

치마버섯 균사체 배양물로부터 분리한 다당류의 항산화 및 면역 활성

이 준 우

경북전문대학교 호텔조리제빵과

Antioxidant and Immunological Activities of Polysaccharide Extracted from Cultured Mycelia of *Schizophyllum commune*

June-Woo Lee

Department of Hotel Culinary Art and Bakery, Kyungbuk College

ABSTRACT To examine the biological activity of polysaccharide extracted from cultured mycelia of *Schizophyllum commune*, we determined anti-complementary activity and nitric oxide production as a measure of immunological activity, anti-lipidperoxidation and hydroxy radical scavenging activity as a measure of antioxidative activity, tyrosinase inhibitory activity, anti-microbial activity, and transdermal flux of polysaccharide extracted from cultured mycelia of *S. commune*. Polysaccharide extracted from *S. commune* activated the complementary system and produced nitric oxide in RAW 264.7 macrophages. Antioxidant activities as malondialdehyde values were 49.5 ± 0.7 , 39.7 ± 1.7 , 39.2 ± 1.2 , and 2.6 ± 0.5 nM/mL for control, extracellular polysaccharide extracted from *S. commune* (SC-EP), ultrafiltrated polysaccharide extracted from *S. commune* (SC-UP), and butylated hydroxytoluene, respectively. Hydroxy radical scavenging activity (IC_{50}) of SC-UP and mannitol were 3.32 and 1.66 mg/mL, respectively. Tyrosinase inhibitory activities of SC-UP, arbutin, and kojic acid were 19.9%, 31.8%, and 99.0%, respectively. Anti-microbial activities of SC-UP appeared to be low, and transdermal fluxes of SC-UP were 0.47%, 0.73%, and 1.20% after 3, 6, and 9 hr, respectively. These findings suggest that polysaccharide extracted from *S. commune* has potential immunological and antioxidant activities.

Key words: immunological activity, antioxidative activity, polysaccharide, *Schizophyllum commune*

서 론

담자균류 유래 다당류의 생리활성 작용은 주로 β -(1,3)-glucan 성분 에 의해 일어나는 것으로 알려졌다. 이것의 생리활성은 생체의 대식세포(1), natural killer cell(2)이나 cytotoxic T cell의 활성화(3), 면역관련 세포들의 자극에 의한 interleukin-1, colony-stimulating factor(4)와 같은 cytokine 등을 통한 숙주매개성 면역능에 의해 나타나며, 이것은 다당류의 구조적인 특징과 밀접한 관계를 갖는 것으로 알려졌다. 또한 체내에서의 초기 면역 활성을 담당하고 있는 대식세포의 활성화가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려졌다(5). 담자균류 유래 β -(1,3)-glucan의 면역 활성에 대한 연구는 구름버섯(*Coriolus versicolor*), 표고버섯(*Lentinus edodes*), 영지버섯(*Ganoderma lucidum*), 목질 진흙버섯(*Phellinus linteus*), 잎새버섯(*Grifola frondosa*), 신령버섯(*Agaricus blazei*), 동충하초(*Cordyceps militaris*) 및 팽이버섯(*Flammulina velutipes*) 등의 버섯으로 연

구가 되어 왔다(3,6-11). 이들 중 구름버섯 배양액으로부터 krestin(12), 표고버섯 자실체로부터 lentinan(5), 치마버섯 배양액으로부터 schizophyllan(13)과 상황버섯 균사체로부터 mesima(14)가 제품화되어 항암 및 면역보조제로 상업적 이용이 되고 있는 실정이다. 치마버섯(*Schizophyllum commune* Fr.) 유래 다당류는 β -(1,6)이 분지된 β -(1,3)-glucan 구조를 가지며, glucose 3개에 1개씩 분지된 구조를 갖는 점액성 물질로 알려졌다(13). 담자균류의 종류에 따라서는 단백질이 결합된 다당류이고 β -1,3, β -1,4 및 β -1,6의 결합이 혼재된 구조를 갖는 것으로 보고하였다(7,11-13). 항암면역 활성을 지닌 다당류는 대부분 β -1,3 glucan 구조를 가지고 일부는 β -1,6의 측쇄를 가지고 있으며, 이러한 측쇄의 분지 수 차이에 의해 생리활성이 상이하게 나타나는 것으로 알려졌다(15,16).

치마버섯은 치마버섯과(Schizophyllaceae) 치마버섯속(*Schizophyllum* Fr.)으로 갖은 부채형이고 표면은 미세한 털로 덮여있다. 봄부터 가을에 걸쳐 활엽수 및 침엽수의 고목, 나무토막, 용재, 그루터기 등에 속생하는 백색 목재 부후균이다(17). 치마버섯은 식용으로의 이용은 어려우나 균사체를 액체배양 하여 얻은 다당류는 산업용 소재로의 이용성이 검토되고 있는 실정이다(16,18).

Received 14 May 2014; Accepted 11 June 2014

Corresponding author: June-Woo Lee, Department of Hotel Culinary Art and Bakery, Kyungbuk College, Yeongju, Gyeongbuk 750-712, Korea

E-mail: jwlee@kbc.ac.kr, Phone: +82-54-630-5185

본 연구에서는 치마버섯으로부터 순수 분리된 균사체를 대량배양 하여 얻은 다당류의 면역 활성을 위해서는 항보체 활성과 nitric oxide 생성능, 항산화능을 위해서는 지질과산화 억제능과 hydroxy radical 저해능을 조사하였고, 기타로는 미백효과, 항균효과 및 피부투과도를 측정하였다. 이와 같은 기능성 확인을 통하여 식품, 화장품 및 산업용 소재로 활용하기 위한 기초자료로 이용하고자 한다.

