

상지에 배양한 상황버섯 균사체로부터 분리된 다당류의 면역증강 효과

박혜미 · 홍주헌

대구가톨릭대학교 식품공학전공

Immune-Enhancing Effects of Polysaccharides Isolated from *Phellinus linteus* Mycelium on *Mori ramulus*

Hye-Mi Park and Joo-Heon Hong

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu

ABSTRACT The objective of this study was to examine the immune-enhancing effects of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* mycelium on *Mori ramulus*. Crude polysaccharides were isolated by pressurized extraction (121°C, 1.2 kgf/cm², 3 h), ethanol precipitation, and lyophilization. In addition, crude polysaccharides were further fractionated into unabsorbed fractions (PF-1, fraction No. 3~15) and absorbed fractions (PF-2, fraction No. 24~33) by DEAE-sepharose CL-6B column chromatography in order to isolate immune-regulating polysaccharides. The major constituents in PF-1 and PF-2 were total sugar (75.51% and 52.38%), total protein (1.63% and 8.41%), uronic acid (17.53% and 15.04%), and β -glucan (28.33% and 25.04%), respectively. PF-1 increased production of nitric oxide (NO) and cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in a dose-dependent manner. The mRNA expression levels of inducible NO synthetase, cyclooxygenase-2, TNF- α , and IL-6 markedly increased as determined by polymerase chain reaction analysis. The above data led us to conclude that macrophage activation of purified polysaccharides was higher than that of crude polysaccharides. The polysaccharides isolated from *P. linteus* mycelium on *M. ramulus* investigated herein are useful as natural immune-enhancing agents.

Key words: *Phellinus linteus* mycelium, polysaccharide, immune enhancing, nitric oxide, cytokine production

서 론

상황버섯(*Phellinus linteus*)은 분류학적으로 소나무 비늘버섯과(Hymenochaetaceae) 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색부후균으로 이와 유사한 종류로는 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*), 말뚝진흙버섯(*Phellinus isniarius*), 찰진흙버섯(*Phellinus robustus*), 검은진흙버섯(*Phellinus nigricans*), 낙엽송충버섯(*Phellinus pini*) 등이 있다(1). 상황버섯의 자실체 열수 추출물은 소화기계통의 암에 저지 효과가 있다고 알려지면서 많은 연구가 진행되어 항암 활성(2) 및 대장암과 방광암 등의 원인 효소인 장내세균 유해 효소 저해 효과(3) 등 상황버섯의 다양한 생리활성이 보고되고 있다. 상지(桑枝, *Mori ramulus*)는 뽕나무과(Moraceae)에 속하는 낙엽교목인 뽕나무(*Morus alba* L.)의 어린 가지로 늦은 봄과 초여름에 절취하여 채진한 것으로 눈상지, 상조 등의 이명이 있다(4). 일반적으로 상황버섯의 재배는 뽕나무 원목을 절단하여 살균시킨 후 절단면 위에 상황버섯 종균을

접종하여 약 1~3개월 동안 균사배양 공정을 거친 뒤, 종균을 제거하여 토양에 심어 약 15~20일 동안 자실체를 형성시켜 인공 재배한다. 버섯류의 균사체에는 자실체보다 각종 영양소가 4배 정도 더 함유되어 있으며, 특히 균사체는 항암 성분, 면역기능 강화성분 등의 약용성분이 자실체보다 50~60배 정도 더 들어있다는 연구도 보고되고 있다(5).

기능성식품 및 의약품 소재로 주목받고 있는 상황버섯 균사체는 기호성이 높을 뿐 아니라 버섯 균사체 혼합 배양 추출물의 항균, 항산화 및 항암 활성(6), 상황버섯 균사체 배양 쌀(5), 상황버섯 균사체 배양액에 침지한 발아현미(7) 및 상황버섯 균사체 배양 수삼(8) 등 균사체를 이용한 상황버섯의 기능 연구가 진행되고 있다. 이와 같은 효능을 나타내는 β -glucan, heteroglycan 및 galactan 등의 비소화성 수용성 다당류는 버섯에 건물량으로 약 10% 이상을 차지하고 있어 우수한 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다(9). 상황버섯에서 추출된 다당류들은 주로 대식세포나 보체 시스템 등의 면역 체계를 활성화해 항종양 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있는데(10), 특히 β -glucan은 암세포를 직접 공격하기 보다는 대식세포, 자연살해세포, T세포 등의 정상적인 면역 세포의 면역기능을 활성화해 암세포의 증식과 재발을 억제하고 면역세포의 증가를 촉진한다고 알려져 있다(11,12).

Received 27 September 2016; Accepted 11 November 2016

Corresponding author: Joo-Heon Hong, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Gyeongbuk 38430, Korea
E-mail: jhhong@cu.ac.kr, Phone: +82-53-850-3218

면역이란 인체가 미생물에 의한 침입 과정에서 자신을 지키기 위한 일종의 보호막으로 조직, 세포, 분자들이 감염원에 대하여 기관을 보호하는 것이다(13). 세포 내 다양한 염증 조절인자에는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6) 등과 같은 proinflammatory cytokines, prostaglandin, lysosomal enzyme 및 free radicals 등 다양한 매개물질이 관여한다(14-16). 특히 대식세포에서 cytokines, TNF- α , lipopolysaccharide(LPS)와 같은 자극 때문에 염증 반응의 전사 인자를 활성화해 inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2)를 발현시켜 nitric oxide(NO)와 prostaglandin E2(PGE2)를 생성한다(17-19). 이러한 면역기능을 천연물로 증진하려는 연구에 대한 관심이 부각되고 있으며, 특히 천연물질에서 유래된 면역 증강제는 면역 반응을 강화하거나 저하된 면역능을 원상으로 회복시킬 수 있을 것으로 기대하고 있다(20).

