

최 종
연구보고서

204009-02-2-SB010

노루궁뎅이 버섯에서 분리한 고용해성 다당류로부터
항암 및 면역조절활성 소재개발

The development of antitumor activity and
immunomodulating material with high soluble
polysaccharide isolated from *Hericium erinaceus*

주 관 연 구 기 관
경 북 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “노루궁뎅이 버섯에서 분리한 고용해성 다당류로부터 항암 및 면역조절활성 소재 개발” 연구과제의 최종연구보고서를 제출합니다.

2006년 5월 일

주관연구기관명 : 경북대학교
총괄연구책임자 : 최 용 희
세부연구책임자 : 강 미 영
연 구 원 : 이 보 경
연 구 원 : 김 채 은
연 구 원 : 조 성 길
연 구 원 : 윤 혜 정

요 약 문

I. 제 목

노루궁뎅이 버섯에서 분리한 고용해성 다당류로부터 항암 및 면역조절활성 소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

노루궁뎅이 버섯의 다당류를 고용해성이 부여된 생체기능성 조절 물질로 개발하고자 유용성분을 효율적으로 추출 및 분리할 수 있는 공정을 확립하고 추출조건에 따른 항암 및 면역활성을 측정하여 기능성을 확인하고 부가가치를 높일 수 있는 기술을 개발하고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 추출방법에 따른 노루궁뎅이 버섯 단백다당류의 특성
 - 노루궁뎅이 버섯의 일반성분 및 당 조성
 - 추출방법에 따른 조단백다당류의 성분 변화
2. 노루궁뎅이 버섯 추출물의 항암 및 면역조절 활성
 - *In vitro* 항암 및 면역조절 활성
 - *In vivo* 항암 및 면역조절활성
3. 노루궁뎅이버섯 단백다당류 분획의 품질특성
 - 분자량에 따른 분획물의 이화학적 특성
 - 단백 다당류 분획의 항변이원성 및 항보체 활성
4. 단백다당류를 이용한 가공제품의 개발과 품질 특성
 - 가공제품의 제조

- 분말, 과립, 타블렛 제품의 품질 특성

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 노루궁뎅이 버섯의 추출방법에 따른 단백다당류 추출수율은 염 처리 추출공정에서 가장 높은 수율을 나타내었고, 당 함량은 열수추출이, 단백질 함량은 마이크로웨이브의 추출이 높은 것으로 나타났다. 총 폴리페놀 함량은 열수, 마이크로웨이브, 염 처리 추출 공정이 유사한 경향이었으며 전자공여작용은 열수 추출이 가장 높은 효율을 나타내었고 β -glucan 함량은 마이크로웨이브 추출이 높게 나타났다.

나. 마이크로웨이브 추출(80W, 3분)이 NO 생산, ROS 소거 및 미생물 포식과 같은 대식세포의 기능 전반을 효과적으로 활성화시키는 것이 나타났으며 특히 대식세포 활성화를 유도한 추출분획들에서는 감염체에 대한 주요한 방어기작 중의 하나인 보체활성화 기작을 억제하지 않았다.

다. 노루궁뎅이 버섯 추출물의 대식세포 활성유도능을 마우스에서 직접 분리한 복강대식세포를 대상으로 검정한 결과 대식세포의 활성화를 유도하는 효과가 있는 열수추출(100℃, 3시간)과 마이크로웨이브추출(80W, 3분)방법을 선발하여 대식세포의 cytokine 유도능을 조사한 결과, 마이크로웨이브 추출물의 활성이 더 높았다. 또한 이 추출물은 마우스의 colon carcinoma cell line인 CT-26 cell의 증식을 억제하고, NK세포에서 종양세포 살해활성을 보였다.

라. 이상의 결과에서 우수한 기능성을 보이는 추출조건으로 인정되는 마이크로웨이브추출(80W, 3분)을 가장 우수한 조건으로하여 노루궁뎅이 버섯을 추

출한 후 단백다당류의 분획물을 막분리를 통하여 10 kDa, 10~150 kDa, 150 kDa 이상으로 분획하였다. 분획물의 분자량이 클수록 총당과 단백질의 함량이 높았으며 페놀성 물질의 함량과 DPPH 유리기 소거능도 높아 항산화, 항암, 항미생물 및 아질산염 소거능 등의 활성이 있을 것으로 판단된다. 단백 다당류 분획의 항변이원성은 높은 농도에서 성장을 저해하는 경향이었으며 단백다당류 분획중에서는 분자량이 클수록 항변이원성은 높은 경향이었고, 단백다당류 분획 모두 항보체 활성이 대체로 높았으며, 분자량이 클수록 항보체 활성도 높은 경향이였다.

마. 기능성이 우수한 노루궁뎅이 버섯의 고용해성 단백다당류를 얻기 위하여 분무건조를 통하여 미세 분말을 얻고 효과적으로 섭취하기 위하여 분말, 과립, 타블렛, 캡슐 제품을 제조하였다. 수분결합지수는 분무건조 분말>타블렛>과립 순이었으며 분무건조 분말이 가장 높은 흡습성을 보여 타블렛 형태로 제조하는 것이 저장성 면에서 우수한 제품을 얻을 것으로 판단된다.

2. 활용에 대한 건의

가. 노루궁뎅이 버섯에서 분리한 고용해성 다당류의 항암 및 면역증진 효과를 확인하고 유용물질의 제조공정을 확립함으로써, 의약산업 및 식품산업에서 효용가치를 높여 관련 산업분야의 발전에 기여할 수 있다.

나. 노루궁뎅이 버섯 기능성 다당류의 생산기술 및 개발원리는 유사한 기능성 버섯류에도 적용되어 보다 다양한 약리기능을 가진 다당류의 분자크기에 따른 분리 및 생리활성의 구명에 기여할 수 있다.

SUMMARY

I. Title

The development of antitumor activity and immunomodulating material with high soluble polysaccharide isolated from *Hericium erinaceus*

II. Objective and Significance

This study was conducted to establish efficient extraction method of protein bound polysaccharide from *Hericium erinaceus* and investigate the antitumor activity and immunomodulating effect of high soluble polysaccharide

III. Contents and Scope

1. Characteristics of protein bound polysaccharide on extraction method
 - Approximate component and sugar composition of *Hericium erinaceus* powder
 - Evaluation characteristics of protein bound polysaccharide by extraction method
2. Antitumor and immunomodulating activity of *Hericium erinaceus* extracts on extraction method
 - *In vitro* assay for antitumor and immunomodulating activity
 - *In vivo* assay for antitumor and immunomodulating activity
3. Quality of protein bound polysaccharide fraction of *Hericium erinaceus* extracts
 - Physicochemical properties of fraction on molecular sieve

- Anti mutagenic activity and anti complementary activity of protein bound polysaccharide fraction
4. Development new product containing high soluble polysaccharide isolated from *Hericium erinaceus*
- Preparation of powder, granulate, tablet and capsule using spray drying
 - Evaluation of quality and stability for trial product

IV. Results and Recommendation

1. Results

a. Among the extraction methods, that protein bound polysaccharide from *Hericium erinaceus*, NaOH extraction had a higher yield of protein bound polysaccharide(PBP), while hot water extraction had a higher in sugar content, microwave extraction had a higher in protein content. Especially, β -glucan content of microwave extraction was higher than the other methods, but hot water extraction had higher electron donating ability.

b. Especially, we found that an extract prepared by microwave extraction with 50% ethanol at 80 W for 3 min enables to induce effectively overall functional activation of macrophage, such as NO production, ROS scavenging and phagocytosis of *C. albicans*, respectively. These results demonstrated that a 50% ethanolic extraction using microwave at 80 W for 3 min would be useful for enrichment of macrophage-activating components contained in *Hericium erinaceus*, implying participation of protein bound polysaccharide as a active factor.

c. Effects of the hot water(100°C, 3hours) or 50% ethanolic extracts(80W, 3 min) prepared by *Hericium erinaceus* on macrophage activation were determined by using the mouse macrophage cell line RAW264.7 cells as a indicator cell. The results demonstrated that the fractions prepared by microwave extraction with 50% ethanol at 80 W for 3 min had the greatest inducing abilities for NO production, and that the greatest ROS scavenging abilities. And this extraction method had inhibition to propagation in CT-26 cell, and had killing activity on tumor cell in NK cell line. Phagocytotic activities against *Candida albicans* were found to be highest for the 50% ethanolic extracts prepared by microwave extraction for 3 min at 80 W.

d. The optimum extraction method for protein bound polysaccharide(PBP) from *Hericium erinaceus* extract was microwave extraction for 3 min at 80 W. Then, the fraction of PBP were gained by membrane filtration as <10 kDa, 10-150 kDa and >150 kDa. As well as the molecular weight larger, the total sugar and protein content were higher. And the phenolic content and DPPH radical scavenging activity were increased by molecular weight. The anti mutagenic activity of PBP fraction had inhibition tendency in high concentration. As increasing molecular weight, the anti mutagenic activity and the anti complementary activity were higher in >150 kDa.

e. To develop a new high soluble protein bound polysaccharide(PBP) product from *Hericium erinaceus* extract, the powder was prepared by the spray drying method. The high soluble powder was mixed with sub-ingredients and then granulated type by granulator and molded as tablet

type by a press molder respectively. The absorption capacity was higher in powder, but the product type did not affect the color. The results indicate that antitumor activity and immunomodulating material with high soluble PBP product could be made from *Hericium erinaceus*.

2. Suggestions for Practical Use

a. Development of antitumor activity and immunomodulating material with high soluble polysaccharide isolated from *Hericium erinaceus* and establishment efficient extraction method, it will be possible to growth in polysaccharide materials and food and medicinal industry.

b. The increasing of the extraction technology for protein bound polysaccharide in useful mushroom and the accumulation of scientific research conduct the antitumor activity and immunomodulating materials related industry. And high valued product is developed by applying for patent, paper and transfer related to technology to enterprise.

CONTENTS

Summary	2
Chapter 1. Introduction and objectives	19
Section 1. Introduction	19
Section 2. Significance	20
Section 3. Research contents and scope	23
Chapter 2. Research status of domestic and abroad	24
Chapter 3. Methods and Results	26
I . Materials and methods	26
Section 1. Materials	26
Section 2. Extraction methods of protein bound polysaccharide	26
Section 3. Analysis characteristics of protein bound polysaccharide	27
1. Extraction yield	27
2. Sugar content	27
3. Sugar composition	27
4. Protein content	28
5. Total polyphenol content	28
6. Electron donating ability	28
7. Browning degree	28
8. β -glucan content	28

Section 4. Antitumor and immunomodulating activity of <i>Hericium erinaceus</i>	29
1. Materials	29
2. Cytotoxic evaluation by MTT assay	29
3. NO production ability of macrophage	30
4. Macrophage phagocytosis activity by <i>Candida albicans</i>	30
5. ROS scavenging activity	31
6. NO production ability by endotoxin mixing using polymixin B	31
7. Abdominal cavity macrophage extraction and NO production ability ..	32
8. Propagation inducing activity for abdominal cavity macrophage	32
9. Propagation inducing activity for spleen lymphocyte	33
10. Cytokine mRNA revelation and protein synthesis by RT-PCR and ELISA	33
11. Anti complementary activity	35
12. Anti mutagenic activity by SOS chromotest	35
13. Tumor inhibition ability by NK cell activation	36
14. <i>In vitro</i> tumor propagation inhibition activity	37
15. <i>In vivo</i> tumor propagation inhibition activity	38
Section 5. Characteristics of protein bound polysaccharide fraction of <i>Hericium erinaceus</i>	38
1. Molecular sieve of protein bound polysaccharide	38
2. Quality of protein bound polysaccharide	39
3. Anti mutagenic activity by SOS chromotest	40
4. Anti complementary activity	41
Section 6. Preparation of <i>Hericium erinaceus</i> extracts and quality characteristic	42
1. Spray drying	42

2. Preparation of granulate	42
3. Preparation of tablet	42
4. Quality characteristics	42
II. Results	44
Section 1. Characteristics of protein bound polysaccharide by extraction method	44
1. Proximate composition of <i>Hericium erinaceus</i>	44
2. Changes of protein bound polysaccharide by extraction method	46
1) Extraction yield, sugar and protein content	46
2) Total polyphenol, EDA, Browning degree and β -glucan	46
Section 2. Antitumor and immunomodulating activity of <i>Hericium erinaceus</i> extracts	49
1. <i>In vitro</i> antitumor and immunomodulating activity	49
1) NO production inducing ability by extraction method	49
2) ROS scavenging activity by extraction method	51
3) <i>Candida albicans</i> phagocytosis activity by extraction method	53
4) Endotoxin mixing by extraction method	55
5) Cytotoxic evaluation by extraction method	55
6) Anti complementary activity by extraction method	58
7) Anti mutagenic activity by extraction method	60
2. <i>In vivo</i> antitumor and immunomodulating activity	64
1) NO production inducing ability by extraction method	64
2) Abdominal cavity macrophage propagation inducing activity	67
3) Propagation inducing activity for spleen lymphocyte	67
4) Immunomodulating factor revelation of macrophage	70
5) <i>In vitro</i> anti tumor activity	75

6) Anti tumor activity on transplantation tumor in mouse	77
7) Tumor cell killing by NK cell activation	80
Section 3. Characteristics of protein bound polysaccharide fraction of	
<i>Hericium erinaceus</i>	86
1. Characteristics of protein bound polysaccharide by molecular weight ·	86
2. Color of protein bound polysaccharide by molecular weigh	94
3. Anti mutagenic activity of protein bound polysaccharide	96
4. Anti complementary activity protein bound polysaccharide	99
Section 4. Preparation of <i>Hericium erinaceus</i> extracts and quality	101
1. Preparation of product used <i>Hericium erinaceus</i> extracts	101
2. Quality characteristics of powder, granulate and tablet	103
3. Color changes of powder, granulate and tablet	108
4. Stability of powder, granulate and tablet	110
Chapter 4. Achievements and Contribution of the Study ·	112
Chapter 5. Application plan of results	116
Chapter 6. References	117

목 차

요 약 문	2
제1장 연구개발과제의 개요	19
제1절 서 론	19
제2절 연구의 필요성	20
제3절 연구내용 및 범위	23
제2장 국내의 기술개발 현황	24
제3장 연구개발 수행내용 및 결과	26
I. 재료 및 방법	26
제1절 실험재료	26
제2절 단백질의 추출과정	26
제3절 단백질의 이화학적 특성 분석	27
1. 추출수율	27
2. 당 함량	27
3. 당 조성	27
4. 단백질 함량	28
5. 총 폴리페놀 함량	28
6. 전자공여작용	28
7. 갈색도	28
8. β -glucan 함량	28
제4절 단백질의 항암 및 면역증강 활성 검정	29
1. 실험재료	29

2. MTT assay에 의한 세포독성 검정	29
3. Macrophage의 NO 생산능 측정	30
4. <i>Candida albicans</i> 를 이용한 대식세포 포식활성의 측정	30
5. 세포 내 활성산소종 소거활성의 측정	31
6. Polymixin B를 이용한 시료 내 endotoxin 혼입이 NO생산에 미치는 영향 측정	31
7. 복강대식세포의 추출 및 NO 생산능의 측정	32
8. 복강대식세포에 대한 증식 유도활성의 측정	32
9. 비장 림프구에 대한 증식 유도활성의 측정	33
10. RT-PCR 및 ELISA에 의한 cytokine mRNA의 발현 및 단백질 합성 유 도	33
11. 항보체 활성 측정	35
가) 정상인의 혈청(normal human serum, NHS)의 제조	35
나) Alternative pathway(부경로)를 통한 항보체 활성의 측정	35
12. SOS chromotest에 의한 항변이원성 측정법	35
13. NK세포 활성화에 의한 종양억제능의 측정	36
가) NK세포의 분리	36
나) 표적 종양세포의 표식	36
다) NK세포에 의한 종양살해 반응	37
14. <i>In vitro</i> 의 종양세포 증식억제활성의 측정	37
15. <i>In vivo</i> 의 종양세포 증식억제활성의 측정	38
제5절 노루궁뎅이 버섯 단백다당류 분획 특성	38
1. 단백다당류의 막분리	38
2. 단백다당류 분획의 품질 특성	39
가) pH 측정	39
나) 산도측정	39
다) 총당 측정	39

