YS, Mazza G, Cao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant

- activity and total phenolics in selected fruit, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* 46: 4113-4117.
21. Jia Z, Tang M, Wu J. 1999. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
 22. Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem* 81: 249-255.
 23. Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 99: 381-387.
 24. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1996. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19: 1518-1520.
 25. Conrad RE. 1981. Induction and collection of peritoneal exudates macrophages. In *Manual of Macrophage Methodology*. Herscovitz BH, Holden HT, Ballanti JA, Ghaffar A, eds. Marcel Dekker Incorporation, New York, NY, USA. p 5-11.
 26. Suzuki I, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M, Yadomae T. 1990. Effect of orally administered β -glucan on macrophage function in mice. *Int J Immunopharmacol* 12: 675-684.
 27. Yu KW, Kiyohara H, Matsumoto T, Yang HC, Yamada H. 1998. Intestinal immune system modulating polysaccharides from rhizomes of *Atractylodes lancea*. *Planta Med* 64: 714-719.
 28. Park E, Kum S, Wang C, Park SY, Kim BS, Schuller-Levis G. 2005. Anti-inflammatory activity of herbal medicines: inhibition of nitric oxide production and tumor necrosis factor- α secretion in an activated macrophage-like cell line. *Am J Chin Med* 33: 415-424.
 29. Adom KK, Liu RH. 2002. Antioxidant activity of grains. *J Agric Food Chem* 50: 6182-6187.
 30. Sung HS, Kim NM, Kim WJ. 1986. Some physical properties of Korean red ginseng extract as affected by extracting conditions. *Korean J Food Sci Technol* 18: 241-244.
 31. 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 Biotech* 126: 35-48.

(2012년 6월 19일 접수; 2012년 7월 4일 채택)