따라서 본 연구에서는 뽕나무의 어린 가지인 상지에 배양한 상황버섯 균사체 유래 다당류를 추출하였고, 분리 및 정제를 통해 얻은 분획물의 면역증강 효과를 확인하기 위해 nitric oxide 및 이와 관련된 cytokine인 TNF- α , IL-6 생성량과 유전자 발현 정도를 분석하여 면역증진 기능성식품 소재로서의 활용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 상황버섯 균사체(*Phellinus linteus* mycelium)는 국내에서 생산한 것을 (주)류충현약용버섯(Andong, Korea)에서 제공받아 이용하였다. 즉 균사체의 배양은 상지를 음지에서 자연 건조하여 수분이 30~40%일 때 절단 및 분쇄한 뒤, 121°C, 1.2기압에서 1시간 고압 살균한 다음 고체배지로 사용하였다. 상지 고체배지에 액체 종균 5%를 접종하고 25°C에서 15일간 정치 배양하여 상황버섯 균사체를 얻었으며, 균사체는 50°C에서 24시간 열풍 건조하였고, 분쇄기(FM-909W, Hanil, Co., Sejong, Korea)로 분쇄하여 60 mesh 표준망체(Chung Gye Sang Gong Sa, Seoul, Korea)를 통과한 분말을 -20°C 이하의 암소에 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다.

조다당류의 추출

상지에 배양한 상황버섯 균사체 유래 조다당류의 추출은 열풍 건조된 30 g의 상황버섯 균사체 분말에 증류수를 고품분 대비 20배 첨가하여 121°C, 1.2기압에서 3시간 동안 추출하였다. 각각의 추출물은 불순물을 제거하기 위하여 Whatman No. 1(Whatman International Ltd., Leicester-shire, UK)을 이용하여 여과시켰다. 여과된 용액은 감압농축기(N-1N, Eyela Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 감압농축한 뒤, 농축액 대비 5배량의 에탄올을 첨가하여 24시간

교반하고 원심분리(3,000×g, 20분) 하여 조다당류를 회수하였고, 동결건조기(Free Zone 2.5, Labconco Co., Kansas, MO, USA)로 건조하여 -70°C 이하의 암소에 보관하면서 분리 및 정제용 시료로 사용하였다.

다당류의 분리 및 정제

다당류의 분리 및 정제는 Jung 등(21)의 방법으로 조다당류를 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 용해(50 mg/mL) 및 원심분리(3,000×g, 20분, VS-6000CFN, Vision Scientific Co., Ltd., Bucheon, Korea) 하여 불용성 물질을 제거한 다음 DEAE-sepharose CL-6B(Amersham Biosciences Co., Piscataway, NJ, USA)를 충전제로 이용하여 column(2.5×30 cm)에 충전시키고, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)로 평형화한 후 0~1 M NaCl로 농도구배를 주어 유속 1 mL/min으로 10 mL씩 분취하여 340 nm에서의 흡광도, 총단백질, 총당 및 uronic acid를 측정 후 용출 양상에 따라 획분을 수집하고 증류수로 투석 및 농축한 다음 동결 건조하여 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 수율은 동결 건조(FreeZone 2.5, Labconco Co.)한 후 건물 중량을 구하였고 시료 조제에 사용한 원료 건물량에 대한 백분율로 나타내었다.

유용성분 분석

총당 함량은 phenol-sulfuric acid 방법(22)으로 분광광도계(Ultraspex-2100pro, Amersham Co., Uppsala, Sweden)를 사용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로는 glucose(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 계산하였다. 총단백질 함량은 Lowry 등(23)의 방법으로 분광광도계(Ultraspex-2100pro, Amersham Co.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로는 bovine serum albumin(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 계산하였다. Uronic acid 함량은 Cesar-etti 등(24)의 방법으로 microplate reader(UVM-340, ASYS Co., Eugendorf, Austria)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, galacturonic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 계산하였다. β -Glucan 함량은 Choi 등(25)의 방법으로 beta-glucan assay kit(Megazyme International Ireland Limited, Bray, Ireland)으로 측정하였으며, total glucan과 glucan 이외의 당 함량을 구한 다음 α -glucan과 glucan 이외의 당 함량 간의 차이로부터 함량을 계산하였다.

세포배양

실험에 사용한 대식세포주인 RAW 264.7(KCTC No. 40071) 세포는 한국세포주은행(KTCC, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양은 DMEM 배지(Welgene, Daegu, Korea)를 이용하여 각각 10% fetal bovine serum

(Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA), 2% penicillin streptomycin(Gibco BRL Co.)을 첨가하여 배양하였다. 세포는 모두 37°C, 5%로 조절된 CO₂ incubator(MCO-18AIC, SANYO Co., Sakata, Japan)에서 배양하였다.