라) 단백질 측정	39
마) 총 페놀성 물질 측정	39
바) DPPH 유리기 소거능 측정	40
사) 색도 측정	40
3. SOS chromotest에 의한 항변이원성 측정	40
4. 항보체 활성 측정	41
가) 정상인의 혈청(normal human serum, NHS)의 제조	41
나) Alternative pathway(부경로)를 통한 항보체 활성의 측정	41
제6절 가공품의 제조와 품질특성	42
1. 분무건조	42
2. 과립의 제조	42
3. 타블렛의 제조	42
4. 가공제품의 품질 특성	42
가) 수분측정	42
나) 총당측정	42
다) 단백질 측정	43
라) 색도 측정	43
마) 수분결합지수 측정	43
바) 흡습성 측정	43
II. 결과 및 고찰	44
제1절 추출방법에 따른 단백다당류의 특성	44
1. 노루궁뎅이 버섯의 일반성분 및 당 조성	44
2. 추출방법에 따른 단백다당류의 성분 변화	46
가) 추출수율, 당 및 단백질 함량	46
나) 총 폴리페놀 함량, 전자공여작용, 갈색도 및 β -glucan 함량	46
제2절 추출조건에 따른 노루궁뎅이버섯추출물의 항암 및 면역조절 활성	49

1. 노루궁뎅이 버섯 추출물의 <i>in vitro</i> 항암 및 면역조절 활성	49
가) 추출분획별 NO 생산 유도활성	49
나) 추출분획별 활성산소종 소거활성	51
다) 추출분획별 <i>C. albicans</i> 포식활성	53
라) 추출분획별 endotoxin 혼입여부의 측정	55
마) 추출분획별 세포독성의 측정	55
바) 추출분획별 항보체 활성	58
사) 항변이원성 검정	60
2. 노루궁뎅이 버섯 추출물의 <i>in vivo</i> 항암 및 면역조절활성	64
가) 추출분획별 NO 생산 유도활성	64
나) 추출분획별 복강대식세포에 대한 증식유도 활성	67
다) 추출분획별 비장 림프세포에 대한 증식유도 활성	67
라) 추출물분획이 대식세포의 면역기능인자 발현에 미치는 효과	70
마) 추출물분획의 <i>in vitro</i> 항암활성	75
바) 추출물분획이 실험동물에 이식된 종양에 대한 항암활성	77
사) NK세포의 활성화에 의한 암세포의 살해	80
제3절 노루궁뎅이버섯 단백질분획의 품질특성	86
1. 단백질분획의 분자 크기에 따른 분획물의 이화학적 특성	86
2. 단백질분획의 분자 크기에 따른 분획물의 색도변화	94
3. 조단백 다당류 분획의 항변이원성	96
4. 단백질분획의 항보체 활성	99
제4절 단백질분획을 이용한 가공제품의 개발과 품질 특성	101
1. 가공품의 제조	101
2. 노루궁뎅이 버섯을 이용한 분말, 과립, 타블렛 제품의 품질 특성	103
3. 노루궁뎅이 버섯을 이용한 분말, 과립, 타블렛 제품의 색도변화	108
4. 노루궁뎅이 버섯을 이용한 분말, 과립, 타블렛 제품의 흡습특성	110

제4장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	112
제5장	연구결과의 활용	116
제6장	참고문헌	117

여 백

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 서 론

최근 식생활이 서구화 되고 평균수명의 연장으로 고령화 사회로 돌입하면서 국민의 식생활과 건강에 대한 관심이 점점 고조되고 있다. 또한, 의료비도 해마다 증가하는 경향에 있으며 예방의학, 특히 식생활에 의한 건강유지가 주목받게 되었다. 과거에는 식품의 기능으로서 영양기능 및 맛, 향, 색, 촉감과 같은 감각 기능이 중시되어 왔지만, 최근에는 제3의 기능으로 불리는 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 예방과 회복과 같은 기능에 대한 관심이 높아지고 있다.

근래 기능성 식품으로서 각광을 받고 있는 식품 중 버섯은 오래 전부터 맛과 영양이 풍부한 식품으로 그리고 약용 등의 목적으로 사용해 왔다. 버섯을 소재로 여러 가지 생리활성 물질을 구명하고자 하는 노력들이 시도됨에 따라 그 성분과 약리작용에 대한 체계적이고 과학적인 연구가 활발히 진행되어 항암효과, 콜레스테롤 저하효과, 고지혈증 개선 및 노인성 치매개선 등에 이르기까지 여러 방면에 걸쳐 유효한 성분이 보고되고 있다.

이처럼 자연계에 수천 종 이상 존재하는 버섯은 다양한 기능성과 그에 관련된 여러 가지 성분을 함유하고 있는 고부가가치의 건강식품으로 취급되고 있으며 새로운 의약품 소재로 개발 가능성이 높아지고 있다.

특히 노루궁뎅이 버섯(*Hericium erinaceus*)은 오래 전부터 식용 및 약용으로 이용되어 왔으며 가을철 활엽수의 고목이나 생목에서 발생하는 버섯으로 중국에는 후두버섯이라고 칭하고 있고 일본에서는 Yamabushitake로 불려지고 있다. 노루궁뎅이 버섯의 약리작용으로는 항암 및 면역기능을 증강시키며 만성위염, 신체허약 등에 효능이 있다고 알려지고 있으며, 최근에는 치매치료제로 이용 가능한 물질이 분리되어 그 구조까지 밝혀졌다. 이와 같이 노루궁뎅이 버섯은 항암효과를 가진 성분을 포함하여 여러 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 보고되고 있다.

영지, 운지 및 표고버섯 등의 약용버섯에는 superoxide 소거활성이 2,000~3,000unit/g 존재하지만 노루궁뎅이 버섯에는 8,400 unit/g 정도로 활성도가 3~4배 가량 높은 관계로 인간의 노화예방 소재로서의 가능성이 매우 높다고 할 수 있다.

치매현상은 사람의 뇌속에 존재하는 neuron이라는 신경세포의 감소로 인해 발생하는 관계로 neuron의 감소를 예방하는 것이 치매치료의 핵심이다. 노루궁뎅이 버섯에는 neuron의 감소를 방어하는 NGF(New Growth Factory : 신경세포성장인자)의 활동을 활성화시키는 생리활성물질인 hericenone과 erinacine을 다량 함유하고 있다. 사람의 뇌안에서 NGF의 합성촉진작용을 하고 있는 것은 에피네프린이라는 호르몬인데, 노루궁뎅이 버섯에 함유된 erinacin은 그 에피네프린과 비교할 때 4배 이상의 활성을 보였다고 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 분자량에 따라 다양한 생리활성이 기대되는 노루궁뎅이 버섯의 다당류를 고용해성이 부여된 생체기능성 조절 물질로 개발하고자 유용성분을 효율적으로 추출 및 분리할 수 있는 공정을 확립하고 생체기능성 조절 물질의 분자량에 따른 차이가 다양한 항암활성 지표와 어떤 상관성을 갖는지를 조사하여, 각 성분을 선별, 이용함으로써 노루궁뎅이 버섯의 산업적 이용에 있어서 부가가치를 더욱 높일 수 있을 방향으로의 기술개발을 이루고자 한다.

제2절 연구의 필요성

우리나라는 국토면적의 4분의 3이 산지인 척박한 자연환경과 아직도 지속되고 있는 도시로의 인구이동현상으로 높은 인건비와 농업인구의 고령화에 직면해 있고 또한 점점 가중되고 있는 농산물 수입 개방화의 압박 등으로 인해 우리나라 농산물은 설자리를 잃어가고 있다. 이를 극복하기 위하여 경제적, 산업적으로 부가가치가 크고 적은 면적에서 생산이 가능하며 노동 집약적이기 보다

는 기술집약적인 농산물을 활용할 수 있는 기술 개발이 요구되고 있다. 이러한 관점에서 버섯은 식품적 가치 뿐만 아니라 약용적 가치나 그외 기능성 성분들을 함유하고 있어 이를 연구개발 한다면 그것의 경제적, 산업적 의미가 클 것으로 생각한다.

천연물에 함유되어 있는 약리 활성 물질에 대한 신약 개발에는 막대한 자금과 고도의 기술, 그리고 긴 연구기간이 요구되는 자본집약적인 과정임에 비해서, 천연물의 약리 활성을 이용한 식품의 개발은 국제 특허의 획득과정 등에도 신약개발과 같은 까다로운 제약이 없다. 따라서 소자본으로 고부가가치 상품의 개발과 국제적인 보급이 가능하므로, 약리 효과가 인정된 농축성분을 이용한 만성대사질환 예방차원의 건강 기능성식품의 개발은 농촌경제의 활성화에 크게 기여할 것으로 판단된다.

현재 시판중인 버섯에서 분리된 항암제로는 표고버섯에서 분리한 고분자 β -1,3 glucan인 lentinan, 운지버섯에서 얻어진 PS-K, 상황버섯에서 분리한 메시마엑스 등이 있으나 모든 버섯류의 기능성물질은 다당류가 그 주체인 것으로 인정하고 있으며 이들 다당류는 보통 heteropolysaccharide류로 분자량이 100,000-2,000,000으로 고분자 물질이며 특히 다당류의 분자량 변화에 따른 생리활성 기작의 차이에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없다.

항암효과를 갖고 있는 다당류는 담자균류의 수용성 추출액을 정제함으로써 제조될 수 있는 것으로 알려져 있으나, 대부분 열수추출 방법을 이용하여 유용성분을 추출하는 데에는 한계가 있으며 산업화를 위해 필수적인 문제인 유용성분을 효율적으로 추출할 수 있는 추출공정이나 분리공정에 관한 연구는 전무한 실정이다.

일반적으로 버섯추출물의 분리, 정제방법으로는 유기용매를 사용하는 침전, 황산암모니움을 사용하는 염석, 투석 또는 겔 여과 등이 많이 이용되고 있으나 이러한 분리/정제 수단은 실제 공정상 복잡하고 가격이 비싸며 생산수율도 낮아 산업화에 어려움이 있다.

따라서 유용성분을 효율적으로 추출 및 분리할 수 있는 공정의 확립이 필요

하며 생체기능성 조절 물질의 분자량에 따른 차이가 다양한 항암활성 지표와 어떤 상관성을 갖는지를 조사할 필요성이 있다.

본 연구를 수행함으로써 최근 현대인들에게 치료보다는 예방이 우선되어야 한다는 인식의 전환이 이루어지고 있는 상황에서 새로운 형태의 건강보조식품의 개발은 시장 확대와 더불어 그 관심이나 소비가 늘어날 것이며 또한, 생활이 풍요해지고 노령화 사회로 진입함에 따라 질병의 양상도 변모되어 암이나 만성 퇴행성 질환으로 인한 사망률이 점점 높아지고 있어 기능성 식품 및 기타 건강보조제의 일상적인 섭취를 통하여 암 등의 성인병을 예방할 수 있다면 고령화 사회에서 개개의 국민에게 돌아갈 부담을 감소시키는데 큰 역할을 할 것이다.

제3절 연구내용 및 범위

연구개발내용	연구범위
<p>제 1 세부과제 : 노루궁뎅이 버섯으로부터 항암 및 면역조절 활성 소재의 제품화 공정 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 추출공정 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 화학적방법(열수, 용매, 산/알카리) - 물리적방법(extruder, microwave, ultrasonic, 가압추출) - 생물학적방법(효소분해) - 유용성분 분석을 통한 최적화 - 다당류 함량 분석 - β-glucan, hericenon 등 함량 분석 - 기타 유용성분 분석 ● 다당류의 막분리 및 분말화 공정의 특성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 분자량 크기에 따른 다당류의 물리적 특성 분석 ● 다양한 형태의 제품개발 <ul style="list-style-type: none"> - 초미립 분말 제품개발 - 과립형 제품개발 - 타블렛형 제품개발 - 캡셀형 제품개발
<p>제 2 세부과제 : 노루궁뎅이버섯에서 분리한 고용해성 다당류의 항암 및 면역증강 활성 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● In vitro 항암 및 면역조절 활성 측정 <ul style="list-style-type: none"> - 암세포에 대한 세포독성 측정 - 섭식세포의 cytokine 생산, NO생산양상의 평가 - 항체 생산 조절 능력의 측정 ● In vivo 항암 및 면역조절 활성 측정 <ul style="list-style-type: none"> - 섭식세포의 종양세포 살해능 평가 - 고용해성 다당류 식이의 생체 종양발생에 대한 억제활성 측정 - 고용해성 다당류 식이가 종양발생 생체의 대식세포 활성화에 미치는 영향의 평가

제2장 국내외 기술개발 현황

일반적으로 버섯의 약리 기능성으로서는 항암, 면역활성 증강 기능이 널리 알려져 있으나, 주로 표고버섯, 운지버섯, 상황버섯 및 아가리쿠스버섯 등에 함유된 단백다당체의 항종양 활성을 대상으로 한 연구로서, 노루궁뎅이 버섯에 대한 체계적인 생리활성 연구는 아직도 미흡한 수준이며, 노루궁뎅이 버섯의 제암효과, 면역증강, 콜레스테롤 저하효과, 고지혈증 개선 및 노인성 치매 치료 등 여러 방면에 걸쳐 유효한 성분이 보고되고 있으나, 다당류의 화학적 구성 및 생체내 항암활성의 다양성을 고려할 때 이 결과는 노루궁뎅이 버섯 다당류가 가지는 항암활성의 극히 일부라고 보여지며, 아직도 구명되어야 할 부분이 많다고 사료된다.

최근에 여러 종류의 버섯들이 항암효과가 있음이 알려졌는데 버섯이 항암효능을 나타내는 주된 원인은 버섯속에 함유되어 있는 단백다당체(protein bound polysaccharide) 때문이라는 것이 밝혀지고 있다. 버섯 유래의 고분자 다당류의 경우는 난치병으로 인식되어온 암에 대한 항암 활성이 매우 현저한 것으로 밝혀졌는데, 이들은 기존의 합성 항암제와는 달리 직접 암세포에 작용하기 보다는 숙주매개성 면역활성화기능을 보유하고 있다. 따라서 면역계와 관계 있는 보체(complement) 및 대식세포(macrophage)를 활성화하여 암세포의 생물학적 반응을 변화시켜서 치료효과를 나타내므로 독성 및 부작용이 거의 없는 장점을 갖고 있다. 현재 버섯유래의 항암효과를 갖는 다당류는 표고버섯으로부터 lentinan, 치마버섯으로부터 schizophyllan, 구름버섯으로부터 krestin 등이 있고 이들은 일본과 동남아 등지에서 면역증강성 항암제로 시판되고 있다. 노루궁뎅이 버섯에서 중요한 생리활성을 나타내는 물질은 β -glucan이며, 구조는 β -(1-6)-glucosyl의 분지를 가진 β -(1-3)-glucan임이 밝혀졌다. β -glucan은 면역활성체의 기능, 항산화능, 생체조직 재생과 치유기능, 항생제, 항균, 항바이러스 및 대식세포를 자극하여 돌연변이 세포를 인식하고 공격하는 항종양 효과가 있다고 보고되고 있다. 노루궁뎅이에 함유되어 있는 단백다당체는 추출 후 에탄올

침전을 통해 침전물인 단백다당류(protein bound polysaccharide)를 정제하여 얻을 수 있으며, β -glucan, 단백질, 다당류가 혼합되어 있다. 단백다당류는 추출액에서 분리된 crude한 물질이지만, 위암, 간암 및 폐암세포주의 항암효과 연구에서 뛰어난 저해효과를 보였으며, 마우스를 이용한 *in vivo* 실험에서도 활성이 뛰어난 물질임을 확인하였다. 노루궁뎅이 버섯 단백다당체는 분자량이 10 kDa~3900 kDa로 광범위한 분포를 보이며, 일반적으로 10 kDa이하는 단당류 및 색소류가 포함되어 있는 저분자 물질인 관계로 제거하여 왔으나, 최근 일본에서의 연구결과에 따르면 8,000 Da이하의 저분자물질에도 유용한 생리활성 물질을 함유하고 있으며 소화관의 흡수율을 높여 높은 활성을 가진다고 보고하였다. 분자량 64,000 Da에는 당이 11% 함유되어 있는 단백다당체인 렉틴(lectin)류가 있으며, 그 이상의 분자량을 가지는 중성 및 산성 다당체가 다량 함유되어 있다고 알려져 있어, 각각의 분자량에 따라 생리활성이 다양하다. 항암효과를 갖고 있는 단백다당체는 담자균류의 수용성 추출액을 정제하므로써 제조될 수 있는 것으로 알려져 있으나, 대부분 열수추출 방법을 이용하는 관계로 유용성분을 추출하는데 한계가 있으며, 산업화를 위해 필수적인 문제인 유용성분을 효율적으로 추출할 수 있는 추출공정이나 분리공정에 관한 연구는 전무한 실정이다.