재료 및 방법

배지 및 시약

보체 실험을 위한 혈청은 삼육축산(Eumseong, Korea)에서 구입한 guinea pig로부터 분리하여 사용하였다. 적혈구로 면역적혈구는 한국 메디아(Seongnam, Korea), 토끼는 삼육축산의 적혈구를 사용하였으며, 항체는 antisheep hemolysin(Difco Co., San Jose, CA, USA)을 사용하였다. 완충액 조제를 위해 barbital은 Merck 사(Darmstadt, Hessen, Germany), gelatin과 MgCl₂는 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)의 것을 사용하였다. RPMI 1640, DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지 및 fetal new born calf serum은 GIBCO 사(Grand Island, NY, USA), streptomycin 및 penicillin, LPS(*E. coli* O127:B8), IFN- γ , NaNO₂ 등은 Sigma 사, mTNF- α 는 Genzyme 사(Cambridge, MA, USA), 96-well tissue plate와 100 mm petri-dish는 Falcon Inc.(Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였고, 기타 시약들은 특급 또는 1급 이상의 시약을 이용하였다.

세포주 배양

Mouse의 복강대식세포나 RAW 264.7 대식세포는 부착성 세포로서 단층 배양을 하였고, 배양을 위한 배지로서는 streptomycin(100 μ g/mL)과 penicillin(100 U/mL)이 함유된 DMEM에 1 M HEPES buffer 용액 10 mL, sodium bicarbonate 3.7 g 및 불활성화 시킨 fetal bovine serum 10%(v/v)를 사용하였으며, 세포는 petri-dish를 이용하여 2~3일마다 계대 배양하여 사용하였다. 배양은 모든 경우에 있어서 CO₂ 배양기를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 상태에서 행하였다.

배양 및 다당류 제조

본 연구에 사용된 치마버섯은 자연산 자실체로부터 무균적으로 분리한 균사를 potato dextrose agar(PDA, Difco Co.)에서 27.5°C, 10일 동안 배양한 후 순수 분리된 균사체를 이용하였다. 사면배지에 보관 중인 균사체를 백금구로 분리하여 100 mL의 액체배지가 들어 있는 500 mL용 삼각 플라스크에 넣고 27.5°C에서 10일 동안 배양하였다. 그 후 100 mL의 액체 배양용 기본배지가 함유된 500 mL 배양용 baffled 삼각 플라스크에 10 mL를 접종하여 27.5°C에서

120 rpm으로 6일간 진탕 배양하여 종균 배양액으로 이용하였다. 본 배양은 종균 배양한 배양액을 5 L 발효조(Kobio-tech Co., Incheon, Korea)에 5%(v/v) 되게 접종하고, working volume 3 L, 교반속도 150 rpm, 통기량 0.5 vvm으로 하여 27.5°C에서 6일간 배양한 균사체를 조다당류 제조에 이용하였다. 에탄올 분획(SC-EP)은 치마버섯 균사체 배양액에 3배의 물을 가해 100°C에서 2시간 동안 추출하고, 7,000 \times g에서 20분간 원심분리 하여 얻어진 상등액에 2배량의 에탄올을 첨가한 후 24시간 동안 방치하여 침전시킨 것을 투석하여 동결 건조하였다. 균사체내성 분획(SC-IP)은 치마버섯 균사체 배양액을 원심분리 하여 얻어진 침전물에 10% NaOH 용액을 5배량 첨가한 다음 24시간 동안 추출하고 빙초산으로 중화(pH 7.0)하여 에탄올을 3배량 첨가하여 침전물을 투석하고 동결 건조하였다. 한외여과막을 이용한 다당류(SC-UP) 제조는 균사체 배양액에 3배의 물을 가해 100°C에서 2시간 동안 추출하고, 7,000 \times g에서 20분간 원심분리 하여 얻어진 상등액은 한외여과(membrane, MW 10 kD)를 실시하여 동결 건조하였다. 균사체외성 다당류(SC-NEP)는 배양액을 7,000 \times g에서 20분간 원심분리하고, 상등액을 1/5로 농축하여 동결 건조하였다(16). 치마버섯 배양액으로부터 분리한 다당류는 당과 단백질이 결합된 단백다당류라고 보고되었으며(16), 일반적으로 버섯 자실체의 경우는 다당류가 0.5~2%고, 균사체 유래 다당류는 0.1% 내외인 것으로 알려졌다(8). 치마버섯도 균사체 배양물의 분획별 다당류 수율로 에탄올 분획(SC-EP)은 0.32%, 균사체내성 분획(SC-IP)은 0.19%, 한외여과 분획(SC-UP)은 0.26%, 균사체외성 다당류(SC-NEP)는 1.63%인 것으로 보고하였으나(16), 산업화를 위한 대량생산의 용이성과 경제성을 고려하여 본 연구에서 사용된 다당류는 한외여과 분획(SC-UP)을 중심으로 하였다.

보체 활성의 측정

보체 활성은 Yamada 등(19)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시험관에 150 μ L의 GVB²⁺ buffer(0.15 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 1.8 mM sodium barbital, 3.1 mM babinuric acid, 141 mM NaCl 및 0.1% gelatin, pH 7.4)와 시료 50 μ L(250 μ g/mL)를 가한 다음, 50 μ L의 guinea pig complement(100 U/mL)를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 GVB²⁺ buffer를 가해 보체의 최종 농도가 1 unit/mL 되게 조정하였다. 조정된 보체혼합물을 1.0 unit, 1.2 unit 및 1.6 unit 되게 각 시험관에 분주한 후 여기에 antisheep hemolysin(2 MHU/mL)과 동량의 sheep red blood cell (5 \times 10⁸ cells)을 혼합하여 실온에서 30분간 감작시킨 SRBC 2 mL씩을 가하고 GVB²⁺ buffer로 최종 용량을 5 mL로 조정하여 37°C의 수욕조에서 60분간 반응시켰다. 0.5 M EDTA를 가하고 혼합하여 반응을 중단시킨 다음 400 \times g에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 얻은 다음 541 nm에서 흡광도를 측정하였다. 보체의 활성은 대조군의 total com-

plement hemolytic activity에 대한 저해율(ITCH₅₀, %)로 표시하였다.