세포독성

세포독성은 MTT assay(26)로 측정하였으며, RAW 264.7 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 96-well plate에 처리하여 배양기에서 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 제조한 다당류 시료 및 lipopolysaccharide(LPS 100 ng/mL, Sigma-Aldrich Co.)를 처리하고 22시간 배양하였다. 배양 후 PBS 완충용액에 녹인 methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide(MTT 5 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.) 용액을 각 well에 10 μ L씩 첨가하고 다시 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 이후 상등액을 완전히 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO, Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan) 100 μ L를 각 well에 첨가하여 10분간 반응시켜 formazan 결정을 완전히 용해한 다음 microplate reader(UVM-340, ASYS Co.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide 생성량 측정

Nitric oxide 생성량은 Han 등(27)의 방법으로 RAW 264.7 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 96-well plate에 처리하여 배양기에서 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 제조한 다당류 시료 및 LPS(100 ng/mL, Sigma-Aldrich Co.)를 처리하고 22시간 배양하였다. 배양이 완료된 후 상등액 50 μ L에 동량의 Griess 시약(Sigma-Aldrich Co.)을 혼합하여 10분간 반응시킨 후 microplate reader(UVM-340, ASYS Co.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, nitric oxide 생성량은 sodium nitrite(Sigma-Aldrich Co.)의 농도별 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

Cytokine 생성량 측정

Cytokine 생성량은 Cho 등(28)의 방법으로 RAW 264.7 세포를 5×10^5 cells/well이 되도록 24-well plate에 처리

하여 배양기에서 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 제조한 다당류 시료 및 LPS(100 ng/mL, Sigma-Aldrich Co.)를 처리하고 22시간 배양하였다. 배양이 완료된 후 상등액을 이용하여 TNF- α 및 IL-6 생성량을 ELISA kit(Pepro Tech Inc., Rocky Hill, NJ, USA)으로 측정하였다. TNF- α 및 IL-6 생성량은 kit에 포함된 TNF- α 및 IL-6의 농도별 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

RT-PCR

RT-PCR은 Lee와 Hong(29)의 방법으로 RAW 264.7 세포를 1.5×10^6 cells/well이 되도록 6-well plate에 처리하여 배양기에서 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 제조한 다당류 시료 및 LPS(100 ng/mL, Sigma-Aldrich Co.)를 처리하고 6시간 배양하였다. 배양된 세포를 모아 원심분리(1,000 \times g, 3분, Gyro 1236 MG, Gyrozen, Daejeon, Korea) 하여 상등액을 제거하고, PBS로 cell을 세척한 후 pellet을 얻어 Rneasy mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 얻은 RNA(1 μ g)를 Revertaid first strand cDNA synthesis kit(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)으로 cDNA를 합성하여 RT-PCR(Mastercycler® nexus, Eppendorf, Hamburg, Germany)을 수행하였다. 사용된 primers sequence는 Table 1과 같으며, PCR 조건은 94°C-30초(denaturation), 55°C-30초(annealing), 72°C-1분(extension)으로 28회 증폭 후 72°C(re-extension)로 PCR 산물을 획득하였고, Eco view(Dae Myung Science Co., Ltd., Seoul, Korea)를 포함한 1% agarose gel 상에서 전기영동(Mupid-ex, Advance, Tokyo, Japan) 한 다음, 밴드의 강도를 Image J(National Institutes of health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다.

통계처리

실험결과는 3회 반복실험의 평균±표준편차로 나타내었고 SPSS(version 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 시행하였으며, 각 측정 평균값의 유의성($P < 0.05$)은 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

Table 1. Sequence of the primers used for RT-PCR

Gene	Primer sequence	Size (bp)
iNOS	F: 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3' R: 5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'	496
COX-2	F: 5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3' R: 5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'	696
TNF- α	F: 5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3' R: 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	364
IL-6	F: 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3' R: 5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'	308
β -Actin	F: 5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCAG-3' R: 5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'	603

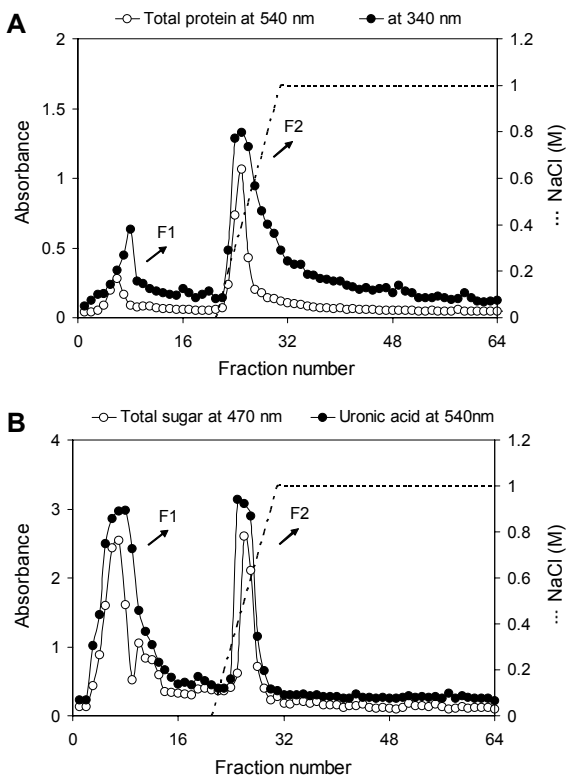


Fig. 1. DEAE-sepharose CL-6B column chromatogram of protein bound polysaccharide prepared from *Phellinus linteus* mycelium on *Mori ramulus*.