노루궁뎅이 버섯 유래의 다당류 중 분자량과 이들이 나타내는 항암활성 기작과의 관련성에 대해서는 전 세계적으로 연구된 바가 없으므로 학문적 가치가 높을 뿐 아니라, 분자량에 따라 버섯 다당류의 면역증진 및 항암활성에 차이가 있다면, 각 성분을 선별·이용하는 것이 가능하므로, 노루궁뎅이 버섯의 산업적 이용에 있어서 부가가치를 더욱 높일 수 있을 것으로 판단된다.

제3장 연구개발 수행내용 및 결과

I. 재료 및 방법

제1절 실험재료

본 실험에 사용된 노루궁뎅이 건버섯은 경상북도 안동시 소재 류충현 약용버섯 농장에서 구입하여 miller로 분쇄하고 표준망체 (40 mesh)를 통과한 분말을 -18℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

제2절 단백질의 추출과정

노루궁뎅이 버섯 분말로부터 단백질 (protein bound polysaccharide; PBP)의 추출 및 분리공정은 다음과 같다. 시료와 추출 용매비를 1:20으로 조절하여 열수추출, 마이크로웨이브추출, 산 및 염 처리 추출을 행하였으며, 이 때의 4가지 추출방법은 예비실험을 통해 선정이 되었다. 열수추출은 100℃에서 30분, 1, 2, 3시간으로 선정하였고, 마이크로웨이브추출은 2,450 MHz 주파수의 상압형 추출장치 (Microdigest unit, Prolabo, France)를 이용하였으며 40~120 W, 1~9 min으로 선정하였고 추출용매는 증류수를 사용하였다. 산 및 염 처리는 0.5%~3%로 100℃에서 2시간동안 HCl과 NaCl을 각각 처리하였다. 추출 후 원심분리하여 상층액을 얻고 1/3으로 농축한 뒤 4배의 에탄올을 가하고 단백질을 침전시키기 위해 4℃에서 24시간 동안 방치하였다. 이를 원심분리한 뒤 단백질을 분리, 소량의 증류수로 침전물을 용해한 후 dialysis tube (MWCO : 12 kDa, D-0655, Sigma, St. Louis, MO, USA)에 넣고 4℃에서 3일간 투석하고 동

결 건조하여 분석용 시료로 사용하였다.

제3절 단백질의 이화학적 특성 분석

1. 추출수율

마이크로웨이브 추출에 사용한 노루궁뎅이 버섯의 분말 시료 무게에 대한 단백질추출수율을 추출한 뒤 동결건조 한 후 분말시료의 무게를 측정하여 백분율로 나타내었다.

2. 당 함량

당 함량 분석은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법을 이용하였다. 즉 시료 1 mL에 5% phenol solution 1 mL를 가한 후 H₂SO₄ 6 mL를 가하여 혼합하고 20분간 방치한 뒤에 470 nm에서 비색 측정하였다.

3. 당 조성

시료 10 mg을 5 mL의 2 M trifluoroacetic acid(TFA)에 녹여 121°C에서 12 시간 동안 가수분해한 다음 sodiumborohydride(NaBH₄)로 환원시키고 acetic anhydride로 acetylation하여 당의 alditol acetate를 얻었다. 생성된 alditol acetate를 chloroform으로 추출하여 GC(HP6890, Hewlett Packard Co., Cambridge, MA, USA)분석을 행하였다. GC분석은 fused silica capillary SP-2330(0.32 mm×30 mm, Supelco Co.) column을 사용하였고 carrier gas는 He, detector는 FID를 사용하였다. Column 온도는 초기에 200°C로 2분간 유지시키고 4°C/min의 속도로 250°C까지 서서히 증가시켜 4분간 유지하면서 분석하였다. 이 때 injector와 detector의 온도는 250°C와 260°C이었다.

4. 단백질 함량

노루궁뎅이 버섯 추출물의 단백질 함량은 Lowry-Folin법에 의해 시료 1 mL에 Lowry 시약과 Folin 시약을 반응시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 총 폴리페놀 함량

페놀성 화합물의 함량은 Amerine과 Ough의 방법에 준하여 흡광도를 측정하였다. 즉, 시료 2 mL에 Folin-ciocalteau 시약 2 mL를 가하여 혼합하고 3분 뒤 10% Na₂CO₃ 2 mL를 가하여 진탕한 후 실온에서 1시간동안 방치하여 760 nm에서 비색 정량하였다.

6. 전자공여작용

전자공여작용 (electron donating abilities, EDA)은 DPPH (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)를 이용한 방법에 준하여 측정하였다. 즉, DPPH시약 16 mg을 ethanol 100 mL에 용해하고 시료 0.2 mL에 ethanol 3 mL를 가한 후 조제한 DPPH시액 0.8 mL을 혼합하여 10초간 진탕한 후 상온에서 10분간 방치하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{EDA (unit)} = \left(1 - \frac{\text{sample } O.D.}{\text{control } O.D.}\right) \times 100$$

7. 갈색도

시료를 0.1 mg/ml로 조제하여 420 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

8. β -glucan 함량

β -glucan 함량은 Pamela Laura의 효소적 방법에 따라 Megazyme β -glucan kit (Megazyme Pty. Ltd., Wicklow, Ireland)를 사용하여 510 nm에서 측정하였다.

제4절 단백질다당류의 항암 및 면역증강 활성 검정

1. 실험재료

실험에 사용한 BALB/C 마우스는 샘타코(주)에서 구입하였다. *E. coli* PQ 37 균주는 서울대학교 천연물연구소에서 분양받았으며, 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA)에서 구입하였다. 효모배양을 위한 YPD 배지 및 *E. coli* 배양을 위한 LB 배지에 사용한 peptone, bactotrypton, yeast extract 및 agar powder는 Difvo-BRL (Gaithersburg, MD)의 제품을 사용하였다. 동물세포 배양에 사용된 배지 및 fetal bovine serum (FBS)과 염류용액은 모두 Hyclone (Logan, UT)에서 구입, 사용하였다. Polymixin B를 비롯한 화학시약은 모두 Sigma Chemicals (St. Louis, MO)의 제품을 사용하였다. 대식세포주 자극용 interferon- γ 및 림프구의 분리에 사용된 Lymphocyte-M은 각각 Calbiochem사 및 Cedarlane사의 제품을 사용하였다. 세포분리용 Histoplaque-1077은 Sigma Chemicals에서 구입하였고, 대식세포 및 T 세포 자극용 LPS 및 Concanavalin A는 모두 Calbiochem사의 제품을 사용하였다. 종양세포의 표식에 사용된 Calcein-AM도 Calbiochem사의 제품을 구입하여 사용하였다. 세포증식 측정용 kit인 non-radioactive cell proliferation assay kit는 Sigma Chemicals, cytokine ELISA kit는 BioSource사의 제품을 사용하였다. RT-PCR에 사용된 *Taq* polymerase는 Promega사의 제품을 사용하였고 PCR primer는 Bioneer사에 제작을 의뢰하였다.

2. MTT assay에 의한 세포독성 검정

Mitochondrial dehydrogenase activity 지표를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 검정물질이 세포의 생존에 미치는 효과를 측정하였다. 지시세포인 RAW 264.7 세포주를 96 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주한 후, 시료를 처리하여 37°C의 5% CO₂를 포함한 포화습도 공기에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 상정액을 제거하고, 2 mg/mL 의 MTT(Sigma

M-2128)시약을 100 μ l 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 보존 하였다. 보존 후, 잔여의 MTT시약을 제거하고 DMSO를 150 μ l 씩 분주하여 침전물을 충분히 용해시킨 후 ELISA reader(Model-550, Bio-rad, USA)에서 570 nm의 측정파장 및 650 nm에서의 reference 파장을 기준으로 흡광도를 측정한다.

3. Macrophage의 NO 생산능 측정

Macrophage 계열인 RAW 264.7 세포주를 지시세포로 사용하였고, 10% FBS, 100 unit/ mL/penicillin 및 streptomycin을 포함하는 D-MEM 배지에서 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂를 포함한 포화습도 공기에서 24시간 배양한다. Mg²⁺, Ca²⁺를 포함하지 않은 PBS로 3회 세척한 배양세포를 0.25% trypsin 처리하여 dish로 부터 cell을 떼어낸 후, 세포를 96 well plate에 1 \times 10⁵ cells/well의 밀도가 되도록 분주한다. 최종농도가 100 ng/mL가 되도록 LPS를 첨가하여 자극한 세포에 각각 1, 10, 100 μ g/mL이 되도록 시료를 배지에 첨가하여, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C의 조건에서 48시간 배양한 후 상정액을 회수하여 Griess solution[0.05% N-(1-naphthyl ethylene diamine dihydrochloride, 0.5% sulanilamide, 2.5% H₃PO₄)를 첨가하여 15분간 방치한 후, ELISA reader(Model-550, Bio-rad, USA)에서 측정파장 470 nm, reference 파장 650 nm에서 측정한다. 정량을 위한 표준곡선은 NaNO₂를 사용하여 작성하였고 이것을 기준으로 NO의 양을 계산한다.

4. *Candida albicans*를 이용한 대식세포 포식활성의 측정

인체에 감염하여 질병을 일으키는 대표적인 효모인 *Candida albicans*를 지시세포로 사용한 candidacidal assay를 Naama 등의 방법을 다소 변경하여 수행하였다. 적정농도의 시료추출물을 각각 1 \times 10⁷ cells의 RAW 264.7 세포에 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5% CO₂ 공기조건에서 15분간 배양하였다. 배양 후, D-MEM 배지를 이용하여 9 \times 10⁵의 세포밀도로 세포를 1.5 mL의 tube에 분주하고 미리 YPD 배지 (2% peptone, 1% yeast extract, 2% glucose; w/v)를 이용하여 배양해 둔 *Candida albicans*와 2,000 : 1 (RAW 264.7 : *Candida albicans*)의 세포비율로

조정하여 37°C에서 다시 배양하였다. 배양이 끝나면 각 tube에서 0.1 mL를 회수하여 YPD 고체배지에 도말하고 25°C에서 48시간 배양하여 colony를 형성시킨 다음, colony수를 계수하였다.

5. 세포 내 활성산소종 소거활성의 측정

활성산소종에 대한 시료의 소거활성은 대식세포주인 RAW 264.7 세포가 호흡 폭발로 생산하는 활성산소종을 사용한 Boudard 등의 방법에 따라 측정하였다. 멸균 탈이온수로 잘 세척한 100 mg의 zymosan A와 열처리하지 않은 FBA 10 mL를 실온에서 30분간 방치한 다음, HBSS로 3번 세척하여 옅은화된 zymosan A를 제조하였다. RAW 264.7 세포를 HBSS (Hank's balanced salts solution)에 현탁한 다음, 1×10^6 개의 세포를 1.5 mL의 tube에 넣고 암실조건에서 옅은화된 zymosan A와 luminol을 각각 1.1 mg/mL 및 10^{-5} M이 되도록 4°C에서 냉각하면서 혼합하였다. 냉각 후, 진탕교반기로 37°C에서 85 rpm으로 천천히 교반하면서 30분에서 35분간 재차 반응시켰으며, 반응이 종료된 후, luminometer (TD-2020, Turner Biosystems)를 사용하여 포식과정에서 발생된 활성산소종으로 인하여 발생된 luminol의 산화 결과 나타난 발광도를 측정하였다.

6. Polymixin B를 이용한 시료 내 endotoxin 혼입이 NO생산에 미치는 영향 측정

지시세포인 RAW 264.7를 1×10^5 cells 씩 96-well에 접종하였다. 24시간 배양으로 세포가 완전히 well에 부착한 다음, 시료와 동량의 polymyxin B를 넣어 상온에서 10분간 반응한 반응물을 시료농도로 계산하여 100 μ g/mL로 D-MEM에 맞추어 희석한 다음, 상층액을 제거한 RAW 264.7 세포에 200 μ l 씩 넣었다. 37°C, 5% CO₂에서 48시간 배양한 다음, 상층액 100 μ l를 회수하여 동량의 Griess solution을 첨가하여 30분간 방치하였다. 반응이 종료하면 570 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준곡선을 이용한 NO 생산량의 산정은 이미 설명한 바와 같다.

7. 복강대식세포의 추출 및 NO 생산능의 측정

BALB/C 마우스의 복강에 4%의 thioglycolate를 1 mL 주사한 다음, 4일간 사육한다. 마우스르르 경추탈골로 희생시킨 다음, 복막이 드러나게 한 후, PBS를 10 mL 복강에 주사로 주입한다. 주입 후, 보강을 2-4회 마사지 하고 주사기를 이용하여 복강 내액을 회수한다. 회수된 복강 내액을 PBS로 전체 volume을 10 mL로 조절한 다음, trypan blue exclusion assay로 생존세포의 수를 측정한다. 세포수가 계산되면 10% FBS를 함유한 RPMI 1640을 첨가하여 세포밀도를 5×10^5 /mL로 맞춘다음, 37°C에서 5% CO₂가 함유된 포화공기 조건에서 24시간 배양한다. 배양이 끝나면, 상층액을 제거하고 시료를 500 mg/mL 또는 1,000 mg/mL이 되도록 RPMI 1640 배지를 사용하여 조절한 다음, 200 μ l씩 세포에 처리한다. 이때, 조건에 따라 IFN- γ (interferon- γ)를 6시간 미리 처리하기도 한다. 역시 37°C, 5% CO₂의 포화습도의 공기에서 48시간동안 배양하고 나서, 배양 상층액 100 μ l를 회수하여 동량의 Griess solution을 첨가하고 상온에서 30분간 배양한다. 배양이 끝나면 570 nm에서 흡광도를 측정하고 이미 기술한 바와 같이 표준곡선에서 NO의 생성량을 계산한다.

8. 복강대식세포에 대한 증식 유도활성의 측정

이미 기술한 방법에 의거, BALB/C 마우스에서 복강대식세포를 추출하여 trypan blue exclusion assay로 살아있는 세포수를 계수한 다음, 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 복강대식세포의 수를 5×10^4 cells/mL로 조정하고 96-well plate에 200 μ l씩 분주한다. 분주 후, 37°C, 5% CO₂ 포화공기조건에서 24시간 동안 배양하고 나서, 10% FBA가 포함된 RPMI 1640 배지로 희석하여 농도를 각각 100 μ g/mL 및 500 μ g/mL로 조절한 시료를 well에 100 μ l씩 첨가한다. 다시 37°C, 5% CO₂ 포함 포화습도의 공기에서 72시간 배양한 다음, Celltiter 96[®] non-radioactive cell proliferation assay kit를 사용하여 복강대식세포의 증식에 미치는 시료의 효과를 측정하였다.