Nitric oxide의 측정

대식세포로부터 생성되는 NO를 측정하기 위해서 96 well에 대식세포를 분주하고 2시간 동안 전 배양하여 비부착 세포를 제거하였다. 치마버섯 유래 다당류 및 대조물질은 각 well에 10 µg/mL 농도로 가하여 37°C에서 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 NO를 측정하였다. 대식세포에 의해 생성되는 NO는 Ding 등(20)의 방법에 따라 정량하였다. 간략하면 100 µL의 배양액과 동량의 Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylene diamine dihydrochloride, 2.5% H₃PO₄)를 가하여 실온에서 10분 동안 반응시킨 후, 540 nm에서 ELISA reader(Bio-Tek Instrument, Winooski, VT, USA)를 이용하여 측정하였다. NO₂⁻의 농도는 sodium nitrite를 이용하여 얻어진 흡광도로 부터 표준 곡선을 작성하여 측정하였다.

간 homogenate의 분리

Microsome은 Kiso 등(21)의 방법에 따라 얻었다. 간략하면 pentobarbital로 마취된 흰쥐를 개복하여 50 mL용 주사기로 50 mM Tris-Cl buffer(pH 7.4) 30 mL를 portal vein에서 하대정맥으로 혈액이 흘러나오도록 관류를 행하였다. 이후 간을 적출하여 50 mM Tris-Cl과 150 mM KCl이 함유된 buffer(pH 7.4)로 세척하고 잘게 썰어, Homogenizer(Polytrone[®], PT 10/35, Luzern, Switzerland)를 이용하여 빙냉 하에서 균질화를 실시하였다. 균질화물은 8,000×g에서 20분간 원심분리 한 후 상등액을 얻었다. 상등액은 105,000×g에서 60분 동안 초원심분리를 실시한 후 침전 부분을 완충액으로 현탁시켜 단백질의 농도가 20 mg/mL 되게 조정하였다. 분리된 microsome은 -70°C에 보존하면서 실험목적에 따라 사용하였다.

In vitro에서의 지질 과산화 유발 및 측정

Microsome을 이용한 *in vitro* 지질 과산화 반응의 유도는 Kiso 등(21)의 방법에 따라 비효소적 지질 과산화 유도를 위해서는 ascorbic acid(AsA)와 Fe²⁺, 효소적 지질 과산화는 ADP, NADPH와 Fe³⁺를 이용하여 지질 과산화를 유도하였다. 지질 과산화 정도는 Ohkawa 등(22)의 방법에 준하여 표준물질로 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)을 이용하여 표준곡선을 작성하고 시료의 지질 과산화물(malondialdehyde, MDA) 양을 측정하였다. 또한 지질 과산화 억제 정도는 다음의 계산식으로 표시하였다.

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

OH radical 제거 효과

치마버섯 유래 다당류의 OH radical의 제거 효과는

Aruoma(23)의 방법에 따라 2-deoxy-ribose method로서 hydroxy radical(OH·)에 의한 2-deoxy-ribose의 fragmentation 유발 방법을 사용하였다. 간략하면 potassium phosphate buffer(20 mM, pH 7.4), 2-deoxy-ribose(2.8 mM), 시료, hydrogen peroxide(2.8 mM), EDTA(0.1 mM)에 착화합물 시킨 ferrus chloride(0.02 mM) 그리고 ascorbic acid(0.1 mM)를 첨가하여 반응을 개시하였다. 이것은 항온 수조에서 37°C로 1시간 동안 반응시켰으며, 반응 종료 후 5.6% TCA 0.5 mL와 2% TBA(0.05 M NaOH에 녹인 것) 0.5 mL를 첨가하여 100°C에서 20분간 발색시켰다. 여기에 BuOH:pyridine(15:1, v/v) 3 mL를 가해 혼합하고 원심분리 한 후, 그중 상등액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 50% 억제농도(IC₅₀)는 저해율이 50%가 되도록 하는 물질의 농도로 정의되며, 이 IC₅₀ 값을 OH radical 저해 효과의 지표로 사용하였다.

미백 효과

치마버섯 유래 다당류의 미백 효과는 Ishihara 등(24)의 방법을 이용하였다. 적정량의 검체 15 µL를 96 well plate에 넣고, 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5) 150 µL, 1.5 mM L-tyrosine 용액 25 µL, 2,100 U/mL에 해당하는 버섯 tyrosinase(0.05 M phosphate buffer, pH 6.5) 7 µL를 넣고 30°C에서 10분간 반응시킨 후, 생성되는 dopachrome의 양을 microplate reader를 사용하여 흡광도 490 nm에서 측정하였다. Tyrosinase에 대한 저해율(%)은 다음 식에 의하여 계산하였으며, IC₅₀ 값은 효소 활성 저해율 50%에 달하는 저해물질의 농도로 결정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{(D-C) - (B-A)}{D-C} \times 100$$

A: 저해제를 넣은 것의 반응 전 흡광도

B: 저해제를 넣은 것의 반응 후 흡광도

C: 저해제를 넣지 않은 것의 반응 전 흡광도

D: 저해제를 넣지 않은 것의 반응 후 흡광도

항균 효과

항균 효과 측정을 위해 배지는 Mueller-Hinton agar 배지로 멸균하여 55°C의 수욕조에 넣고, 시료와 비교 시약은 각 10 mg씩 취하여 멸균 증류수 1 mL에 녹였다. 시료는 최고 농도를 기준으로 2배씩 희석하였다. 모든 시료는 멸균된 증류수를 이용하였다. 희석된 시료가 들어있는 각 시험관에서 수욕조 상에서 55°C 정도로 유지되고 있던 Mueller-Hinton agar를 13.5 mL씩 분주하여 배양접시에 부은 후 잘 섞어 주었다. 이렇게 하여 최종 시료농도가 20~0.078 mg/mL가 되도록 시료당 10개 농도의 평판 배지를 제조하고, 무균작업대 내에서 뚜껑을 열고 건조시켜 수분을 제거하였다. 여드름 균액은 16~18시간 배양한 균액 12 µL를 Fleisch Extract Broth(FEB) 1 mL로 혼합하여 제조하였다. 조제된 시험관은 접종 tray에 200 µL씩 넣고 반자동 접종기를 이용하여

항균 물질이 들어 있는 평판 위에 균을 접종하였다. 접종이 끝난 평판을 37°C에서 약 18~24시간 배양 후 육안으로 관찰하여 생육이 억제된 항생제 농도를 MIC로 정하였다.