결과 및 고찰

DEAE-sepharose CL-6B column chromatography

상지에 배양한 상황버섯 균사체에서 추출 및 분리한 물질이 다당류임을 확인하기 위하여 DEAE-sepharose CL-6B column chromatography를 수행하였으며, 분리한 조다당류를 칼럼에 loading 한 결과는 Fig. 1과 같다. 흡착되지 않은 F1 분획(분획번호 3~15)과 흡착된 후 NaCl 용액에 의해 용출되는 F2 분획(분획번호 24~33)의 340 nm에서의 흡광도, 총단백질, 총당 및 uronic acid 함량을 분석한 결과 두 개의 elution pattern을 보여주었다. 상지에 배양한 상황버섯 균사체로부터 추출된 조다당류(P)의 수율은 1.87%였고 조다당류로부터 분리 정제된 분획물은 각각 17.88%(PF-1) 및 15.55%(PF-2)였다(Table 2).

Table 2. Yield, total sugar, total protein, uronic acid, and β -glucan contents of fractions from DEAE-sepharose CL-6B column chromatography

Sample ¹⁾	Yield (dry basis, %)	Total sugar (glucose, %)	Total protein (BSA ²⁾ , %)	Uronic acid (galacturonic acid, %)	β -Glucan (D-glucose, %)
P	1.87	39.17±1.29 ³⁾	9.63±0.28 ^a	12.25±0.75 ^c	12.60±0.27 ^c
PF-1	17.88	75.51±1.01 ^a	1.63±0.17 ^c	17.53±0.26 ^a	28.33±0.30 ^a
PF-2	15.55	52.38±0.84 ^b	8.41±0.39 ^b	15.04±0.60 ^b	25.04±0.32 ^b

¹⁾Fractions by DEAE-sepharose CL-6B column chromatography.

²⁾BSA: bovine serum albumin.

³⁾Mean±SD (n=3). Values with different letters (a-c) within each column are significantly different ($P<0.05$).

총당, 총단백질, uronic acid 및 β -glucan 함량

DEAE-sepharose CL-6B column chromatography를 통해 분리된 분획물을 투석 후 동결 건조하여 유용성분의 함량을 분석한 결과는 Table 2와 같다. P, PF-1 및 PF-2의 총당 함량은 각각 39.17%, 75.51% 및 52.38%로 DEAE-sepharose CL-6B에 흡착되지 않은 중성당 분획물인 PF-1에서 가장 많이 함유되어 있었다. 총단백질 함량은 P에서 9.63%로 가장 많이 함유되어 있었고, 두 개의 분획물 중 PF-2에서 8.41%로 PF-1(1.63%)에 비해 많이 함유되어 있었다. 이는 DEAE-sepharose CL-6B resin이 단백질을 대부분 흡착시키기 때문으로 판단된다. Uronic acid 함량은 대부분이 당으로 구성된 PF-1에서 17.53%로 가장 많이 함유되어 있었고, PF-2 및 P에서 각각 15.04% 및 12.25%로 PF-1보다 적게 함유되어 있었다. Uronic acid 함량이 높은 다당류는 면역 및 항보체 활성 등을 갖는 것으로 보고되어 (30), 대식세포에서 cytokine 생성 및 면역 관련 유전자 발현에 효과가 있을 것으로 판단된다. 항암 및 면역 활성 물질로 인정되고 있는 β -glucan 함량은 PF-1 및 PF-2에서 각각 28.33% 및 25.04%로 나타나 분획물에서 생리활성 효과가 기대되었다. β -Glucan은 버섯류의 세포벽을 구성하면서 단백질 혹은 기타 세포벽 성분과 결합한 형태로 존재하는데 (25), 면역 활성체의 기능, 항산화능, 생체조직 재생과 치유 기능, 대식세포를 자극하여 돌연변이 세포를 인식하고 공격하는 항종양 효과가 있다고 보고되었다(31-33). Joung 등 (34)은 상황버섯, 영지버섯 및 노루궁뎅이버섯 균사체에서 β -glucan 함량이 각각 29.14%, 19.44% 및 23.39%라고 보고하였으며, Choi 등(25)은 상황버섯 열수 추출물의 β -glucan 함량이 23.92%라고 보고하였다. 이에 본 연구의 상황버섯 균사체로부터 분리 정제된 분획물에는 고분자인 단백질과 다당이 대부분을 차지하고 있는 것으로 판단된다. Han 등(35)의 연구에서 영지버섯 추출물은 6.8%의 단백질과 결합한 다당으로 구성되어 있고 대식세포에서 농도 의존적으로 cytokine의 생성이 증가한다고 보고하였으며, Kim 등(36)은 상황버섯 추출물이 당과 단백질 함량이 각각 73% 및 16%로 구성된 결합물로 대식세포에서 cytokine의 생성이 증가한다고 보고하였다. 이처럼 다당류는 단백질과 결합한 다당류 형태일 때 대식세포를 자극하여 cytokine 생성을 증가시켜 면역 증강에 효과가 있을 것으로 판단된다.