9. 비장 림프구에 대한 증식 유도활성의 측정

경추탈골로 희생시킨 BALB/C 마우스에서 비장을 적출하여 microtube에서 homogenization을 수행한다. 그 다음, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 cell을 얻은 다음, 5 mL의 RBC lysis buffer (144 mM MH4Cl, 17 mM Tris-Cl, pH 7.2)를 첨가하여 cell을 잘 현탁시킨 후, 상온에서 5-10분간 방치하여 적혈구의 용혈을 유도한다. 이 세포부유액을 원심분리 tube에 미리 넣은 Histopaque-1077의 위에 조심스럽게 중층하고 1,200 rpm에서 30분간 원심분리한다. 원심분리가 끝나면, 상층을 제거한 다음, 경계면의 세포를 회수하여 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 현탁과 원심분리를 2-3회 반복하여 세포를 잘 세척한다. 역시 동일배지를 사용하여 세포를 1×10^6 cells/mL의 밀도로 맞추는 다음, 96-well plate에 100 μ l씩 분주한다. 여기에 Concanavalin A 또는 LPS를 RPMI 1640 배지로 각각 5 μ g/mL, 50 μ g/mL이 되도록 희석하여 세포에 100 μ l씩 첨가하고 측정하는 시료를 동일배지로 100 μ g/mL 및 400 μ g/mL로 희석하여 동일량 분주한다. 그 다음, 37°C, 5% CO₂가 함유된 포화습도의 공기에서 72시간 배양한 다음, Celltiter 96[®] non-radioactive cell proliferation assay kit를 사용하여 비장 림프구의 증식에 미치는 시료의 효과를 측정하였다.

10. RT-PCR 및 ELISA에 의한 cytokine mRNA의 발현 및 단백질 합성 유도

RAW 264.7 세포를 D-MEM 배지를 사용하여 1×10^5 cells/mL로 세포밀도를 맞추어 배양 dish에 접종한 다음, 37°C, 5%의 CO₂가 포함된 포화습도의 공기에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 상층액을 제거하고 시료를 100 μ g/mL의 농도에서 처리하고 조사하고자 하는 각각의 cytokine에 따라 다시 동일한 조건에서 1시간에서부터 48시간까지 배양하였다. 배양이 끝나면 RAW 264.7 세포의 total RNA를 acid phenol-guanidium thiocyanate-chloroform extraction 방법에 의하여 추출하였다. 추출한 1 μ g의 RNA를 주형으로 AMV reverse transcriptase와 oligo(dT)를 사용하여 cDNA를 합성하였으며 다음의 PCR반응의 주형으로 사용하였다. PCR 반응조건은 400 μ M dNTP mix에 2.5 unit의 Taq polymerase를

넣고 94°C에서 5분간 반응한 다음, 94°C에서 30초, 60°C에서 45초, 72°C에서 45초의 순서로 thermal cycler (PTC-200, MJ Research)를 이용하여 수행하였다. PCR로 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에서 전기영동하였고 분획된 DNA band의 intensity를 densitometer (Bio-Rad)로 정량하였다. 실험에 사용된 각 cytokine 유전자를 대표하는 DNA primer의 서열은 아래와 같다.

NOS2	sense	5'-AAGTCAAATCCTACCAAAGTG-3'
	anti-sense	5'-CAATAATACTGGTTGATGAACT-3'
TNF- α	sense	5'-TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC-3'
	anti-sense	5'-GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG-3'
IL-1 β	sense	5'-GAAGCTGTGGCAGCTACCTATGTCT-3'
	anti-sense	5'-CTCTGCTTGTGAGGTGCTGATGTAC-3'
IL-6	sense	5'-TTCCCTACTTCACAAGTC-3'
	anti-sense	5'-ACTAGGTTTGCCGAGTAG-3'
β -actin	sense	5'-CGTCTCCGGAGTCCATCACA-3'
	anti-sense	5'-TCCTTCGTTGCCGGTCCACA-3'

추출물 시료가 대식세포주의 cytokine 생산에 미치는 효과는 다음과 같이 측정하였다. 버섯추출물을 처리한 RAW 264.7 세포를 10% FBS가 함유된 D-MEM 배지로 세포밀도를 5×10^5 cells/mL이 되도록 조절한 다음, 96-well plate에 200 μ l씩 접종하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂가 함유된 포화습도의 공기에서 24시간 배양한 다음, 상층액을 제거하고 동일 배지로 희석하여 농도를 100 μ g/mL로 조절한 시료 200 μ l를 세포에 첨가하고 37°C, 5% CO₂가 함유된 포화습도의 공기에서 다시 24시간 배양한다. 배양이 종료되면, 상층액을 회수하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 측정용 ELISA kit로 각각의 cytokine 분비량을 정량하였다.

11. 항보체 활성 측정

가) 정상인의 혈청(normal human serum, NHS)의 제조

실험실의 건강한 성인의 혈액을 채취하여 실온 및 4℃에서 각각 30분씩 방치하여 응고시킨 후, 원심분리(300 rpm, 20 min)하여 혈청을 분리하여 -70℃에 냉동보관하면서 실험에 사용한다.

나) Alternative pathway(부경로)를 통한 항보체 활성의 측정

시료에 정상인의 혈청과 Mg^{+2} -EGTA-GVB⁻²buffer를 각각 250 μ l씩 혼합하여 37℃에서 30분간 1차 반응시키고 동일 buffer로 10-100배로 연속 희석시킨 후 sensitization되지 않은 토끼 적혈구 (1×10^8 cell/mL)를 첨가하여 37℃에서 30분간 2차 반응시키고 PBS buffer 200 μ l첨가에 의해서 반응을 정지시킨 후, 2,500rpm에서 약 10분간 원심분리하여 얻어진 상정액을 414 nm에서의 흡광도로써 잔존 용혈활성을 측정한다. 부경로를 경유한 항보체 활성은 NHS와 buffer, 증류수만을 반응시킨 대조군에 있어서 부경로의 보체용혈 (50% Alternative Complement Hemolysis, ACH₅₀, %)에 대한 억제율 (Inhibition of 50% Alternative Complement Hemolysis, IACH₅₀, %)으로써 나타내었다.

12. SOS chromotest에 의한 항변이원성 측정법

냉동보관한 *E. coli* PQ 37을 agar plate streaking 하여 배양한 colony를 Luria-bertani (LB)액체배지(1% bactotryptone, 0.5%NaCl, 0.5% yeast extract) 10ml에 접종한다. Cell density가 600 nm에서 흡광도가 약 1.0이 될 때까지 37℃에서 약 12시간 진탕 배양시킨 후, 이 배양액 0.5 mL에 새로운 LB 액체배지 4.5 mL을 첨가하여 37℃에서 약 2시간 진탕 배양시키고, 동일한 액체배지로 4배수 희석한 배양액 0.4 mL에 항변이원성 측정시료 및 변이원성을 첨가하여 2시간 동안 반응시킨다. 여기에 새로운 액체배지를 첨가하여 최종용량이 4 mL가 되도록 한 후, 37℃에서 약 2시간 진탕 배양시킨다. 배양액 0.2 mL을 1.8

mL의 B-buffer(pH 7.0)에 첨가하여 세포막을 터트린 후 β -galactosidase 발색 시약으로 ONPG 0.4 mL를 첨가한 후 37°C에서 약 30분간 반응시킨 후, Na_2CO_3 로 반응을 정지시키고, 420 nm에서 흡광도를 측정하여 β -galactosidase 활성을 측정한다. 한편 세포의 양을 측정하기 위해서 alkaline phosphatase test 활성을 측정한다. 즉, 배양액 0.2 mL에 1.8 mL P-buffer를 넣고 발색시약으로 PNPP를 첨가한 후, 37°C에서 30분간 반응시키고, 반응을 종결시키기 위해 2.5 M HCl을 첨가한 후, 다시 2M Tris aminomethane을 넣어 420 nm에서 흡광도를 측정한다. 항변이원성 값은 β -galactosidase 활성치 및 alkaline phosphatase 활성에 대한 β -galactosidase 비율인 R-factor의 값으로부터 구한다.

13. NK세포 활성화에 의한 종양억제능의 측정

가) NK세포의 분리

6주령의 female BALB/C 마우스에 2.5 mg/mL로 농도를 조절한 각 시료를 정맥주사하였다. 주사 3일 후, 마우스를 경추탈골법으로 희생시킨 다음, 비장을 적출하여 이미 기술한 방법에 의거 비장세포를 분리하였다. 분리된 비장세포를 RBC lysis buffer에 현탁하여 상온에서 10분간 방치함으로써 혼입된 적혈구를 제거하고 나머지세포들을 Lympholyte-M에 중층하여 1,000 g에서 20분간 원심 분리하였다. 원심분리가 끝나면 상층을 제거하고 세포부유층과 Lympholyte-M 층사이의 경계면에 존재하는 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지로 2-3번 세척하여 Lympholyte-M을 완전히 제거하여 NK세포를 조제하였다.

나) 표적 종양세포의 표식

표적세포인 YAC-1 cell은 10% FBS가 함유된 D-MEM에서 계대배양하였다. 실험에 사용할 YAC-1 세포를 동일 배지에서 18시간동안 pre-incubation하였다. 배양 후, HBSS로 충분히 세포를 세척하고 HBSS로 1×10^6 cells/mL로 밀도를

조절한 다음, 여기에 Calcein-AM을 최종농도가 25 μM 이 되도록 첨가하였다. 37°C에서 30분간의 반응으로 표식한 세포를 다시 HBSS로 충분히 세척하여 표식 종양세포를 조제하였다.

다) NK세포에 의한 종양살해 반응

조제된 NK세포와 표식 종양세포의 비율이 20 : 1이 되도록 NK세포수를 조절한 다음 96-well에 분주한다. 자연발생적인 세포살해와 전체적인 세포살해 정도를 측정하기 위하여 100 μl 씩의 HBSS와 lysis buffer (50 mM sodium borate, 0.1% triton-X100, pH 9.0)를 다시 첨가한다. 여기에 표식된 YAC-1 세포를 well 당 1.5×10^4 cells가 되도록 분주하고 1,200 rpm에서 1-2분간 원심분리하여 세포를 완전히 혼합한다. 그 다음, 96-well plate를 37°C incubator에서 3시간 배양한 다음, 2,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 cell과 상층액을 완전히 분리한 다음, 상층액을 취하여 Spectrofluorometer (RF-5301PC, Shimazu)를 사용하여 excitation 485 nm, emission 538 nm에서 종양세포 파괴에 의한 Calcein-AM의 방출량을 측정한다.

14. *In vitro*의 종양세포 증식억제활성의 측정

마우스의 colon carcinoma cell line인 CT-26 cell은 10%의 FBS가 함유된 D-MEM배지에서 계대배양하였다. 배양한 세포를 5×10^4 cells/mL이 되도록 조절하여 200 μl 씩 96-well plate에 접종하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양한 다음, 상층액을 제거하고 시료를 220 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였다. 다시 37°C, 5% CO₂ 조건에서 48시간 배양한 다음, 상층액을 제거하고 최종농도가 0.5 mg/mL이 되도록 D-MEM 배지로 희석한 MTT를 100 μl 씩 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3시간 배양하였다. 배양이 종료되면 상층액을 제거하고 DMSO를 넣고 상온에서 30분간 방치하여 세포 내의 색소를 추출한 다음, 주파장 595 nm, reference 파장 655 nm에서 발색도를 측정하였다.

15. *In vivo*의 종양세포 증식억제활성의 측정

마우스의 colon carcinoma cell line인 CT-26 cell을 HBSS로 5×10^6 cells/mL 이 되도록 현탁한 다음, 6주령의 BALB/C 마우스에 200 썩 피하주사하여 종양 세포를 이식하였다. 이식 후, 시료를 마우스 체중 kg당 10 mg의 비율로 14일간 매일 복가주사하였다. 14일 후, 경추탈골로 마우스를 희생시킨 다음, 발생한 종양의 무게를 측정함과 동시에 이미 기술한 방법에 의거, 복강대식세포를 분리하여 대식세포의 NO 생성량을 측정하였다.

제5절 노루궁뎅이 벚섯 단백다당류 분획 특성

1. 단백다당류의 막분리

분자량에 따라 분리하기 위하여 사용된 한외여과막의 특성을 Table 1에 나타내었다. 침전된 단백다당류에 증류수를 가해 5 °Brix로 희석하여 10 kDa, 150 kDa pore size의 막을 이용하여 10 kDa이하, 10~150kDa, 150 kDa이상의 3가지 분획물을 얻었다.

Table 1. Specification of the membrane module used in this study

	Unit	SKUF10-106	SKUF01-106
Membrane ID/OD	mm Φ	0.8/1.4	0.5/0.8
MWCO	-	10,000	150,000
Membrane pore size	μ m	-	0.01
Membrane area	m ²	0.13	0.16
Material	-	polysulfone	polysulfone

2. 단백질 분획의 품질 특성

가) pH 측정

pH는 추출액 15 mL를 pH meter(MP220, Mettler toledo, USA)로 측정하였다.

나) 산도 측정

적정산도는 추출액 15 mL를 취해 0.1N NaOH용액으로 pH 8.3이 될 때까지 적정하여 소비된 mL수를 lactic acid로 환산하여 나타내었다.

다) 총당 측정

총당 함량은 phenol-sulfate acid법에 따라 측정하였다. 즉 시료 1 mL에 5% 페놀 1 mL와 황산 5 mL를 가하여 발색시킨 다음 20분간 방치 후 spectrophotometer(UV1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총당의 정량은 glucose 표준품을 사용하여 검량선을 작성하여 실시하였다.

라) 단백질 측정

단백질 함량은 Lowry법에 따라 측정하였다. 즉, 시료 0.2 mL에 complex-forming reagent 1 mL를 가하고 10분간 방치 후 Folin reagent 0.1 mL를 넣고 혼합 후 30분간 방치하고 spectrophotometer(UV1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질의 정량은 bovine serum albumin 표준품을 사용하여 검량선을 작성하여 실시하였다.

마) 총 페놀성 물질 측정

총 페놀성 물질의 함량은 Folin-Denis법에 따라 측정하였다. 즉 시료 5 mL를 취하여 Folin-Denis reagent 5 mL를 가하고 3분간 정치한 다음 10% Na₂CO₃

용액 5mL를 가하였다. 이 혼합액을 1시간 동안 정치한 후 spectrophotometer (UV1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였고, gallic acid 표준품으로 검량선을 작성하여 정량하였다.

바) DPPH 유리기 소거능 측정

Diphenyl picryl hydrazyl(DPPH) radical scavenging activity는 Blois의 방법으로 측정하였다. 즉, 시료 0.2 mL를 에탄올에 용해한 4×10^{-4} M DPPH 용액 0.8 mL에 에탄올 2.8 mL를 가하여 10초간 강하게 진탕하고 10분간 정치한 후에 spectrophotometer(UV1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거활성은 다음 식으로 계산하였다. DPPH radical scavenging activity = (1-시료의 흡광도/대조구의 흡광도)×100

사) 색도 측정

색도는 시료 0.5 g을 색차계(CR 200, Minolta Co., Japan)를 이용하여 L(lightness), a(redness), b(yellowness), Hue angle 값으로 나타내었다.

3. SOS chromotest에 의한 항변이원성 측정

냉동보관한 *E. coli* PQ 37을 agar plate streaking 하여 배양한 1colony를 Luria-bertani (LB)액체배지(1% bactopectone, 0.5%NaCl, 0.5% Yeast extract) 10ml에 접종한다. Cell density가 600nm에서 흡광도가 약 1.0이 될 때까지 37℃에서 약 12시간 진탕 배양시킨 후, 이 배양액 0.5 mL에 새로운 LB 액체배지 4.5 mL을 첨가하여 37℃에서 약 2시간 진탕 배양시키고, 동일한 액체배지로 4 배수 희석한 배양액 0.4 mL에 항변이원성 측정시료 및 변이원성을 첨가하여 2시간 동안 반응시킨다. 여기에 새로운 액체배지를 첨가하여 최종용량이 4 mL가 되도록 한 후, 37℃에서 약 2시간 진탕 배양시킨다. 배양액 0.2 mL을 1.8 mL의 B-buffer(pH 7.0)에 첨가하여 세포막을 터트린 후 β -galatosisidase 발색 시약으로 ONPG 0.4 mL를 첨가한 후 37℃에서 약 30분간 반응시킨 후, Na_2CO_3

로 반응을 정지시키고, 420 nm에서 흡광도를 측정하여 β -galactosidase 활성을 측정한다. 한편 세포의 양을 측정하기 위해서 alkaline phosphatase test 활성을 측정한다. 즉, 배양액 0.2 mL에 1.8 mL P-buffer를 넣고 발색시약으로 PNPP를 첨가한 후, 37°C에서 30분간 반응시키고, 반응을 종결시키기 위해 2.5M HCl을 첨가한 후, 다시 2M Tris aminomethane을 넣어 420 nm에서 흡광도를 측정한다. 항변이원성 값은 β -galactosidase 활성치 및 alkaline phosphatase 활성에 대한 β -galactosidase 비율인 R-factor의 값으로부터 구한다.