피부투과도의 측정

치마버섯 유래 다당류의 피부 흡수율을 측정하기 위하여 실험에 사용한 피부로 guinea pig는 삼육축산으로부터 구입하여 사용하였다. 피부는 guinea pig의 머리 부분과 다리 부분 사이인 등 및 배 부분 피부를 적출하여 알루미늄 호일로 감싸 -4°C에서 냉동보관 하였다. 피부 내의 조직과 동일한 조건을 제공하기 위해 적출한 피부를 0.9% NaCl(w/v) 수용액에 30분간 등장시킨 후 실험에 사용하였다. 투과도의 측정은 다음과 같이 실시하였다. 전 처리된 guinea pig 피부를 실험장치 위에 올려놓아 고정시킨 다음, 정제수에 녹인 시료 1 mL를 피부 위에 적하하여 일정시간 경과 후에 진피층으로 이동한 용액의 일부를 취하여 총 당을 측정하였다.

통계처리

본 실험에서의 통계처리는 Student *t*-test를 이용하였고, 결과는 평균±표준편차로 표시하였으며 *P*-value를 구하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

보체 활성화 효과

*S. commune*의 균사체 배양물로부터 추출한 다당류가 보체계 활성화에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Table 1과 같다. 치마버섯 배양균사체의 유래 다당류의 항보체 활성화는 열수 추출 알코올침전분획(SC-EP)이 8.9±0.3%, 균사체내성다당류(SC-IP)는 14.7±1.7%, 열수 추출 한외여과분획(SC-UP)은 10.2±0.8%, 균사체외성 무처리분획(SC-NEP)은 5.2±0.7%로 나타났다. 양성 대조물질로 사용한 krestin은 16.2±1.7%로 조사되었다. 추출 및 제조 방법을 달리하여 얻어진 치마버섯 균사체 유래 다당류는 보체계를 활성화시키는 것으로 나타났다.

면역계에서 보체계는 탐식작용, 면역부착작용, 바이러스

중화작용 및 대식세포 유주 활성화에 관여하고 있는 것으로 알려졌다(25). 일반적으로 담자균류 유래 β-glucan성 다당류는 면역계의 일부인 보체계를 활성화시키고, 항체 비존재 하에서의 방어기구인 alternative pathway 활성화에도 관여하는 것으로 알려졌다. 또한 보체계는 대식세포의 활성화와도 밀접한 관계가 있으며, 대식세포에는 보체 활성화물질인 C3b의 수용체가 존재하고, 이들 중 C5a는 직접적으로 다양한 cytokine을 분비하여 면역 기능을 증진시키는 것으로 알려졌다(26,27). 이와 같이 담자균류 유래 다당류는 면역기능의 활성화에 보체계가 일정한 역할을 할 수 있을 것으로 판단된다.

Nitric oxide 생성능

*S. commune*의 배양균사체로부터 분리된 다당류가 RAW 264.7 세포주에서 nitric oxide 생성능에 미치는 효과를 측정한 결과는 Table 2와 같다. 치마버섯 균사체 배양물의 열수 추출 한외여과 처리한 다당류(SC-UP)는 12.8±0.7 μM의 NO를 생성하는 것으로 조사되었다. 양성 대조물질로 사용한 IFN-γ와 LPS에서는 각각 33.4±1.7 μM과 35.1±1.5 μM로 나타났다. 대식세포 활성화 물질인 IFN-γ와 LPS에 의해 활성화된 대식세포는 NO를 생성하고, 이때 분비된 NO는 항미생물, 항바이러스 및 항종양 작용을 하는 것으로 보고되었다(1). 이와 같이 항보체 활성능을 갖는 것으로 조사된 치마버섯 유래 고분자 다당류에 의해 생성되는 NO는 체내에서 다양한 면역학적 활성을 유도할 것이며, 1차적으로 대식세포 등을 자극하여 2차적으로 면역세포들을 활성화시키고 (1,28) 이들에 의해 분비된 면역 물질들은 다양한 생리기능을 수행할 것으로 여겨진다.

AsA-Fe²⁺로 유도된 지질 과산화에 대한 영향

치마버섯 배양균사체의 열수 추출 및 에탄올(SC-EP), UF 처리하여 얻어진 다당류(SC-UP)의 지질 과산화 억제 활성을 조사하기 위하여 *in vitro*에서 간 microsome에 시료를 가한 후, 비효소적인 방법으로 유도시켜 생성된 MDA의

Table 1. The anticomplementary activity of the polysaccharides extracted from the cultured mycelia of *Schizophyllum commune*

Samples	ITCH ₅₀ (%)
SC-EP	8.9±0.3
SC-IP	14.7±1.7
SC-UP	10.2±0.8
SC-NEP	5.2±0.7
Krestin	16.2±1.7

SC-EP: extracellular polysaccharide extracted from *S. commune*, SC-IP: intracellular polysaccharide extracted from *S. commune*, SC-UP: ultrafiltrated polysaccharide extracted from *S. commune*, SC-NEP: native extracellular polysaccharide of *S. commune*, Krestin: protein-bound polysaccharide extracted from *Coriolus versicolor*.