Nitric oxide 생성량

대식세포주는 미생물적 병원체가 숙주세포를 공격할 때 가장 먼저 숙주세포에서 나타나는 방어기전이며 prostaglandin, nitric oxide, TNF- α , interleukin과 같은 cytokine 등의 초기 염증반응 매개인자를 생산하여 염증반응을 조절한다(37,38). 상황버섯 균사체 다당류 분획물의 대식세포주에 대한 nitric oxide 생성량은 Fig. 2와 같다. 대식세포주에 대한 세포생존율을 확인한 결과 모든 시료의 농도 0.1~100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 100% 이상의 생존율을 나타내어 양성 대조군으로 사용된 LPS 100 ng/mL 처리군(92.82%)보다 높은 생존율을 나타내었다(Fig. 2A). 이에 대식세포주에 대한 세포독성이 없는 것으로 판단되는 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 상황버섯 균사체 다당류 분획정제물의 대식세포주에 대한 *in vitro* 기능적 특성을 확인하였다(Fig. 2B). 무처리 대조군에 비하여 다당류 분획물 시료 농도가 증가함에 따라 nitric oxide 생성량이 증가하였으며, 모든 농도에서 PF-1이 가장 높은 함량을 나타내었다. 특히 PF-1 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 nitric oxide 생성량이 23.11 μM 로 나타나 양성대조군으로 사용된 LPS 100 ng/mL 처리군(30.30 μM)의 약 76%의 효과가 있는 것으로 확인되었다. 또한, Lee 등(39)의 보고에 따르면 상황버섯 균사체 추출물이 면역계에 주요한 세포인 비장세포의 활성화에 미치는 영향을 검토한 결과 T세

포 증식에 영향을 주는 면역 활성을 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 분리된 상황버섯 균사체 다당류 분획물은 단독으로도 대식세포의 nitric oxide 생산을 유도하여 면역 활성 물질로의 이용 가능성이 기대된다.

Cytokine 생성량

상황버섯 균사체 다당류 분획물의 대식세포주에 대한 cytokine 생성량은 Fig. 3과 같다. TNF- α 는 인체에 침입한 병원체에 대한 숙주의 방어에 관여하며, 또한 IL-1, IL-6, IFNs, transforming growth factors와 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor와 같은 cytokines의 분비를 유도함으로써 인체의 면역반응을 조절한다고 알려져 있다(40). TNF- α 생성량은 무처리군(8.64%)에 비하여 높은 TNF- α 를 생성하였으며, 3종의 다당류를 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 경우 농도 의존적으로 TNF- α 의 생성이 증가하였다. 특히 50 $\mu\text{g/mL}$ 이상 농도에서 분획물의 TNF- α 생성량이 99.62~100.76%로 양성대조군으로 사용된 LPS 100 ng/mL 와 유사한 수준으로 대식세포를 활성화해 TNF- α 생성이 증가함을 확인하였다. 반면 TNF- α 가 지나치게 다량 분비되면 염증 반응에 관여하는데, 이에 식품과 관련된 연구에서는 양성대조군인 LPS 증가 수준의 상승을 지표로 보고 있다(41). IL-6 생성량은 무처리군 및 P에서는 IL-6가 18.54~21.95%로 미미하게 생성되었으나, 분획물 처리군

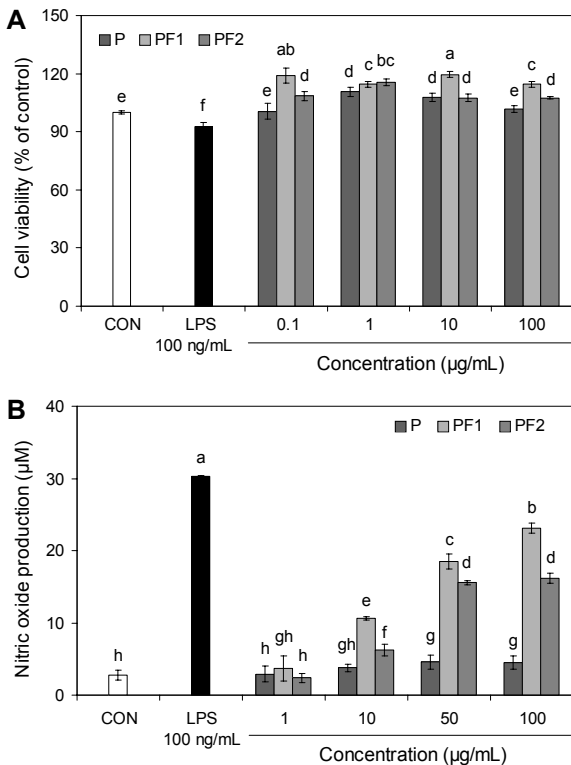


Fig. 2. Cell viability (A) and nitric oxide production (B) in RAW 264.7 cell of fractions from DEAE-sepharose CL-6B column chromatography. Mean \pm SD (n=3). Values with different letters above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

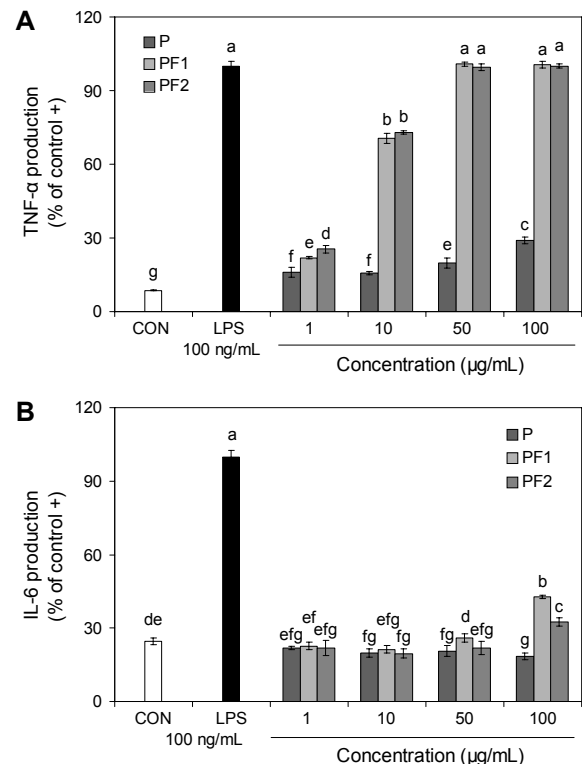


Fig. 3. Cytokine production in RAW 264.7 cell of fractions from DEAE-sepharose CL-6B column chromatography. Mean \pm SD (n=3). Values with different letters above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