4. 항보체 활성 측정

가) 정상인의 혈청(normal human serum, NHS)의 제조

실험실의 건강한 성인의 혈액을 채취하여 실온 및 4°C에서 각각 30분씩 방치하여 응고시킨 후, 원심분리(300 rpm, 20min)하여 혈청을 분리하여 -70°C에 냉동보관하면서 실험에 사용한다.

나) Alternative pathway(부경로)를 통한 항보체 활성의 측정

시료에 정상인의 혈청과 Mg^{+2} -EGTA-GVB²buffer를 각각 250 μ l씩 혼합하여 37°C에서 30분간 1차 반응시키고 동일 buffer로 10-100배로 연속 희석시킨 후 감작화 되지 않은 토끼 적혈구(1×10^8 cell/mL)를 첨가하여 37°C에서 30분간 2차 반응시키고 PBS buffer 200 μ l 첨가에 의해서 반응을 정지시킨 후, 2500 rpm에서 약 10분간 원심분리하여 얻어진 상정액을 414 nm에서의 흡광도로써 잔존 용혈활성을 측정한다. 부경로를 경유한 항보체 활성은 NHS와 buffer, 증류수 만을 반응시킨 대조군의 부경로 보체 용혈(50% alternative complement hemolysis, ACH₅₀, %)에 대한 저지율(inhibition of 50% alternative complement hemolysis, IACH₅₀, %)으로써 나타내었다.

제6절 가공품의 제조와 품질특성

1. 분무건조

노루궁뎅이 버섯 분말은 노루궁뎅이 버섯 추출액 300 mL에 부형제로 10% cyclodextrin 100mL을 혼합하여 그 혼합액을 분무건조기(B-191, Buchi inc., Swiss)를 이용하여 분말화하였다. 분무건조기를 이용하여 제조한 노루궁뎅이 버섯 분말을 capsule에 넣어 제조하였다.

2. 과립의 제조

노루궁뎅이 버섯 추출액(8°Bx)을 농축시킨 농축액(12°Bx) 50 mL에 옥수수전분 150 g, 유당 100 g, 포도당 50 g을 혼합한 후 전분 paste를 가하여 만든 반죽을 과립기(BE230, Hanyoung, Korea)를 통과시켜 50℃에서 2시간 건조하여 과립을 제조하였다.

3. 타블렛의 제조

노루궁뎅이 버섯 과립 50 g에 활택제로 stearic magnesium 1.5 g 첨가한 후, 타정기에 0.5 g씩을 넣어 유압프레스(MH-12, Masada Seisakusho Co. LTD., Japan)를 이용하여 200 kg/cm²의 압력으로 1분간 성형하여 타블렛을 제조하였다.

4. 가공제품의 품질 특성

가) 수분측정

수분함량은 적외선 수분측정기(Moisture analyzer, HG53, Mettler Toledo, USA)를 이용하여 측정하였다.

나) 총당측정

총당 함량은 phenol-sulfate acid법에 따라 측정하였다. 즉 시료 1 mL에 5%

페놀 1 mL와 황산 5 mL를 가하여 발색시킨 다음 20분간 방치 후 spectrophotometer (UV1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총당의 정량은 glucose 표준품을 사용하여 검량선을 작성하여 실시하였다.

다) 단백질 측정

단백질 함량은 Lowry법에 따라 측정하였다. 즉, 시료 0.2 mL에 complex-forming reagent 1 mL를 가하고 10분간 방치 후 Folin reagent 0.1 mL를 넣고 혼합 후 30분간 방치하고 spectrophotometer(UV1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질의 정량은 bovine serum albumin 표준품을 사용하여 검량선을 작성하여 실시하였다.

라) 색도 측정

색도는 시료 0.5 g을 색차계(CR 200, Minolta Co., Japan)를 이용하여 L(lightness), a(redness), b(yellowness), hue angle 값으로 나타내었다.

마) 수분결합지수 측정

수분결합지수는 시료 0.5 g을 20℃의 증류수 20 mL에서 1분간 용해시키고 4,000 rpm에서 30분간 원심분리(5810 R, Eppendorf, Germany)하여 남은 고형분의 양을 측정하여 나타내었다.

바) 흡습성 측정

흡습성은 시료 0.5 g을 증류수를 채운 데시케이터에 넣고 1시간 간격으로 15 시간 동안 흡습에 따른 무게 증가를 측정하여 나타내었다.

II. 결과 및 고찰

제1절 추출방법에 따른 단백다당류의 특성

1. 노루궁뎅이버섯의 일반성분 및 당 조성

노루궁뎅이버섯 분말의 일반성분 및 당 조성은 Table 2과 3에 나타내었다. 탄수화물은 76.21%, 조단백질은 7.7%, 조지방과 조회분은 2.75, 4.09%이었다. 구성당을 분석한 결과는 fructose, glucose, fructose로 구성되어 있었으며, 당 조성은 각각 2.91, 51.44, 35.32%이었고, sucrose와 maltose는 나타나지 않았다.

Table 2. Proximate composition of *Hericium erinaceus*

(unit : %)

	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude ash	Carbohydrate
Content	9.25	7.70	2.75	4.09	76.21

Table 3. Monosaccharide composition of crude protein bound polysaccharide in *Hericium erinaceus*

(mg%, dry basis)

Monosaccharide composition	Content
Glucose	51.44
Fructose	35.32
Sucrose	-
Fucose	2.91
Maltose	-

2. 추출방법에 따른 단백다당류의 성분 변화

가) 추출수율, 당 및 단백질 함량

추출방법에 따른 단백다당류의 추출수율, 당 및 단백질 함량을 Table 4에 나타내었다. 그 결과 단백다당류 함량은 염 처리 추출공정에서 대체적으로 높은 수율을 나타내었으며 마이크로웨이브추출에서는 비교적 적게 추출되었으나 추출조건에 따라 그 차이가 크게 나타났다. 염 처리 추출공정을 한 경우 염의 농도가 증가함에 따라 단백다당류 함량은 증가하였으며 3% 농도에서 24.69%로 가장 많이 추출되었다. 당 함량은 비교적 열수추출의 경우 높게 나타났으며 단백질 함량은 마이크로웨이브의 추출조건에서 높게 나타났다.

나) 총 폴리페놀 함량, 전자공여작용, 갈색도 및 β -glucan 함량

추출방법에 따른 총 폴리페놀 함량, 전자공여작용, 갈색도 및 β -glucan 함량을 Table 5에 나타내었다. 그 결과 총 폴리페놀 함량은 산 처리 추출 공정을 제외한 열수, 마이크로웨이브, 염 처리 추출 공정에서는 비슷한 경향을 나타내었으며 마이크로웨이브 추출 공정에서는 추출시간과 에너지가 증가함에 따라 총 폴리페놀 함량은 증가하였다. 전자공여작용은 열수 추출 시 가장 높은 효율을 나타낸 반면 염 처리 추출에서는 가장 낮게 나타났다. 마이크로웨이브 추출 시에는 추출 시간이 증가함에 따라 전자공여작용 또한 증가하다가 5 min에서 최대값을 나타낸 후 감소하였으며 산 처리 추출 시에는 산 농도가 증가함에 따라 전자공여작용은 낮게 나타났다. 갈색도는 열수 추출 공정에서 현저하게 낮은 값을 보이고, 그 외 공정에서는 비슷한 경향을 나타내었다. β -glucan 함량은 마이크로웨이브 추출공정에서 비교적 높게 나타났는데 이 공정은 단 시간의 추출로 인해 추출효율, 경제성이 뛰어난 새로운 추출방법으로 주목받고 있다.

Table 4. Yield, sugar and protein content of protein bound polysaccharide (PBP) by various extraction methods

Samp les	Extraction methods		PBP yield(%)	Sugar(%)	Protein(%)
1	Hot water	100°C, 30 min	6.17	65.55	12.59
2		1 hr	6.25	83.33	14.00
3		2 hr	8.31	81.11	11.57
4		3 hr	4.90	61.10	8.80
5	Microwave	80 W, 1 min	3.27	41.83	6.85
6		3 min	3.24	61.66	15.99
7		5 min	3.41	38.25	8.64
8		7 min	3.02	35.00	14.94
9		9 min	3.79	25.50	15.35
10		40 W, 3 min	2.45	31.66	8.96
11		60 W	1.09	51.83	6.77
12		80 W	4.44	61.66	16.00
13		100 W	2.87	27.25	11.81
14		120 W	2.95	22.33	19.41
15	HCl	0.5%	7.04	58.33	1.85
16		1%	10.82	61.67	6.97
17		3%	6.14	75.00	3.19
18	NaOH	0.5%	8.15	51.66	6.12
19		1%	14.94	62.23	1.36
20		3%	24.69	41.34	0.75

Table 5. Total phenolic content, electron donating ability, browning color and β -glucan of protein bound polysaccharide by various extraction methods

Samp les	Extraction methods		Total phenolics (%)	Electron donating ability(%)	Browning color (%)	β -glucan (%)
1	Hot water	100°C, 30 min	17.78	6.71	0.004	28.77
2		1 hr	19.40	8.64	0.006	38.21
3		2 hr	22.37	7.28	0.003	23.59
4		3 hr	18.15	8.40	0.005	34.45
5	Microwave	80 W, 1 min	19.98	6.41	0.083	23.21
6		3 min	18.60	5.70	0.089	39.47
7		5 min	19.40	7.87	0.092	30.56
8		7 min	19.32	7.36	0.085	37.44
9		9 min	20.78	7.19	0.098	38.99
10		40 W, 3 min	17.13	5.36	0.091	35.55
11		60 W	18.58	4.88	0.083	21.44
12		80 W	18.60	5.70	0.089	40.18
13		100 W	19.62	5.19	0.082	24.49
14		120 W	18.65	5.73	0.093	42.08
15	HCl	0.5%	14.58	7.66	0.092	4.99
16		1%	14.87	6.21	0.082	20.78
17		3%	16.03	6.10	0.091	11.49
18	NaOH	0.5%	21.08	5.73	0.085	18.83
19		1%	15.88	3.02	0.083	4.28
20		3%	16.40	5.22	0.094	2.99

제2절 추출조건에 따른 노루궁뎅이 버섯 추출물의 항암 및 면역조절 활성

1. 노루궁뎅이 버섯 추출물의 *in vitro* 항암 및 면역조절 활성

가) 추출분획별 NO 생산 유도활성

담자균의 단백질당류는 내재면역계구성세포의 활성화를 통하여 생체의 면역력을 증강시키는 것으로 알려져 있기 때문에, 생체에 침입한 미생물을 직접 살해할 뿐 아니라 적응면역계의 작동을 유도하는 시발점으로서 작용하는 내재면역계의 세포인 대식세포의 활성화를 지표로 하여 노루궁뎅이버섯 조다당추출분획이 가지는 면역증강효과를 평가하였다. 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7세포를 지시세포로 사용하여 각 추출조건 별 분획이 대식세포의 활성화로 생성되는 라디칼의 하나로서, 혈관확장 등의 감염초기 염증반응의 유도 및 NK 세포 활성화를 통한 암세포 제거에 깊이 관여하는 라디칼인 nitric oxide (NO)의 생성을 유도할 수 있는지 여부를 측정하였다. 실험 결과, Table 6에 정리한 것처럼 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 시료농도에서 microwave를 사용하여 60 W에서 3분간 추출한 12번 분획이 가장 NO 생산 유도능이 높았으며, NO의 생산유도 활성은 양성대조구에서 사용한 그람음성세균의 대표적인 대식세포 활성화물질인 LPS에 의한 유도활성의 71%에 달하였다. 열수에서 2시간 추출한 4번 분획도 거의 12번 분획과 같은 수준의 NO의 생산유도 활성을 보였으나, 저농도의 시료조건 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서도 12번 분획은 뚜렷하게 NO 생산을 유도하는 것으로 보아, 4번 분획보다 12번 분획의 활성이 높다는 것을 확인할 수 있었다. *Phellius linteus*의 산성 단백질당이 대식세포의 활성화를 통한 종양의 살해 및 수지상세포의 기능적 성숙을 강하게 유도한다는 보고와 단백질당류의 회수율이 상대적으로 높은 산, 알칼리 추출분획의 NO 생성 유도활성이 낮게 측정된 본 실험의 결과는 상반되는 면이 있으나, 이것은 산, 알칼리 추출시 마이크로웨이브 추

Table 6. Induction of NO production by the extracts from *Hericium erinaceus* in RAW264.7 cells

Fraction No.	NO production (µM of nitrite)		Fraction No.	NO production (µM of nitrite)	
	10 µg/mL	100 µg/mL		10 µg/mL	100 µg/mL
Control (-LPS)	0.36±0.000		Control (+LPS#)	24.13±0.353 ^a	
1	0.24±0.060 ^{kl}	0.32±0.070 ^{hij}	11	0.80±0.070 ^{cd}	0.86±0.092 ^{def}
2	0.24±0.060 ^{kl}	0.38±0.092 ^{hi}	12	3.37±0.319 ^b	17.14±0.343 ^b
3	0.34±0.035 ^{ijk}	0.44±0.092 ^{ghi}	13	0.52±0.070 ^{fghi}	0.70±0.035 ^{efg}
4	0.62±0.092 ^{defgh}	16.92±0.343 ^b	14	0.76±0.035 ^{de}	0.70±0.070 ^{efg}
5	0.42±0.000 ^{hijk}	2.75±0.368 ^c	15	0.98±0.035 ^c	0.86±0.139 ^{def}
6	0.64±0.092 ^{defg}	0.68±0.035 ^{efg}	16	-0.09±0.035 ^m	0.28±0.092 ^{hij}
7	0.82±0.035 ^{cd}	1.10±0.125 ^d	17	-0.09±0.070 ^m	0.01±0.035 ^j
8	0.56±0.070 ^{efgh}	0.94±0.035 ^{de}	18	0.03±0.092 ^{lm}	0.14±0.035 ^{ij}
9	0.50±0.035 ^{ghij}	0.94±0.070 ^{de}	19	0.07±0.035 ^{lm}	0.01±0.035 ^j
10	0.72±0.060 ^{def}	0.72±0.000 ^{efg}	20	0.30±0.060 ^{jk}	0.58±0.092 ^{fgh}

at a concentration of 100 ng/mL.

Values not sharing common letter in column were significantly different at $P < 0.05$.

출방법에 비해 불용성의 단백다당 관련물질이 많이 추출되어 나온 것이 때문으로 볼 수 있겠다.

나) 추출분획별 활성산소종 소거활성

대식세포의 포식작용과 더불어 지속적이고도 대량으로 생성되는 superoxide anion 등의 활성산소종 (ROS, reactive oxygen species)은 그 자체로 세포나 조직의 손상을 일으킬 뿐 아니라 동일한 세포에서 생성되는 NO와 반응하여 보다 독성이 강한 peroxynitrite를 생성하며, 이것이 DNA를 비롯한 세포 내 고분자 화합물의 산화적 손상 및 조절단백질의 nitration에 의한 불활성화를 유도하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 ROS를 소거함으로써 peroxynitrite의 이차적 생성을 방지하는 것이 가능할 것으로 보기 때문에, 노루궁뎅이버섯의 각 단백다당류 분획이 가지는 ROS 소거활성을 재료 및 방법에서 기술한 대로 읍손화된 zymosan A를 처리한 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 이용하여 측정하였다 (Table 7). 실험 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 시료를 첨가했을 경우, 실험의 대조구인 1번 분획과 6번 분획을 제외한 모든 분획에서 90% 이상의 ROS 소거활성이 측정되었다. 그러나 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 시료처리 조건에서는 각 분획 별 ROS 소거활성의 차이가 뚜렷하게 나타났다. 특히 4번 분획(2시간 열수추출)과 5번 분획(3시간 열수추출), 12번 분획(60 W 3분간 microwave 추출), 그리고 15번 분획(0.5% HCl 추출)이 91% 이상의 소거활성을 보였으며, 4번, 5번, 15번 분획의 소거활성이 12번 분획보다 약간 높게 나타났다. 이상의 실험을 통하여 12번 분획에는 대식세포의 NO 생산을 효과적으로 유도하는 반면, ROS를 적극적으로 소거하는 물질이 포함되어 있을 가능성이 강하게 시사되었다.