Table 2. Nitric oxide production of the polysaccharide extracted from the cultured mycelia of *Schizophyllum commune* in RAW 264.7 cells

Samples	Produced NO (μM)
Control (media)	0.7±0.1
SC-UP	12.8±0.7*
IFN-γ	33.4±1.7
LPS	35.1±1.5*

RAW 264.7 macrophages (4×10⁵ cells/well) were incubated for 24 hr in DMEM containing a each sample (10 μg/mL), IFN-γ (10 U/mL), and LPS (10 ng/mL). The cultural supernatants were collected and assayed for NO production.

Each values are represents the mean±SD of three independent experiments done triplicate.

*Significantly different from the control at *P*<0.01.

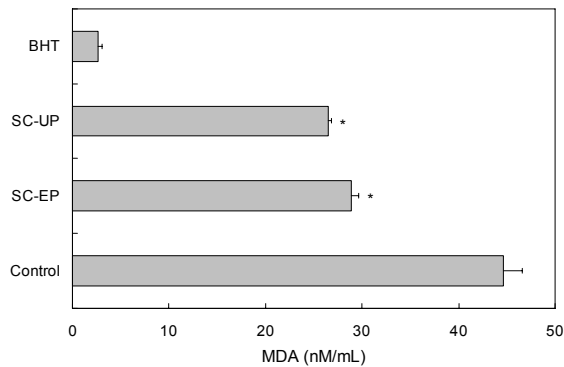


Fig. 1. Effect of the polysaccharide extracted from the cultured mycelia of *Schizophyllum commune* on ascorbate-Fe²⁺-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. The incubation mixture consisting of 1.0 mL was composed of a sample in DW, 83.5 mM KCl, 37.2 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.2 mM ascorbate, 10 μM FeSO₄·H₂O, microsomal suspension (protein, 2 mg). After incubation at 37°C for 20 min with ascorbate-Fe²⁺, the lipid peroxide was measured by the method of Ohkawa et al. (22). Results are expressed as the mean±SD of three experiments. *Significantly different from the control at *P*<0.01.

양을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 대조군은 mL당 44.6±2.0 nM의 MDA를 생성시켰으며, 치마버섯 균사체 배양물의 열수 에탄올 처리 분획(SC-EP) 및 UF 처리 분획(SC-UP)의 경우 각각 28.9±0.7 nM 및 26.5±0.3 nM의 MDA를 생성시켰다. 양성 대조군으로 사용한 BHT의 지질 과산화 억제율은 94.2%로 높게 나타났으나 UF 처리 분획(SC-UP)은 40.6%로 조사되어 어느 정도는 지질 과산화에 대한 억제능을 갖는 것으로 조사되었다.

담자균류 유래 일부 다당류는 강한 지질 과산화 억제능을 나타내며, 이들의 지질 과산화 억제 효과는 생체 내에서의 세포막의 지질 성분 및 간 보호 활성에 영양을 미치는 것으로 보고되었다(29). 이와 같이 치마버섯 배양 균사체로부터 추출한 다당류의 항산화 활성은 생체 내의 세포보호에 유효하게 작용할 것으로 판단된다.

ADP-NADPH-Fe³⁺로 유도된 지질 과산화에 대한 영향

효소적 지질 과산화 유발에 대한 영향을 조사하기 위하여 치마버섯 배양 균사체의 열수 추출 에탄올 처리 및 UF 처리하여 얻은 다당류에 microsomes을 가한 후 생성된 MDA의 양을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 무첨가 대조군에서는 mL당 49.5±0.7 nM의 MDA가 생성되었으며, 배양 균사체 배양물의 열수 추출 에탄올 처리 분획(SC-EP) 및 UF 처리 분획(SC-UP)은 각각 19.8%와 20.8%의 지질 과산화 생성 억제율을 나타내었다. 배양 균사체 에탄올 처리 분획(SC-EP)과 UF 처리 다당류(SC-UP)의 경우는 유사한 지질 과산화 억제율을 나타내었다. 간 microsomes에 의한 지질 과산화는 NADPH cytochrome P-450과 NADPH(ADP-Fe³⁺)가 관여하는 효소적 반응과 ascorbate-Fe²⁺가 관여하는 비효소적 반응에 의해 야기된다(21). 상기의 결과들로부터 치

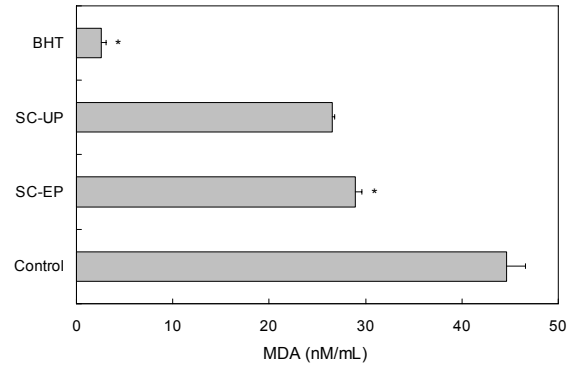


Fig. 2. Effect of the polysaccharide extracted from the cultured mycelia of *Schizophyllum commune* on ADP-NADPH-Fe³⁺-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. The incubation mixture consisting of 1.0 mL was composed of a sample in DW, 83.5 mM KCl, 37.2 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 1 mM ADP, 10 μM FeCl₃·7H₂O, 0.2 mM NADPH, microsomal suspension (protein, 2 mg). After incubation at 37°C for 20 min with ADP-NADPH-Fe³⁺, the lipid peroxide was measured by the method of Ohkawa et al. (22). Results are expressed as the mean±SD of three experiments. *Significantly different from the control at *P*<0.01.

마버섯 배양 균사체 유래 다당류는 효소 작용에 의해 발생된 지질 과산화를 억제하였을 뿐만 아니라 비효소적인 지질 과산화에 대한 억제능을 가지는 것으로 조사되었으므로, 치마버섯 배양균사체 유래 다당류는 세포막 또는 간세포의 보호에도 일정한 역할을 할 수 있을 것으로 여겨진다.