에서는 농도 의존적으로 생성됨을 확인하였다. 특히 분획물 처리군의 경우 100 µg/mL 농도에서 PF-1 및 PF-2에서 각각 42.71% 및 34.49%의 IL-6가 생성되었다. 대식세포주에 대한 cytokine 생성은 인체에 침입한 병원체 및 종양세포들에 대한 제거 활성을 증진한다는 연구 결과(42)에 따라 상황버섯 균사체 다당류가 cytokine의 생성을 촉진하여 인체의 면역력을 증진할 것으로 판단된다.

면역관련 유전자 발현

상황버섯 균사체 다당류 분획물의 대식세포주에 대한 면역 관련 유전자 발현은 Fig. 4와 같다. 일반적으로 대식세포에서 TNF-α, IL-6 및 LPS와 같은 염증성 자극으로 iNOS 및 COX-2를 발현시켜 NO와 PGE2를 생성한다(17-19). 시

료를 대식세포주와 함께 배양한 후 total RNA를 추출하여 역전사 효소로 cDNA를 합성하고 primer를 이용하여 중합 효소연쇄반응(PCR)으로 mRNA 발현량을 증폭시켜 나타내었다. 그 결과 무처리군에서는 iNOS 및 TNF-α의 발현이 나타나지 않았고, P를 제외한 PF-1 및 PF-2에서 iNOS, COX-2, TNF-α 및 IL-6의 발현이 높게 나타났다. 특히 무처리군 대비 TNF-α의 발현 정도는 PF-1 및 PF-2에서 각각 1.72 및 1.63으로 LPS 100 ng/mL(1.63)보다 높은 발현을 나타내어 TNF-α 생성량과 유사한 결과를 나타내었다. 다당류 분획물은 단독으로 발현을 유도하였으며, nitric oxide 및 cytokine 생성량과 유사한 결과를 보여주었다. Uronic acid 함량이 높은 다당류는 면역 및 항보체 활성 등을 갖는 것으로 보고되고 있는데(30), Table 2에서 나타낸 것