Table 7. Scavenging ability of the extracts from *Hericium erinaceus* to ROSs produced by optionized zymosan in RAW264.7 cells

Fraction No.	% of scavenging		Fraction No.	% of scavenging	
	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$		10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Control (-LPS)	0.00 ⁱ	0.00 ^c	Control (+LPS [#])	-29.89±2.365 ^j	-29.89±2.365 ^f
1	-6.74±4.774 ⁱ	38.68±2.361 ^d	11	60.74±4.913 ^{fg}	93.74±2.562 ^a
2	85.04±1.585 ^{bc}	97.15±3.137 ^a	12	91.36±2.444 ^{ab}	94.00±1.940 ^a
3	88.43±1.585 ^{abc}	91.46±2.424 ^a	13	53.58±8.179 ^g	96.53±2.394 ^a
4	97.43±0.340 ^a	98.06±1.164 ^a	14	33.98±5.968 ^h	92.66±4.002 ^a
5	96.76±1.000 ^a	97.80±1.469 ^a	15	98.24±0.872 ^a	94.45±2.188 ^a
6	-3.81±10.330 ⁱ	33.33±4.988 ^c	16	63.71±4.586 ^f	85.55±2.811 ^{ab}
7	1.09±10.411 ⁱ	83.74±2.835 ^{ab}	17	80.84±4.506 ^{cd}	95.60±0.565 ^a
8	69.04±3.155 ^{ef}	90.87±5.011 ^a	18	60.39±2.816 ^{fg}	95.69±0.964 ^a
9	74.14±3.720 ^d	96.24±0.944 ^a	19	65.20±1.034 ^{ef}	95.82±2.751 ^a
10	-4.531±0.625 ⁱ	97.73±0.835 ^a	20	61.89±1.417 ^{fg}	96.92±0.794 ^a

at a concentration of 100 ng/mL.

Values not sharing common letter in column were significantly different at $P < 0.05$.

다) 추출분획별 *C. albicans* 포식활성

대식세포의 활성화 지표로서 감염 미생물에 대한 포식작용(phagocytosis)의 유도는 매우 중요하다. 대식세포의 포식활성을 간편하게 측정하는 것으로는 optionization된 효모 세포벽 구성성분인 zymosan을 대식세포가 포식하는 과정에서 발생한 ROS를 정량함으로써 측정하는 방법이 있으나, 포식작용과 ROS의 생성은 별개의 반응일 뿐 아니라, 이미 수행한 실험의 결과와 같이 시료가 강력한 항산화성 화합물이거나 포식작용에 필요한 대식세포 항원수용체와 연관된 세포 신호전달경로의 저해제인 경우, 포식작용과 관계없이 ROS의 생산이 억제되는 경우가 발생할 가능성이 높다. 따라서 추출분획이 대식세포의 포식작용에 미치는 정확한 효과를 평가하기 위하여 지시세포인 RAW 264.7 세포가 인체감염 효모로 알려진 *Candida albicans*를 직접 포식한 정도를 포식반응 후 남아있는 효모의 수를 colony assay로 측정하였다. Table 8에서 보듯이 14번 분획의 효모살해능이 33.8%로 가장 높았고 그 다음으로 12번 분획 (29.8%) > 7번 분획 (28.3%) > 13번 분획(약 26.6%)과 6번 분획(26.0%)의 순서로 활성이 낮아졌다. 이 결과는 microwave 추출이 노루궁뎅이버섯에서 대식세포의 포식능력을 유도하는 물질의 추출에 매우 유효한 방법이라는 사실을 보여주었다.

Table 8. Candidacidal assay for determining phagocytotic activity of the extracts from *Hericium erinaceus* in RAW264.7 cells

Fraction No.	% of cell killing at 100 $\mu\text{g/mL}$	Fraction No.	% of cell killing at 100 $\mu\text{g/mL}$
Control(-LPS)	16.32 \pm 3.997 ^{fg^{hi}}	Control(+LPS [#])	26.21 \pm 2.261 ^{bc}
1	14.94 \pm 2.446 ^{hi}	11	18.97 \pm 1.724 ^{defgh}
2	22.70 \pm 2.737 ^{cde}	12	29.77 \pm 2.542 ^{ab}
3	22.30 \pm 1.555 ^{cde}	13	26.55 \pm 3.396 ^{bc}
4	20.69 \pm 3.605 ^{def}	14	33.79 \pm 2.946 ^a
5	21.03 \pm 5.207 ^{de}	15	11.84 \pm 2.079 ⁱ
6	25.98 \pm 1.899 ^{bc}	16	23.33 \pm 1.211 ^{cd}
7	28.28 \pm 1.920 ^b	17	15.86 \pm 1.379 ^{ghi}
8	18.85 \pm 1.394 ^{defgh}	18	20.69 \pm 1.034 ^{def}
9	18.51 \pm 2.107 ^{efgh}	19	22.87 \pm 1.961 ^{cde}
10	11.95 \pm 1.555 ⁱ	20	19.89 \pm 1.736 ^{defg}

at a concentration of 100 ng/mL.

Values not sharing common letter in column were significantly different at $P < 0.05$.

라) 추출분획별 endotoxin 혼입여부의 측정

이상의 실험에서 각 추출조건별 추출분획의 생리활성을 살펴 볼 때, 대식세포의 NO 생산을 유도하는 효과는 4번과 12번 추출분획이 , 그리고 ROS의 소거 효과는 4번, 5번, 12번 및 15번 추출분획이 높았고, 대식세포의 포식작용에 대한 증진효과는 7번, 12번 및 14번 추출분획이 우수하다는 결론을 얻었다. 그러나 이와 같은 대식세포에 대한 기능항진 효과가 흔히 천연물 추출물에서 나타나기 쉬운 추출물 안에 혼입된 LPS와 같은 endotoxin 유사물질에 의하여 나타날 가능성을 배제할 수 없기 때문에, endotoxin을 분해한다고 알려진 polymixin B을 각 추출분획에 처리하였을 때, 처리된 추출분획의 NO 생성유도 활성이 어떻게 변하는지를 RAW 264.7 세포를 지시세포로 측정하였다. 측정 결과 (Table 9), 4번 추출분획과 12번 추출분획이 가지는 RAW 264.7 세포에 대한 NO 생성 유도 활성은 polymixin B 처리에 의해서 변화되지 않는다는 사실을 알았다. 따라서 4번과 12번 추출분획이 나타내는 대식세포 활성화 유도능은 단순히 추출물에 혼입된 endotoxin에 의한 것이 아니라 노루궁뎅이버섯의 단백다당류에 의한 활성임을 알 수 있었다.

마) 추출분획별 세포독성의 측정

이상 기술한 실험에서 나타난 억제 및 증진효과가 노루궁뎅이버섯 추출분획을 첨가함으로써 발생하는 지시세포의 사멸이나 증식에 의한 것인지 여부를 알아보기 위하여 지시세포인 RAW 264.7에 각 추출분획을 처리한 결과 나타나는 세포의 생존율을 MTT assay에 의하여 측정하였다. Table 10에 정리된 것처럼, 9번 분획을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리했을 때 약 85%의 생존율이 나타난 것을 제외하고는 모든 분획에서 90% 이상의 생존율을 보였다. 또한 2번 및 4번 분획의 처리로 약간의 세포증식이 일어난 것을 제외하고는 특별히 추출분획이 RAW 264.7 세포의 증식을 촉진한 증거를 얻을 수 없었다.

Table 9. NO production ability of the polymixin B (PMB)-pretreated extracts from *Hericium erinaceus* in RAW264.7 cells

Fraction No.	NO production (μM of nitrite)		Fraction No.	NO production (μM of nitrite)	
	10 μg/mL	100 μg/mL		10 μg/mL	100 μg/mL
Control (-LPS)	0.216±0.000		Control (-LPS)	0.216±0.000	
Control (+LPS [#])	40.254±1.235 ^a		Control (+LPS [#])	40.254±1.235 ^a	
Control (LPS+ PMB*)	24.381±0.849		Control (LPS+ PMB*)	24.381±0.849	
1+PMB	0.213±0.030	0.275±0.052	11+PMB	0.650±0.033	0.695±0.031
2+PMB	0.244±0.047	0.311±0.059	12+PMB	4.409±0.354	17.572±0.530
3+PMB	0.275±0.010	0.350±0.070	13+PMB	0.416±0.028	0.707±0.070
4+PMB	0.752±0.044	15.392±0.533	14+PMB	0.488±0.021	0.733±0.058
5+PMB	0.455±0.082	1.533±0.100	15+PMB	0.619±0.078	0.930±0.045
6+PMB	0.567±0.071	0.697±0.020	16+PMB	0.222±0.013	0.356±0.030
7+PMB	0.755±0.069	0.850±0.038	17+PMB	0.252±0.005	0.305±0.011
8+PMB	0.444±0.024	0.730±0.015	18+PMB	0.197±0.083	0.175±0.019
9+PMB	0.205±0.035	0.773±0.039	19+PMB	0.034±0.002	0.283±0.046
10+PMB	0.406±0.026	0.630±0.013	20+PMB	0.203±0.043	0.313±0.044

at a concentration of 100 ng/mL.

Values not sharing common letter in column were significantly different at $P < 0.05$

Table 10. Cell cytotoxicity of the extracts from *Hericium erinaceus* in RAW264.7 cells

Fraction No.	Cell viability(%)		Fraction No.	Cell viability(%)	
	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$		10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Control (-LPS)	100.00 \pm 3.883		Control (+LPS#)	99.31 \pm 6.786	
1	104.95 \pm 8.309	98.10 \pm 9.351	11	103.74 \pm 2.200	91.10 \pm 4.759
2	105.06 \pm 3.989	124.38 \pm 4.738	12	94.25 \pm 3.267	109.27 \pm 3.135
3	96.86 \pm 8.250	114.80 \pm 3.585	13	102.38 \pm 4.185	101.19 \pm 6.951
4	99.18 \pm 3.211	120.79 \pm 9.537	14	103.44 \pm 4.448	96.63 \pm 0.858
5	88.22 \pm 11.396	111.76 \pm 6.606	15	100.22 \pm 6.481	91.07 \pm 10.067
6	105.92 \pm 5.866	96.54 \pm 1.985	16	101.04 \pm 8.049	97.30 \pm 2.254
7	103.54 \pm 7.821	96.61 \pm 5.426	17	98.51 \pm 4.247	100.63 \pm 0.846
8	90.40 \pm 5.022	116.77 \pm 9.133	18	104.36 \pm 9.733	104.19 \pm 5.996
9	99.03 \pm 4.601	85.32 \pm 5.603	19	100.35 \pm 16.981	93.15 \pm 2.544
10	102.57 \pm 8.572	102.22 \pm 3.135	20	103.63 \pm 12.173	90.60 \pm 4.741

at a concentration of 100 ng/mL.

Values not sharing common letter in column were significantly different at $P < 0.05$.

바) 추출분획별 항보체 활성화

보체계(Complement system)는 체액성 면역계를 담당하는 인자로서 항원 침입 시 비특이적으로 활성화되어 세균이나 바이러스 등의 표적세포를 분해하고 대식세포와 림프구의 활성화를 유도하는 혈중 순환 단백질로 구성되어 있다. 특히 이들은 숙주가 면역화 되기 이전에 즉각적으로 반응한다는 점에서 중요한 생체 방어 기전인 것이다. 최근에 이러한 보체계를 활성화 하는 물질(혹은 항보체 활성화 물질)들이 생체의 면역 부전 상태를 개선하거나 치료하는 면역 요법제로 개발되어 질병의 예방과 치료에 효과적으로 이용될 수 있을 가능성이 제시되고 있으며, 항보체 활성화 물질이 생체 내의 대식세포 등의 면역세포를 자극하여 cytokine의 분비를 유도하고 암치료에 도움이 될 수 있다는 가능성이 제시되고 있다. Table 11에서 알 수 있듯이 2번 추출분획에서 가장 높게 관찰되었고, 7번, 17번 분획의 활성이 그 다음으로 높았다. 그러나 대식세포의 활성화 유도 능력이 높았던 4번이나 12번 추출분획의 활성은 각각 11%와 13%로 부경로에 의한 보체활성화를 억제하는 능력이 낮다는 사실을 확인할 수 있어, 이들 추출분획들이 내재면역계에 있어서 세균과 같은 감염체에 대한 주요한 방어기작 중의 하나인 보체활성화 기작을 억제하지 않는다는 것을 확인하였다.

Table 11. Anti-complementary activity of the extracts from *Hericium erinaceus* via alternative complement pathway

Fraction	anti-complementary activity		Fraction	anti-complementary activity	
	OD at 412 nm	Inhibition of TCH ₅₀ (%)		OD at 412 nm	Inhibition of TCH ₅₀ (%)
Control	1.226	0.0	Control	1.226	0.0
1	1.007	17.8	11	1.055	14.0
2	0.838	31.6	12	1.063	13.3
3	1.071	12.6	13	1.056	13.9
4	1.089	11.2	14	1.023	16.6
5	1.090	11.1	15	1.090	11.1
6	1.109	9.54	16	1.019	16.9
7	0.908	20.1	17	0.914	25.4
8	1.087	11.3	18	1.048	14.5
9	1.048	14.5	19	1.013	17.3
10	1.097	10.5	20	1.019	16.9

사) 항변이원성 검정

항암 활성이 있는 노루궁뎅이 버섯 다당 분획의 추출 조건 설정을 위하여 우선 추출물 시료들의 항변이원성을 신속하고 간편한 방법인 SOS chromotest를 사용하여 screening 하였다. 발암의 과정은 대체로 initiation, promotion, progression의 3단계로 진행되며, 변이원들은 이러한 발암과정 중의 initiator로 작용하는 것이다. SOS chromotest에 사용하는 지시균주인 *Escherichia coli* PQ 37은 일련의 SOS 유전자 사이에 *sfiA:lacZ*의 융합 유전자를 삽입시킨 균주로 항생제인 ampicillin에 대한 내성이 있으며, 돌연변이 유발물질의 균체내 흡수가 용이하며, 세포 DNA가 손상되면 이 손상이 수복되기까지의 일련의 반응인 SOS 반응이 증폭되게 고안된 것으로 이때 발현되는 β -galactosidase 활성의 크기로서 변이원성의 정도를 측정할 수 있는 것이다. Table 12에 나타내고 있는 바와 같이 추출물 별로 처리 농도에 따라서 항변이원성에는 차이가 있었으며, 시료를 4 mg 처리한 조건에서 19번과 20번 추출분획에서 각각 37%와 41%의 돌연변이에 대한 억제활성을 보이고 있어서, 장차 포유동물의 암세포에 대한 살해능도 기대되는 분획이라 할 수 있겠다. 이미 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 밝혀진 바와 같이 노루궁뎅이 버섯 다당 추출 분획들은 배양 동물세포주에 세포독성을 가지지 않음이 발견되었다. 그러나 원핵세포는 진핵세포와 세포생리에서 다소 차이가 있기 때문에 본 실험에서 나타난 항돌연변이 활성의 차이가 시료에 의한 지시세포의 세포살해 활성에 기인하였을 가능성을 차단하기 위하여 DNA의 손상 유무에 관계없이 발현되는 효소인 alkaline phosphatase의 활성을 측정함으로써 배양액 내 세균세포의 성장에 노루궁뎅이 버섯 추출물이 미친 영향을 측정하였다. 그 결과, Table 13에 나타내고 있는 바와 같이 노루궁뎅이 버섯 다당분획 추출물들은 고농도의 경우에서 2번과 4번 분획과 같이 세포의 성장을 약간 저해(약 15%억제) 하는 것도 있었지만, 낮은 농도에서는 모든 시료분획이 오히려 지시세포인 *E. coli* PQ 37 균주의 성장을 촉진시키고 있음을 알 수 있었다. 따라서 19번 및 20번 추출분획에서 보인 항돌연변이 활성은 시료가 지시세포의 성장에 영향을 주었기 때문에 나타난 인위적인 현상이 아님을 알 수 있었다.