OH radical 제거 효과

치마버섯 균사체 배양물을 추출하여 분리한 다당류의 OH radical 제거 효과는 Table 3과 같다. 배양 균사체 배양물의 열수 추출 UF 처리 분획(SC-UP)의 OH radical 제거 효과에 대한 IC₅₀은 3.32 mg/mL로 조사되었다. 또한 일반적으로 OH radical 제거 효과가 우수한 것으로 알려진 mannitol의 IC₅₀은 1.66 mg/mL로 나타났다. 이와 같이 치마버섯 유래 다당류는 생체 내에서 생성되어 노화를 촉진시키는 것으로 알려진 OH radical 제거에 어느 정도 효과적인 것으로

Table 3. Hydroxy radical scavenging activity of the polysaccharide extracted from the cultured mycelia of *Schizophyllum commune*

Samples	IC ₅₀ (mg/mL)
SC-UP	3.32
Mannitol	1.66

The incubation mixture consisting of 1.0 mL was composed of a sample in DW, potassium phosphate buffer (10 mM, pH 7.4), deoxyribose (2.8 mM), hydrogen peroxide (2.8 mM), EDTA (0.1 mM) chelated ferrous chloride (0.02 mM) and ascorbic acid (0.1 mM). After incubation at 37°C for 60 min, add the TCA (5.6%) 500 μL, TBA (2%, in 0.05 M NaOH) 500 μL and then heated for 20 min at 100°C. Each reaction mixture was add the BuOH: pyridine (15:1, v/v) solution 3 mL, vortexing, centrifuge at 3,000 rpm for 10 min, and the supernatant was measured by spectrophotometrically at 532 nm.

Table 4. Tyrosinase inhibitory activity of the polysaccharide extracted from the cultured mycelia of *Schizophyllum commune*

Samples	Tyrosinase inhibitory ratio (%)
SC-UP	19.9
Arbutin	31.8
Kojic acid	99.0

Sample concentration: 1.0 mg/mL.

나타났다.

생체 내에서 free radical에 의한 세포 손상은 지질 과산화에 의한 막 구조의 파괴와 이들의 중간 산물에 의해 독성 작용뿐만 아니라, 생체 내에서 생성된 OH radical은 반응성이 아주 강하여 DNA를 손상시키고 탐식세포에 의해 생성되는 superoxide radical과 이들에 의해 생성된 hydrogen peroxide 등과 같이 염증반응에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려졌다(30). 즉 OH radical의 제거 효과는 free radical에 의한 세포 조직의 상해에 따라 형성되는 반응물들에 의한 염증반응을 억제하는 데 기여할 것으로 여겨진다.

미백효과

치마버섯 균사체의 배양물을 추출하여 분리한 다당류의 미백효과를 알아보기 위하여 melanin 합성의 초기 단계에 관여하는 tyrosinase의 활성 저해를 측정된 결과를 Table 4에 나타내었다. 배양 균사체 배양물의 열수 추출 UF 처리 분획(SC-UP)의 tyrosinase 저해 효과는 1.0 mg/mL의 농도 처리 시에 19.9%로 나타났다. 미백 화장품의 첨가 원료로 많이 사용하고 있는 arbutin(31)과 kojic acid(32)는 동일 농도에서 각각 31.8%와 99.0%의 높은 저해 효과를 보였다. 미생물 유래 물질들로부터 미백 소재 개발을 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 담자균류에서는 장수진흙버섯과 차가버섯 추출물 등에 대한 미백효과를 측정된 보고가 있었으며(33,34), 유산균인 *Lactobacillus casei*와 *Lactobacillus rhamnosus*도 melanin의 생성을 억제하는 것으로 보고하였다(35). 이들의 작용기작은 melanin 색소 합성의 1단계인 tyrosinase의 활성 억제와 2단계에 관여하는 L-DOPA의 산화과정도 억제하는 것으로 보고하였다. 아직까지는 합성 미백제의 효과를 뛰어넘지는 못하지만 독성이 거의 없고 화장품 소재로서 요구되는 항산화능과 미백능 및 보습성을 갖는 담자균류 유래 다당류의 활용 가능성을 보여주는 결과로 생각된다.

항균효과

치마버섯 유래 다당류의 여드름균에 대한 항균효과는 *P. acnes* ATCC11827, *P. acnes* ATCC11828 및 *P. acnes* ATCC6919 등의 균주를 이용하여 실험을 수행하였다 (Table 5). 천연물에서 얻어지는 다당류의 항균효과는 일반적으로 MIC 치가 약 100 mg/mL인 것으로 알려지고 있다 (36). 치마버섯 배양 균사체 배양물의 열수 추출 UF 처리 분획(SC-UP)의 MIC 치는 10 mg/mL, 균사체외성 다당류

Table 5. Antimicrobial activity of the polysaccharide extracted from the cultured mycelia of *Schizophyllum commune*

Samples	MIC (mg/mL)		
	<i>P. acnes</i> ATCC11827	<i>P. acnes</i> ATCC11828	<i>P. acnes</i> ATCC6919
SC-UP	10.0	10.0	10.0
SC-NEP	>20.0	>20.0	>20.0
CFX (µg/mL)	0.2	0.790	0.790
DMSO (%)	100.0	100.0	100.0

DMSO: final 10%, CFX: Cefotaxime (Claforan).
MIC: minimum inhibitory concentration.