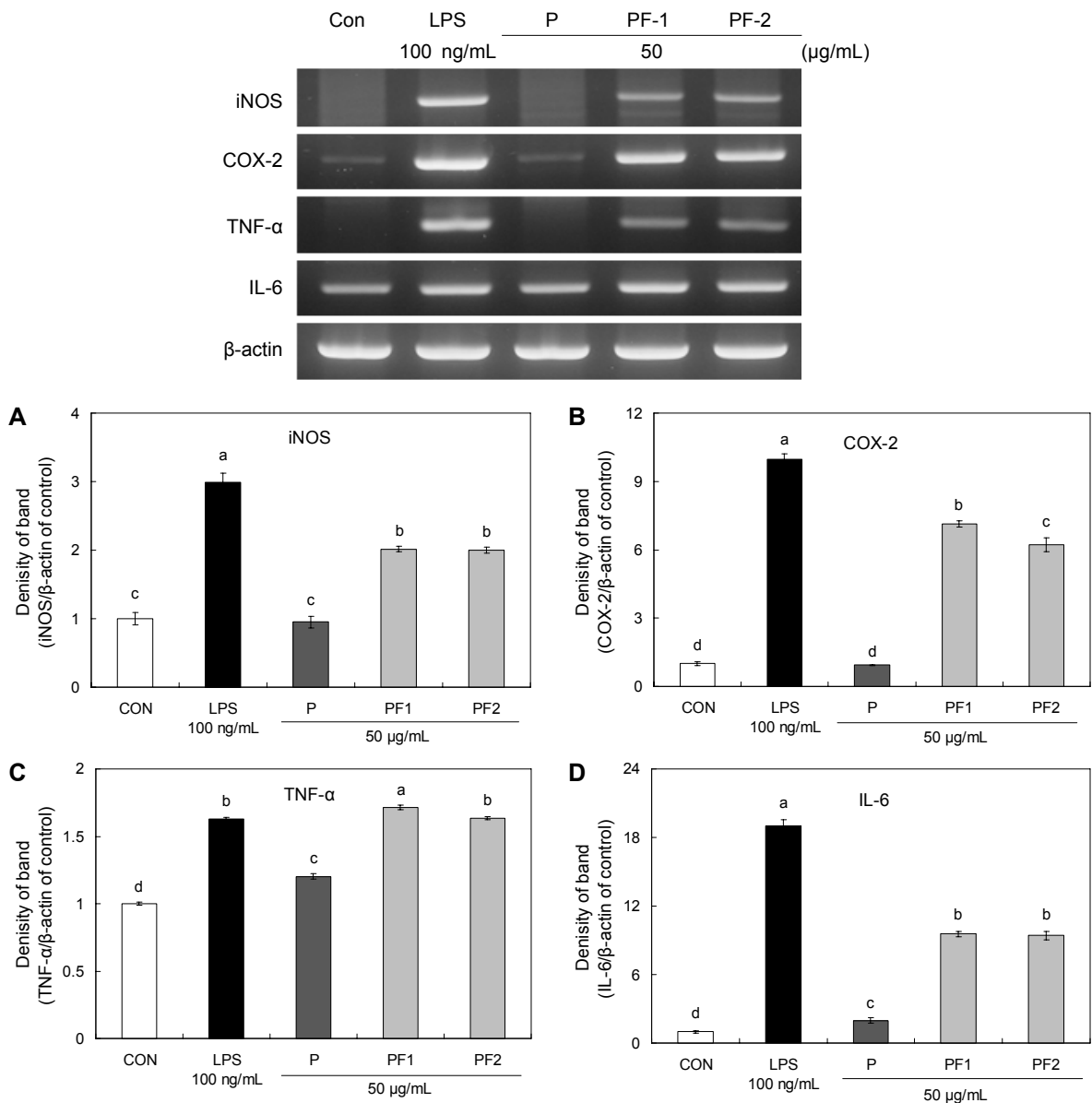


Fig. 4. RT-PCR analysis of mRNA expression in RAW 264.7 cell. Mean±SD (n=3). Values with different letters above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

처럼 본 연구에서도 uronic acid 및 항암 및 면역 활성 물질로 인정되고 있는 β -glucan의 함량이 상대적으로 높은 PF-1에서 면역 관련 유전자 발현이 높은 것을 확인하였다. 반면 P는 모든 면역 관련 유전자에서 무처리군 대비 0.95~1.96으로 낮은 발현량을 보여 조다당류 추출물보다 다당류 정제물에서 유전자 발현이 강하게 나타남을 확인하였다. 이를 통해 상황버섯 균사체 다당류 분획물의 면역 활성이 조다당류 추출물보다 유의적으로 높은 발현을 나타냄을 확인하였으며, 특히 대식세포를 스스로 활성화함으로써 외부 항원으로부터 자극받지 않아도 면역반응이 일어나는 초기에 생체 방어에 유리한 작용을 할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 상지에 배양한 상황버섯 균사체 유래 다당류의 기능성 식품 소재로의 활용 가능성을 확인하기 위해 조다당류의 분리 및 정제를 통해 분획을 얻었으며, 다양한 면역 증강 효과를 확인하였다. 건조된 조다당류를 DEAE-sepharose CL-6B를 이용하여 크로마토그래피한 후 340 nm에서의 흡광도, 단백질, 당 및 uronic acid 함량을 분석한 결과, 증류수로 용출되는 비흡착 분획(PF-1, 분획번호 3~15)과 흡착된 후 NaCl 용액에 의해 용출되는 분획(PF-2, 분획번호 24~33)을 얻었다. 분획물 PF-1 및 PF-2의 유용 성분 함량으로 총당 함량은 각각 75.51%, 52.38%, 총단백질 함량은 1.63%, 8.41%, uronic acid 함량은 17.53%, 15.04% 및 β -glucan 함량은 28.33%, 25.04%로 나타났다. PF-1 및 PF-2에 대해 대식세포주에 처리하여 세포생존율을 확인한 결과 100 μ g/mL 농도까지 유의적으로 세포사멸이 나타나지 않아 세포독성이 없음을 확인할 수 있었다. Nitric oxide 생성량은 PF-1 100 μ g/mL에서는 nitric oxide 생성량이 23.11 μ M로 나타나 양성대조군으로 사용된 LPS 100 ng/mL 처리군(30.30 μ M)의 약 76%의 효과가 있는 것으로 확인되었으며, cytokine 생성량(TNF- α 및 IL-6) 또한 무처리군에 비하여 높은 생성량을 나타내었다. Polymerase chain reaction을 통한 면역 관련 유전자 발현 분석 결과, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6에서 PF-1 분획에서 높은 발현량을 나타내어 면역 증강을 목적으로 한 기능성 식품 개발에 활용 가능하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2013년도 산학연협력 기술개발사업(No.CO135499)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