Table 12. Inhibitory activity of each extracts from *Hericium erinaceus* on Mitomycin C-induced mutagenesis in *E. coli* PQ 37 using as an indicator cell

Samples	0.4 μ g/tube				2 mg/tube			
	β -Gal ¹ (units)	Alkaline ² (units)	Antimutagenicity		β -Gal ¹ (units)	Alkaline ² (units)	Antimutagenicity	
			R factor	%			R factor	%
-MMC	3.95	45.15	-	-	9.93	52.78	-	-
+MMC	27.12	19.33	1.40	0	92.40	25.62	3.61	0
1	27.55	27.42	1.00	28.6	92.13	23.40	3.94	-9.1
2	29.47	24.43	1.21	13.6	78.37	22.65	3.46	4.2
3	32.22	23.80	1.36	2.8	90.02	23.27	3.87	-7.2
4	26.92	22.77	1.18	15.7	83.23	21.70	3.84	-6.4
5	35.27	25.23	1.40	0	80.60	23.28	3.47	3.9
6	27.68	20.22	1.37	2.1	81.83	24.03	3.41	5.5
7	32.95	26.22	1.26	10.0	83.23	24.85	3.35	7.2
8	32.68	26.42	1.24	11.4	83.37	23.48	3.55	1.7
9	35.55	23.40	1.52	-8.0	82.93	23.93	3.47	3.9
10	31.85	24.65	1.29	7.9	81.43	24.02	3.39	6.1
11	30.18	26.27	1.15	17.9	73.57	24.02	3.06	15.2
12	29.20	26.05	1.12	20.0	75.22	23.88	3.15	12.7
13	33.47	25.65	1.31	6.4	76.53	23.70	3.23	10.5
14	33.13	27.17	1.22	12.8	74.17	24.22	3.06	15.2
15	31.43	24.63	1.28	8.6	96.50	27.45	3.52	2.5
16	29.70	22.80	1.30	7.1	80.12	26.62	3.01	16.6
17	28.43	23.12	1.23	12.1	87.95	29.08	3.03	16.0
18	31.42	27.85	1.13	19.3	79.35	29.72	2.67	26.0
19	31.80	26.88	1.18	15.7	72.45	32.00	2.26	37.4
20	29.00	26.08	1.11	20.7	66.72	31.32	2.13	41.0

Table 13. Alkaline phosphatase activities of each extracts from *Hericium erinaceus* using *E. coli* PQ 37 as an indicator cell .

Samples	0.4 µg/tube		2 mg/tube	
	Activity of alkaline phosphatase (units)	% of Inhibition	Activity of alkaline phosphatase (units)	% of Inhibition
Control	19.34	100	25.62	100
1	27.41	141	23.40	91.3
2	24.43	126	22.65	85.1
3	23.80	123	23.27	90.8
4	22.77	118	21.70	84.7
5	25.23	130	23.28	90.9
6	20.22	104	24.03	93.4
7	26.22	136	24.85	97.0
8	26.42	137	23.48	91.7
9	23.40	121	23.93	93.4
10	24.65	127	24.02	93.8
11	26.27	136	24.01	93.7
12	26.05	135	24.02	93.8
14	25.65	133	23.70	92.5
15	27.17	140	24.21	94.5
16	24.63	127	27.35	107
17	22.80	118	26.62	104
18	23.12	119	29.08	114
19	27.85	144	29.72	116
20	26.88	139	32.02	125
21	26.08	135	30.91	121

이상의 결과를 요약하면 다음과 같다. 본 연구의 결과, 대식세포의 NO 생산을 유도하는 효과는 4번과 12번 추출분획이, 그리고 ROS의 소거효과는 4번, 5번, 12번 및 15번 추출분획이 높았고, 대식세포의 포식작용에 대한 증진효과는 7번, 12번 및 14번 추출분획이 우수하다는 결론을 얻었다. 그러나 이와 같은 대식세포에 대한 기능항진 효과가 추출물 안에 혼입된 endotoxin 유사물질에 의한 것이 아님이 확인되었다. 특히, 12번 추출분획은 NO 생산, ROS 소거 및 미생물 포식과 같은 대식세포의 기능 전반을 효과적으로 활성화시키는 것이 나타났다. 반복 실험의 결과에서도 동일한 활성화 효과를 확인할 수 있었다. 또한 1개의 분획을 제외하고는 부경로에 의한 보체활성화를 억제하지 않았고, 특히 대식세포 활성화를 유도한 추출분획들에서는 감염체에 대한 주요한 방어기작 중의 하나인 보체활성화 기작을 억제하지 않는다는 것을 확인하였다. 또한, 19번과 20번 분획에서는 항들연변이 활성이 검출되었다. 본 실험에서 사용한 추출과정은 천연물에서 단백다당류의 조추출분획의 제조에 이용되는 것이기 때문에, 결과에서 나타난 RAW264.7 세포주의 활성화에 단백다당류 관련 성분이 관여했을 가능성이 높다.

2. 노루궁뎅이 버섯 추출물의 *in vivo* 항암 및 면역조절활성

가) 추출분획별 NO 생산 유도활성

1년차에 수행한 노루궁뎅이 버섯의 각 추출방법별 추출분획에 의한 대식세포의 활성화 유도능은 지시세포로 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 사용하여 수행하였다. 그러나 이 지시세포는 대식세포의 성질을 보유하고는 있지만 정상 대식세포는 아니기 때문에, 마우스의 복강 대식세포를 대상으로 노루궁뎅이 버섯 추출분획의 NO 생성 유도능을 검정하였다. 우선, 복강 대식세포에 *in vivo*에서 대식세포의 초회 활성화를 일으키는 것으로 알려진 interferon- γ (IFN- γ)를 전처리하지 않은 조건에서 노루궁뎅이버섯의 추출물만으로 NO 생성을 유도할 수 있는지 여부를 조사하였다. 그 결과, Table 14에 정리한 것처럼, 4번, 8번, 10번, 11번, 12번, 14번 추출분획에서 거의 LPS 자극에 상당하는 수준의 NO 생성을 유도할 수 있음을 알았다.

다음으로는 대식세포의 초회 활성화인자인 IFN- γ 를 복강 대식세포에 미리 처리하고 여기에 노루궁뎅이버섯의 각 추출분획을 처리하여 NO 생성 유도능을 검정하였다. Table 15에 정리된 바와 같이, 다양한 분획에서 NO 유도능이 관찰되었는데, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리조건에서 3번과 4번, 5번 분획, 그리고 7번, 8번, 9번, 10번, 11번, 12번, 13번, 14번, 18번에서 LPS와 IFN- γ 를 모두 처리한 양성대조구의 53%에서 67%에 상당하는 NO 생성 유도능이 관찰되어, 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 검정한 결과와 상당히 일치한다는 사실을 보여주었다.

Table 14. Induction of NO production by the extracts from *Hericium erinaceus* in peritoneal macrophage cells of BALB/C mice without pre-treatment of IFN- γ .

Fraction No.	NO production (μ M of nitrite)		Fraction No.	NO production (μ M of nitrite)	
	100 μ g/mL	500 μ g/mL		100 μ g/mL	500 μ g/mL
Control (-LPS)	1.813 \pm 0.234		Control (+LPS [#])	6.307 \pm 0.519 ^a	
1	2.375 \pm 0.324	2.150 \pm 0.468	11	4.509 \pm 0.554	5.970 \pm 0.361
2	2.712 \pm 0.454	3.124 \pm 0.449	12	4.247 \pm 0.337	6.157 \pm 0.225
3	3.011 \pm 0.595	4.079 \pm 0.687	13	4.322 \pm 0.234	5.333 \pm 0.065
4	2.749 \pm 0.454	5.708 \pm 0.848	14	5.670 \pm 0.425	6.457 \pm 0.687
5	3.461 \pm 0.389	3.948 \pm 0.425	15	1.101 \pm 0.297	1.438 \pm 0.225
6	4.210 \pm 0.531	4.247 \pm 0.626	16	1.401 \pm 0.172	2.262 \pm 0.507
7	3.910 \pm 0.112	5.483 \pm 0.626	17	1.176 \pm 0.065	1.476 \pm 0.065
8	3.760 \pm 0.234	5.933 \pm 0.405	18	2.375 \pm 0.234	3.199 \pm 0.172
9	4.322 \pm 0.234	4.622 \pm 0.234	19	2.375 \pm 0.619	2.787 \pm 0.595
10	5.109 \pm 0.454	6.007 \pm 0.649	20	2.562 \pm 0.848	3.760 \pm 0.619

at a concentration of 100 ng/mL.

Values not sharing common letter in column were significantly different at $P < 0.05$.

Table 15. Induction of NO production by the extracts from *Hericium erinaceus* in peritoneal macrophage cells of BALB/C mice pretreated with IFN- γ .

Fraction No.	NO production (μ M of nitrite)		Fraction No.	NO production (μ M of nitrite)	
	100 μ g/mL	500 μ g/mL		100 μ g/mL	500 μ g/mL
Control (-LPS)	1.813 \pm 0.234		Control (+LPS [#])	6.307 \pm 0.519 ^a	
Control (+IFN γ)	2.075 \pm 0.234		Control (+LPS, +IFN γ)	46.270 \pm 3.091	
1	6.494 \pm 0.490	10.227 \pm 0.554	11	21.101 \pm 0.297	24.884 \pm 1.312
2	5.446 \pm 1.013	22.225 \pm 2.433	12	17.318 \pm 0.908	24.509 \pm 0.748
3	15.184 \pm 3.717	30.989 \pm 2.867	13	19.566 \pm 1.668	26.981 \pm 1.137
4	19.828 \pm 1.302	28.816 \pm 3.842	14	12.749 \pm 0.789	28.180 \pm 1.969
5	5.783 \pm 0.901	27.281 \pm 0.490	15	5.745 \pm 0.908	14.584 \pm 2.152
6	7.468 \pm 0.813	23.011 \pm 2.022	16	7.356 \pm 1.044	10.689 \pm 0.843
7	23.498 \pm 2.526	26.157 \pm 2.795	17	10.876 \pm 1.632	12.936 \pm 1.007
8	17.693 \pm 1.525	26.869 \pm 3.967	18	13.610 \pm 1.820	28.479 \pm 3.090
9	13.498 \pm 1.637	25.633 \pm 2.828	19	10.801 \pm 0.873	12.824 \pm 1.387
10	17.655 \pm 0.687	26.869 \pm 2.707	20	10.689 \pm 1.432	12.712 \pm 1.637

at a concentration of 100 ng/mL.

Values not sharing common letter in column were significantly different at $P < 0.05$.

나) 추출분획별 복강대식세포에 대한 증식유도 활성화

대식세포의 활성화 지표로서 대식세포의 유사분열 정도를 들 수 있다. 따라서 노루궁뎅이버섯의 각 추출조건별 추출분획이 복강에서 분리한 대식세포의 유사분열을 유도시킬 수 있는지 여부를 조사하였다. 그 결과, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 시료처리 조건에서 1번, 2번, 4번, 5번, 6번, 11번, 12번 추출분획에서 유의한 세포 증식 유도활성이 발견되었다 (Table 16). 유사분열 유도활성은 LPS 처리에 의한 복강 대식세포의 세포증식 정도와 비교할 때, 거의 같거나 최대 13%정도 높은 것으로 나타났다. 이 사실은 노루궁뎅이버섯 추출물에 대식세포 활성화 성분이 존재하며 위에서 제시한 NO 생성은 이들 추출물에 의한 복강 대식세포의 활성화 결과임을 재차 확인하였다.

다) 추출분획별 비장 림프세포에 대한 증식유도 활성화

노루궁뎅이버섯의 추출물이 내재면역의 주요세포인 대식세포를 IFN- γ 에 의한 초회 활성화 자극이 없이도 대식세포의 증식 및 NO 생성을 유도할 수 있다는 사실을 알았으므로, 이번에는 이 추출물들이 적응면역의 주역인 림프세포를 활성화시킬 수 있는지 여부를 검정하였다. 지시세포인 림프구로서 마우스의 비장 세포를 사용하여 실험을 수행한 결과, 특이적으로 림프구의 유사분열을 유도하는 활성화는 어떤 추출분획에서도 발견되지 않았다. 따라서 노루궁뎅이버섯 추출물에는 림프구의 활성화를 유도하는 물질은 함유되어 있지 않은 것으로 판단된다 (Table 17).

Table 16. Induction of the cell proliferation of BALB/C mice-derived peritoneal macrophage by the extracts from *Hericium erinaceus*

Fraction No.	PI (Proliferation Index)		Fraction No.	PI (Proliferation Index)	
	100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$		100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
Control (-LPS)	1.000 \pm 0.008 ^{hi}	1.000 \pm 0.008 ^f	Control (+LPS [#])	1.712 \pm 0.107 ^a	1.712 \pm 0.107 ^{bc}
1	1.053 \pm 0.080 ^{efghi}	1.720 \pm 0.102 ^{bc}	11	1.591 \pm 0.164 ^a	1.788 \pm 0.125 ^{abc}
2	1.174 \pm 0.102 ^{defg}	1.848 \pm 0.095 ^{ab}	12	1.061 \pm 0.092 ^{efghi}	1.811 \pm 0.047 ^{abc}
3	1.356 \pm 0.102 ^{bc}	1.515 \pm 0.057 ^d	13	1.159 \pm 0.060 ^{defgh}	1.2801 \pm 0.151 ^e
4	1.409 \pm 0.138 ^b	1.720 \pm 0.057 ^{bc}	14	1.182 \pm 0.099 ^{def}	1.265 \pm 0.133 ^c
5	1.106 \pm 0.105 ^{efghi}	1.864 \pm 0.099 ^{ab}	15	1.417 \pm 0.057 ^b	1.674 \pm 0.092 ^c
6	1.045 \pm 0.082 ^{efghi}	1.947 \pm 0.080 ^a	16	0.977 \pm 0.045 ⁱ	1.061 \pm 0.057 ^f
7	1.288 \pm 0.080 ^{bcd}	1.235 \pm 0.073 ^e	17	1.023 \pm 0.045 ^{fghi}	1.386 \pm 0.104 ^{de}
8	1.212 \pm 0.057 ^{cde}	1.485 \pm 0.073 ^d	18	0.970 \pm 0.047 ⁱ	1.061 \pm 0.069 ^f
9	1.076 \pm 0.073 ^{efghi}	1.242 \pm 0.047 ^c	19	1.008 \pm 0.035 ^{ghi}	1.053 \pm 0.052 ^f
10	1.121 \pm 0.080 ^{efghi}	1.455 \pm 0.039 ^d	20	0.992 \pm 0.035 ^{hi}	1.083 \pm 0.086 ^f

at a concentration of 100 ng/mL.

Values not sharing common letter in column were significantly different at $P < 0.05$.