Table 6. Transdermal flux of the polysaccharide extracted from the cultured mycelia of *Schizophyllum commune*

Time course	Transdermal flux (µg/cm ³ ·hr)
After 3 hr	47.2 (0.47%)
After 6 hr	72.5 (0.73%)
After 9 hr	120.5 (1.20%)

(SC-NEP)의 경우는 20 mg/mL 이상인 것으로 조사되었다. 일부의 연구자들에 의하면 치마버섯에서 분리한 다당류 (schizophyllan)를 페리오데이트 산화 처리에 의한 유도체인 scleraldehyde의 항균 활성을 디스크법으로 측정된 결과, 최소 억제 농도(MIC)와 최소 살균 농도(MBC)는 3.0~8.0 mg/mL인 것으로 보고하여 생물학적 보존제로서 이용될 수 있는 가능성을 제시하였다(37). 치마버섯 액체배양 여액을 알코올 침전하고 투석하여 얻은 다당류는 세균 및 염증과 관계되는 세균과 곰팡이의 성장을 억제하는 것으로 보고하였으며, 상처 치유에도 효과적인 것으로 보고하였다 (38). 이러한 결과들로부터 치마버섯 유래 다당류는 피부 보호를 위한 화장품 및 상처 치유를 위한 소재로의 활용이 가능할 것으로 여겨진다.

피부투과도 측정

치마버섯 유래 다당류를 임상에 적용하기 위해서는 피부 투과도가 매우 중요한 요소이다. 치마버섯 균사체 배양물을 열수 추출하여 한외여과장치를 이용하여 얻은 다당류(SC-UP)에 guinea pig의 피부투과도는 3시간, 6시간 및 9시간 경과 후, 각각 0.47%, 0.73% 및 1.20%의 투과도를 나타내었다(Table 6). 물질의 피부 투과 흡수는 물질의 분자량, pH, 전하 및 외부 상태 등에 영향을 받는 것으로 알려졌다. 일반적으로 분자량 500 Da 이하는 잘 통과하고, 패취제는 1~3%, gel 제제는 5% 정도의 투과도를 갖는 것으로 알려졌다(39). 치마버섯 유래 다당류를 직접 임상에 적용시키기 위해서는 피부투과도 상승에 대한 제제학적 연구가 수반되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

치마버섯 균사체 배양물로부터 분리된 다당류의 생리활성

을 알아보기 위해 항보체 활성, NO 생성능, 지질 과산화 억제능, OH radical 제거 효과, 미백효과, 항균효과 및 피부투과도를 측정하였다. 치마버섯 배양균사체 유래 다당류의 항보체 활성은 열수 추출 알코올침전분획(SC-EP)이 $8.9 \pm 0.3\%$, 세포내성 다당류(SC-IP)는 $14.7 \pm 1.7\%$, 열수 추출 한외여과분획(SC-UP)은 $10.2 \pm 0.8\%$, 균사체외성 무처리 분획(SC-NEP)은 $5.2 \pm 0.7\%$ 로 나타났다. 치마버섯 균사체 배양물의 열수 추출 한외여과 처리한 다당류(SC-UP)는 $12.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$ 의 NO를 생성하는 것으로 조사되었다. 양성 대조물질로 사용한 IFN- γ 와 LPS에서는 각각 $33.4 \pm 1.7 \mu\text{M}$ 과 $35.1 \pm 1.5 \mu\text{M}$ 로 나타났다. AsA-Fe²⁺로 유도된 지질 과산화에 대한 영향은 열수 추출 에탄올 처리 분획(SC-EP) 및 UF 처리 분획(SC-UP)의 경우 각각 $28.9 \pm 0.7 \text{ nM}$ 및 $26.5 \pm 0.3 \text{ nM}$ 의 MDA를 생성시켰다. ADP-NADPH-Fe³⁺로 유도된 지질 과산화에 대한 영향은 배양 균사체 배양물의 열수 추출 에탄올 처리 분획(SC-EP) 및 UF 처리 분획(SC-UP)이 각각 19.8%와 20.8%의 지질 과산화 생성 억제율을 나타내었다. OH radical의 제거 효과로 균사체 배양물의 열수 추출 UF 처리 분획(SC-UP)의 OH radical 제거 효과에 대한 IC₅₀은 3.32 mg/mL로 조사되었다. 균사체 배양물의 열수 추출 UF 처리 분획(SC-UP)의 tyrosinase 저해 효과는 1.0 mg/mL의 농도 처리 시에 19.9%로 나타났다. 또한 여드름 균에 대한 항균효과를 위한 MIC 치는 균사체 배양물의 열수 추출 UF 처리 분획(SC-UP)이 10 mg/mL, 균사체외성 다당류(SC-NEP)의 경우는 20 mg/mL 이상인 것으로 조사되었다. 균사체 배양물의 열수 추출 UF 처리 분획(SC-UP)의 피부투과도는 3시간, 6시간 및 9시간 경과 후 각각 0.47%, 0.73% 및 1.20%를 나타내었다. 상기의 결과들로부터 치마버섯 균사체 배양물로부터 분리된 다당류의 면역 활성, 항산화 활성 등의 생물학적 특성을 이용하여 기능성 소재의 개발이 가능할 것으로 판단된다.