REFERENCES

- Ren G, Liu XY, Zhu HK, Yang SZ, Fu CX. 2006. Evaluation of cytotoxic activities of some medicinal polypore fungi from China. *Fitoterapia* 77: 408-410.
- Chung KS, Kim SS, Kim HS, Han MW, Kim BK. 1994. Antitumor activity of Kp, a protein-polysaccharide from the mycelial culture of *Phellinus linteus*. *Yakhak Hoeji* 38: 158-165.
- Kim DH, Choi HJ, Bae EA, Han MJ, Park SY. 1998. Effect of artificially cultured *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacterial enzymes and rat intestinal α -glucosidases. *J Fd Hyg Safety* 13: 20-23.
- Korea Food and Drug Administration. 2006. *National Standard of Traditional Medicinal (Herbal and Botanical) Materials*. Seoul, Korea. p 209.
- Kim H, You J, Jo Y, Lee Y, Park I, Park J, Jung MA, Kim YS, Kim S. 2013. Inhibitory effects of *Phellinus linteus* and rice with *Phellinus linteus* mycelium on obesity and diabetes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1029-1035.
- Kim MC, Kim JS, Heo MS. 2008. Antibacterial, antioxidant and antitumor activities of mushroom mycelium mixed culture extracts. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 158-163.
- Jung IS, Kim YJ, Choi IS, Choi EY, Shin SH, Gal SW, Choi YJ. 2007. Studies on antioxidant activity and inhibition of nitric oxide synthesis of germinated brown rice soaked in mycelial culture broth of *Phellinus linteus*. *J Life Sci* 17: 1141-1146.
- Kim H, Yoon HS, Jeong JH, Jeong HS, Hwang JH, Yu KW. 2010. Enhancement of immunostimulation by fractionation of active polysaccharide from fermented ginseng with *Phellinus linteus* mycelium in solid culture. *Korean J Food Sci Technol* 42: 223-232.
- Shon MY, Seo KI, Choi SY, Sung NJ, Lee SW, Park SK. 2006. Chemical compounds and biological activity of *Phellinus baumii*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 524-529.
- Tamura Y, Niinobe M, Arima T, Okuda H, Fujii S. 1973. Studies on aminopeptidases in rat liver and plasma. *Biochim Biophys Acta* 327: 437-445.
- Olson EJ, Standing JE, Griego-Harper N, Hoffman OA, Limper AH. 1996. Fungal β -glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages. *Infect Immun* 64: 3548-3554.
- Jørgensen JB, Robertsen B. 1995. Yeast β -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. *Dev Comp Immunol* 19: 43-57.
- Yu AR, Park HY, Choi IW, Park YK, Hong HD, Choi HD. 2012. Immune enhancing effect of medicinal herb extracts on a RAW264.7 macrophage cell line. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1521-1527.
- Seo SJ, Choi HG, Chung HJ, Hong CK. 2002. Time course of expression of mRNA of inducible nitric oxide synthase and generation of nitric oxide by ultraviolet B in keratinocyte cell lines. *Br J Dermatol* 147: 655-662.
- Weller R. 1997. Nitric oxide—a newly discovered chemical transmitter in human skin. *Br J Dermatol* 137: 665-672.
- Moncada S, Higgs A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012.
- Shew RL, Papka RE, McNeill DL, Yee JA. 1993. NADPH-diaphorase-positive nerves and the role of nitric oxide in CGRP relaxation of uterine contraction. *Peptides* 14: 637-641.
- Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. 2000. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med* 28: 217-226.
- Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. 2000. Suppression of inducible nitric oxide synthase

- expression in RAW264.7 macrophages by two beta-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol* 406: 301-309.
20. Kim HS, Kang JS. 2008. Preparation and characteristics of bread by medicinal herb composites with immunostimulating activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 109-116.
 21. Jung EB, Jo JH, Cho SM. 2008. Cytotoxic effect of isolated protein-bound polysaccharides from *Hypsizigus marmoreus* extracts by response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1647-1653.
 22. Saha AK, 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.
 23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
 24. Cesaretti M, Luppi E, Maccari F, Volpi N. 2003. A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydr Polym* 54: 59-61.
 25. Choi SJ, Lee YS, Kim JK, Kim JK, Lim SS. 2010. Physiological activities of extract from edible mushrooms. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1087-1096.
 26. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Humana Press, New York, NY, USA. Vol 731, p 237-245.
 27. Han J, Kim Y, Sung J, Um Y, Lee Y, Lee J. 2009. Suppressive effects of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* flower extracts on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1685-1690.
 28. Cho CW, Rhee YK, Lee YC, Kim YC, Shin KS, Nam SH, Hong HD. 2014. Immunomodulatory activity of crude polysaccharides from *Makgeolli*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 238-242.
 29. Lee DH, Hong JH. 2015. Immune-enhancing effects of polysaccharides isolated from Ascidian (*Halocynthia roretzi*) tunic. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 673-680.
 30. Kumar V, Nagar S, Tripathi YC. 2014. Do assorted approaches aid in estimation of uronic acids? Case studies on *Tinospora sinensis* polysaccharides. *Int J Biol Macromol* 70: 360-363.
 31. Nakajima A, Ishida T, Koga M, Takeuchi M, Mazda O, Takeuchi M. 2002. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. *Int Immunopharmacol* 2: 1205-1211.
 32. Chang HL, Chao GR, Chen CC, Jeng LM. 2001. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Anrotdia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. *Food Chem* 74: 203-207.
 33. Mizuno M, Morimoto M, Minato K, Tsuchida H. 1998. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 434-437.
 34. Joung EM, Hwang IG, Lee HY, Jeong JH, Yu KW, Jeong HS. 2009. Changes of saponin and β -glucan content on the cultured ginseng with mushroom mycelia. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1084-1089.
 35. Han XQ, Chan BCL, Yu H, Yang YH, Hu SQ, Ko CH, Dong CX, Wong CK, Shaw PC, Fung KP, Leung PC, Hsiao WL, Tu PF, Han QB. 2012. Structural characterization and immuno-modulating activities of a polysaccharide from *Ganoderma sinense*. *Int J Biol Macromol* 51: 597-603.
 36. Kim GY, Lee JY, Lee JO, Ryu CH, Choi BT, Jeong YK, Lee KW, Jeong SC, Choi YH. 2006. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1218-1226.
 37. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 211: 24-32.
 38. Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. 2009. Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyen-haedok-tang in LPS-activated macrophage cells. *Kor J Herbol* 24: 39-47.
 39. Lee BE, Ryu SY, Kim EH, Kim YH, Kwak KA, Song HY. 2012. Immunostimulating effect of mycelium extract of *Phellinus linteus*. *Kor J Pharmacogn* 43: 157-162.
 40. Jeong HJ, Chung HS, An HJ, Seo SW, Kim TG, Won JH, Shin JY, Ahn KS, Kim HM. 2004. The immune-enhancing effect of the herbal combination Bouum-Myunyuk-Dan. *Biol Pharm Bull* 27: 29-33.
 41. Ryu HS. 2008. Effects of *Job's Tears (Yul-Moo)* extracts on mouse splenocyte and macrophage cell activation. *Korean J Food Nutr* 21: 1-6.
 42. 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.