REFERENCES

- Hibbs Jr JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. 1998. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 87-94.
- Di Renzo L, Yefenof E, Klein E. 1991. The function of human NK cells is enhanced by beta-glucan, a ligand of CR3 (CD11b/CD18). *Eur J Immunol* 21: 1755-1758.
- Chihara G, Hamuro J, Maeda YY, Shiio T, Suga T, Takasuka N, Sasaki T. 1987. Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator: an overview. *Cancer Detect Prev Suppl* 1: 423-443.
- Denis M. 1991. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: Killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J Leucocyte Biol* 49: 380-387.
- Chihara G, Hamuro H, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka K. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res* 30: 2776-2781.
- Wang HX, NG TB, Liu WK, Ooi VE, Chang ST. 1996. Polysaccharide-peptide complexes from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 601-607.
- Miyazaki T, Nishijima M. 1981. Studies on fungal polysaccharides (XXVII), structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull* 29: 3611-3616.
- Lee JW, Bang KW, Seo BI, Lee ES. 2003. Pharmacological activities of the polysaccharide obtained from the fruit body and mycelia of *Ganoderma lucidum* IY005. *Kor J Herbology* 18: 149-156.
- Lee JW, Baek SJ, Bang KW, Kang SW, Kang SM, Kim BY, Ha IS. 2000. Biological activities of polysaccharide extracted from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. *Korean J Food Sci Technol* 32: 726-735.
- Ikegawa T, Nakanishi M, Uehara N, Chihara G, Fukuoka F. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann* 59: 155-157.
- Ohno N, Suzuki I, Oikawa S, Sato K, Miyazaki T, Yadomae T. 1984. Antitumor activity and structure characterization of glucans, extracted from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull* 32: 1142-1151.
- Tsukagoshi S, Ophashi F. 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Japan J Cancer Res* 65: 557-560.
- Komatsu N, Okubo S, Kikumoto S, Kimura K, Saito G. 1969. Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann* 60: 137-145.
- Li G, Kim DH, Kim TD, Park BJ, Park HD, Park JI, Na MK, Kim HC, Hong ND, Lim K, Hwang BD, Yoon WH. 2004. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. *Cancer Lett* 216: 175-181.
- Franz G. 1989. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. *Planta Med* 55: 493-497.
- Lee JW, Kim YS. 2009. Characteristics of polysaccharide extracted from the cultured mycelia of *Schizophyllum commune*. *Kor J Mycol* 37: 91-95.
- Park WH, Lee HD. 1996. *Wild fungi of Korea in color*. Kyohak Publishing Co, Seoul, Korea. p 52.
- Song MH, Bae JT, Kho HJ, Jang YM, Lee JD, Lee GS, Pyo HB. 2011. Anti-oxidant effect and anti-inflammatory of fermented *Citrus unshiu* peel extract by using *Schizophyllum commune*. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 37: 351-356.
- Yamada H, Kiyohara H, Cyong JC, Kojima Y, Kumazawa Y, Otsuka Y. 1984. Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. Part 1. Fractionation and biological properties of polysaccharides. *Planta Med* 50: 163-167.
- Ding AJ, Nathan CF, Stuehr DJ. 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* 144: 2407-2413.
- Kiso Y, Tohkin M, Hikino H, Hattory M, Sakamoto T, Namba T. 1884. Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin, I: Effect on free radical generation and lipid peroxidation. *Planta Med* 50: 298-303.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal*

- Biochem* 95: 351-358.
23. Aruoma OI. 1994. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. In *Methods in Enzymology*. Packer L, ed. Academic Press, Inc., San Diego, CA, USA. Vol 233, p 57-66.
 24. Ishihara Y, Oka M, Tsunakawa M, Yomita K, Hatori M, Yamamoto H, Kamei H, Miyaki T, Konishi M, Oki T. 1991. Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *J Antibiotics* 44: 25-32.
 25. Shimura A, Ito H, Hibasami H. 1983. Screening of host-mediated antitumor polysaccharides by crossed immunoelectrophoresis using fresh human serum. *Jpn J Pharmacol* 33: 403-408.
 26. Okuda T, Yoshioka Y, Ikekawa T, Chihara G, Nishioka K. 1972. Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature New Biol* 238: 59-60.
 27. Buchner RB, Hugli TE, Ember JA, Morgan EL. 1995. Expression of functional receptors for human C5a anaphylatoxin (CD88) on the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. Stimulation of acute-phase protein-specific mRNA and protein synthesis by human C5a anaphylatoxin. *J Immunol* 155: 308-315.
 28. Bendtzen K. 1988. Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol Lett* 19: 183-192.
 29. Lee JW, Kim KN, Jeong H, Lee SY, Kang SM. 1996. Effect of G009 on lipid peroxidation induced by peroxidizer in rats. *J Appl Pharmacol* 4: 244-250.
 30. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1991. *Free radicals in biology and medicine in measurement of lipid peroxidation*. Oxford University Press, Oxford, UK. p 224-234.
 31. Takebayashi J, Ishii R, Chen J, Matsumoto T, Ishimi Y, Tai A. 2010. Reassessment of antioxidant activity of arbutin: multifaceted evaluation using five antioxidant assay systems. *Free Radic Res* 44: 473-478.
 32. Choi H, Kim K, Han J, Choi H, Jin SH, Lee EK, Shin DW, Lee TR, Lee AY, Noh M. 2012. Kojic acid-induced IL-6 production in human keratinocytes plays a role in its anti-melanogenic activity in skin. *J Dermatol Sci* 66: 207-215.
 33. Lee JS, Shin DB, Lee SM, Kim SH, Lee TS, Jung DC. 2013. Melanogenesis inhibitory and antioxidant activities of *Phellinus baumii* methanol extracts. *Korean J Mycol* 41: 104-111.
 34. Kuk MH, Kim DH, Lee C, Jung ES, Choi EJ, Lee JS, Lee TS. 2013. Antioxidant and skin whitening effects of *Inonotus obliquus* methanol extract. *J Mushroom Sci Prod* 11: 99-106.
 35. Choi WS, Kwon HS, Lim HW, No RH, Lee HY. 2013. Whitening effects of *Lactobacillus rhamnosus* associated with its antioxidative activities. *Korean J Microbiol Biotechnol* 41: 183-189.
 36. Ramasamy P, Vino AB, Saravanan R, Subhapradha N, Shanmugam V, Shanmugam A. 2011. Screening of antimicrobial potential of polysaccharide from cuttlebone and methanolic extract from body tissue of *Sepia prashadi* Winkworth, 1936. *Asian Pacific J Tropical Biomedicine* 1: S244-S248.
 37. Jayakumar GC, Kanth SV, Chandrasekaran B, Raghava Rao J, Nair BU. 2010. Preparation and antimicrobial activity of scleraldehyde from *Schizophyllum commune*. *Carbohydr Res* 345: 2213-2219.
 38. Kim MK, Hong EK. 2006. Effects of polysaccharide from *Schizophyllum commune* on burn and wound healing. *Korean Chem Eng Res* 44: 87-91.
 39. Oh HS, Lee YS, Kim HH, Lee KP. 2001. Formulation and skin permeation characteristics of ketoprofen patches. *Yakhak Hoeji* 45: 506-512.