Table 17. Induction of the cell proliferation of BALB/C mice-derived splenocytes by the extracts from *Hericium erinaceus*

Fraction No.	PI (Proliferation Index)		Fraction No.	PI (Proliferation Index)	
	100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$		100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
Negative control			1.000 \pm 0.051		
Control (+LPS)	2.512 \pm 0.077		Control (+ConA)	3.807 \pm 0.054	
1	1.053 \pm 0.031	1.076 \pm 0.052	11	1.002 \pm 0.077	1.255 \pm 0.031
2	1.176 \pm 0.062	1.113 \pm 0.096	12	1.184 \pm 0.089	1.303 \pm 0.099
3	1.075 \pm 0.013	1.052 \pm 0.064	13	1.010 \pm 0.021	1.255 \pm 0.055
4	1.213 \pm 0.102	1.339 \pm 0.094	14	1.100 \pm 0.050	1.121 \pm 0.056
5	0.998 \pm 0.040	1.154 \pm 0.112	15	1.080 \pm 0.065	1.109 \pm 0.066
6	1.073 \pm 0.021	1.209 \pm 0.081	16	1.041 \pm 0.055	1.103 \pm 0.031
7	0.983 \pm 0.021	1.096 \pm 0.083	17	1.098 \pm 0.047	1.255 \pm 0.053
8	1.054 \pm 0.083	1.251 \pm 0.131	18	0.998 \pm 0.031	1.005 \pm 0.050
9	0.996 \pm 0.006	1.153 \pm 0.076	19	1.002 \pm 0.055	1.054 \pm 0.031
10	1.023 \pm 0.103	1.206 \pm 0.051	20	0.997 \pm 0.013	1.076 \pm 0.065

at a concentration of 100 ng/mL.

라) 추출물분획이 대식세포의 면역기능인자 발현에 미치는 효과

노루궁뎅이버섯 추출물이 대식세포의 면역기능인자의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대식세포의 면역기능인자중 중요한 역할을 담당하는 cytokine 인 TNF- α , IL-1 β , IL-6가 노루궁뎅이버섯 추출물의 첨가로 발현이 유도되는 지 여부를 ELISA로 각 cytokine의 분비량을 정량하였다. 이때 노루궁뎅이버섯 추출물로는 이전 실험에서 NO 생산 및 *Candida albicans*에 대한 포식활성을 모두 유도하는 4번 분획과 12번 분획을 선발하였고, 음성대조군으로서 유도활성이 별로 관찰되지 않았던 16번 분획과 20번 분획을 사용하여 실험을 수행하였다. 실험 결과, Table 17 및 Fig. 1에서 보듯이, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 시료처리 조건에서 4번과 12번 분획 모두 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생산을 LPS 자극 수준이나 그 이상으로 유도시킨다는 사실을 알 수 있었다. 반면, 음성대조군으로 사용된 16번과 20번 분획의 cytokine 유도활성은 매우 낮게 나타났다. 4번과 12번 중에서는 12번의 cytokine 유도능이 3가지 cytokine에서 모두 LPS 자극과 같은 수준을 보여, 12번 추출물이 대식세포의 활성화를 유도하는데 매우 효과적임을 알았다.

Table 11. Induction of TNF- α , IL-1 β and IL-6 productions by the extracts from *Hericium erinaceus* in RAW264.7 cells

Fraction No.	Cytokine release (pg/mL)		
	TNF- α	IL-1 β	IL-6
Control (-LPS)	28.46 \pm 8.46	11.49 \pm 2.02	16.93 \pm 1.33
Control (+LPS)	6113.91 \pm 245.95	216.63 \pm 10.10	326.64 \pm 3.38
4	4200.87 \pm 175.24	207.20 \pm 4.04	307.51 \pm 11.38
12	6390.00 \pm 196.76	218.63 \pm 3.23	310.12 \pm 3.18
16	590.00 \pm 95.31	13.34 \pm 3.44	24.32 \pm 1.33
20	865.00 \pm 69.17	15.63 \pm 1.82	21.28 \pm 1.74

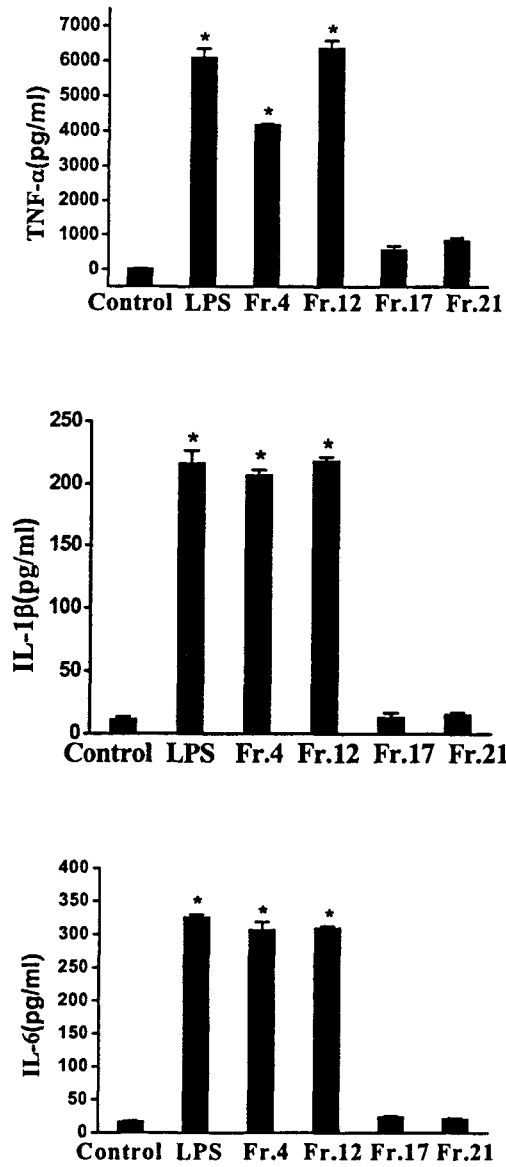


Fig. 1. ELISA analysis for cytokine production in RAW 264.7 cells

다음으로 이와 같은 cytokine의 분비량이 증가하는 것이나 NO 생성이 유도되는 현상이 노루궁뎅이버섯 추출물의 처리에 의한 각 유전자의 전사활성화에 기인한 것인지를 알아보기 위하여 추출물분획을 처리한 RAW 264.7 세포에서 total RNA를 추출하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 유전자에 해당하는 primer로 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다. 이때 자극에 의하여 발현이 유도되지 않는 β -actin 유전자를 내부 대조군으로 사용하여 β -actin의 발현량에 대한 각 cytokine 유전자의 발현량을 정량하여 추출물에 의한 전사활성화 정도를 평가하였다. Fig. 2에서 보듯이 유도성 NO의 생산을 담당하는 iNOS 유전자의 발현량은 4번과 12번 분획에서 각각 LPS 자극의 경우의 약 72%와 81% 정도로서 NO 방출량과 거의 일치하였다. 또한 TNF- α , IL-1 β 와 IL-6 유전자의 발현량은 모두 LPS 자극의 경우와 같았다. 이와 같은 4번과 12번 추출물분획에 의한 대식세포주의 cytokine 유전자의 전사활성화 현상이 두 추출물에 함유된 성분에 의한 특이적 현상임이 16번과 20번 추출분획을 처리한 실험으로 알 수 있었는데, 이들 분획에서는 음성대조구인 시료 무처리군처럼 cytokine 유전자의 발현이 전혀 일어나지 않았다는 것을 알았다. 따라서 4번과 12번 추출물, 특히 12번 추출물은 대식세포의 NO생산과 포식작용을 활성화시킬 뿐 아니라, TNF- α , IL-1 β 와 IL-6와 같은 내재면역계를 향진시키는 cytokine의 발현을 유도시킨다는 사실이 나타났다.

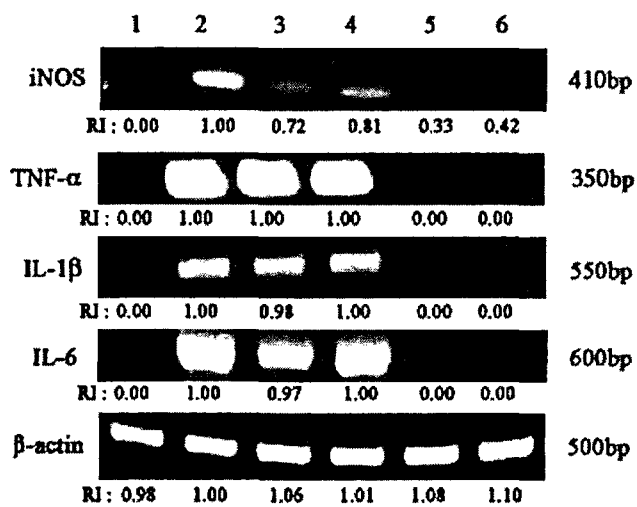


Fig. 2. Semi-quantitative RT-PCR analysis of iNOS, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 gene expressions. RI indicates relative intensity of each DNA bands.

마) 추출물분획의 *in vitro* 항암활성

4번과 12번 추출분획이 대식세포의 유사분열, NO 생산, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 종양형성 억제와 관련된 내재성 면역을 활성화하는데 필요한 cytokine의 생산을 유도한다는 사실이 밝혀졌기 때문에, 이번에는 추출물 그 자체가 살해나 성장방해에 의한 종양세포의 증식을 억제하는 능력이 있는지 여부를 간단히 *in vitro*에서 조사하였다. 지시세포로는 마우스의 colon carcinoma cell line인 CT-26 cell을 사용하였다. 실험 결과, 4번과 12번 추출분획은 220 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리조건에서 각각 약 31% 및 40%의 대장암세포에 대한 증식 억제능을 보이는 것으로 나타났다 (Table 18, Fig. 3). 이와 같은 세포증식의 억제가 necrosis나 apoptosis에 의하여 일어나는 것인지에 대한 원인의 구명이 현재 진행 중에 있다.

Table 12. *In vitro* growth inhibition of CT-26 mouse colon carcinoma cells by the extracts from *Hericium erinaceus*

Fraction No.	Tumor cell growth inhibition	
	OD at 595 nm	% of Inhibition
Control	2.251±0.039	0.000±2.213
4	1.544±0.080	31.403±3.815
12	1.361±0.081	39.529±3.569

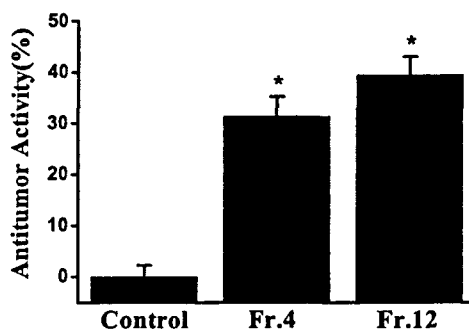


Fig. 3. *In vitro* tumor cell growth inhibition by the extracts from *Hericium erinaceus*.

바) 추출물분획이 실험동물에 이식된 종양에 대한 항암활성

*in vitro*에서 노루궁뎅이버섯 추출물 4번과 12번 분획이 마우스의 대장암세포인 CT-26의 성장을 억제한다는 실험 결과를 근거로 이들 추출물 분획이 *in vivo*의 조건에서도 항암활성을 갖는지 여부를 조사하였다. CT-26세포를 BALB/C 마우스의 피부에 이식한 다음, 10 mg/kg body weight의 농도로 각 분획의 추출물을 복강에 주사하여 이식된 종양이 감퇴하는지 여부를 평가하였다. Table 19 및 Fig. 4에서 나타난 것처럼, 4번과 12번 분획은 *in vivo*에서 이식된 종양의 발생을 각각 22%와 24% 정도 유의하게 억제한다는 것을 알 수 있었다.

종양이 발생한 개체는 정상적인 개체에 비하여 내재면역계의 주된 세포인 대식세포의 활성이 저하되어 있다는 보고가 있어, 종양의 발생을 억제하는데 대식세포의 활성화가 중요하다는 사실을 시사해 주고 있다. 따라서 본 실험에서는 이식된 종양을 가진 개체와 노루궁뎅이버섯의 4번 및 12번 추출물을 투여한 개체의 대식세포사이에 기능의 차이가 있는지를 대식세포의 NO 생성활성을 지표로 조사하였다. 그 결과, 4번 및 12번 추출물을 복강투여한 종양이식 마우스에서 추출한 대식세포는 노루궁뎅이버섯을 투여하지 않은 종양이식 마우스의 대식세포에 비하여 유의하게 NO 생산량이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 이 변화는 추출물에 의한 종양의 감소현상과 일치하였다. 따라서 노루궁뎅이버섯 추출물의 복강투여에 의한 이식종양의 감퇴현상에 노루궁뎅이버섯 추출물의 투여로 인한 대식세포의 활성화가 중요한 역할을 하고 있음을 알았다 (Fig. 5).

Table 19. Inhibitory effects of the extracts from *Hericium erinaceus* on transplanted tumor in BALB/C mice.

Fraction No.	Inhibition of tumorigenesis	
	Tumor weight (g)	% of Inhibition
Control	0.894±0.091	0
4	0.698±0.091	21.924±10.234
12	0.676±0.059	24.385±6.646

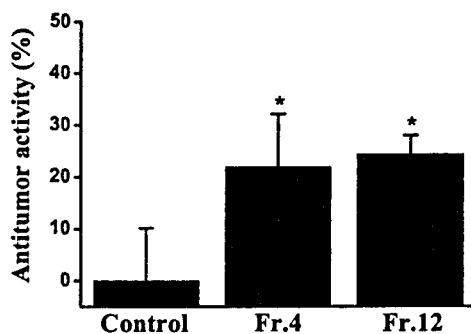


Fig. 4. *In vivo* transplanted tumor growth inhibition by the extracts from *Hericium erinaceus*.

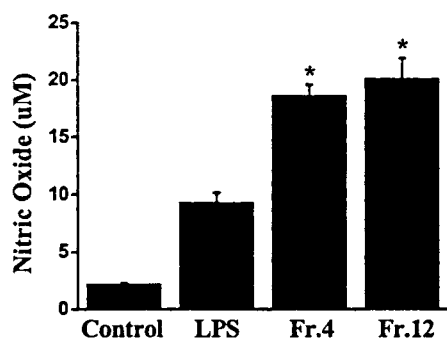


Fig. 5. NO production capacities of the *Hericium erinaceus* extract-treated peritoneal macrophages from transplanted tumor-bearing mice.

사) NK세포의 활성화에 의한 암세포의 살해

In vitro 및 *in vivo*의 실험에서 4번과 12번 추출물에서 종양세포주의 성장을 억제하는 활성이 관찰됨에 따라 노루궁뎅이버섯의 추출물은 암세포의 성장을 직접적으로 억제하거나 세포사를 유도하는 한편, 생체 내 대식세포를 활성화시켜서 종양의 형성을 감시킨다는 사실을 알았다. 그러나 생체에 발생한 암을 제거하는데 있어서 NK세포가 활성화되어 종양세포를 살해하는 경로도 내재면역계의 암세포 제거기작으로서 매우 중요하며, 특히 식품섭취를 통한 항암작용에서 NK세포에 의한 암세포의 제거는 제일 효과적인 경로로서 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 림프구계열의 세포로서 내재면역계에서 주로 바이러스 감염 세포 및 암세포를 비특이적으로 제거하는 기능을 가진 NK세포의 활성이 노루궁뎅이버섯 추출물의 투여에 의하여 증진될 수 있는지 여부를 검토하였다.

우선 이 실험을 수행하기 위하여 NK세포의 종양세포 살해활성을 측정할 수 있는 실험계를 확립하였다. 기존의 주로 사용해 온 실험방법에서는 ^{51}Cr 으로 표식한 종양세포와 NK세포를 동시에 배양했을 때 NK세포의 공격에 의하여 살해된 종양세포로부터 나온 ^{51}Cr 의 세포의 방출량을 정량하는 것인데, 본 실험에서는 방사선동위원소인 대신 Calcein-AM이란 화합물로 표식하였다. Fig. 6은 종양세포의 표식화합물인 Calcein-AM의 적정농도를 결정하기 위한 예비실험 결과로서, 25 μM 에서 세포의 표식은 포화상태에 도달함을 알 수 있었다. 이 세포표식 조건에서 지시세포인 YAC-1 cell을 Calcein-AM으로 표식한 다음, 노루궁뎅이버섯 4번과 12번 추출물을 정맥투여한 마우스에서 spleen의 NK세포를 분리하여 NK세포가 표적 YAC-1을 살해하는 활성을 측정한 결과, Table 19 및 Fig. 7에 나타난 것처럼 4번과 12번 추출분획에서 유의한 NK세포의 종양세포 살해활성이 발견되었다.

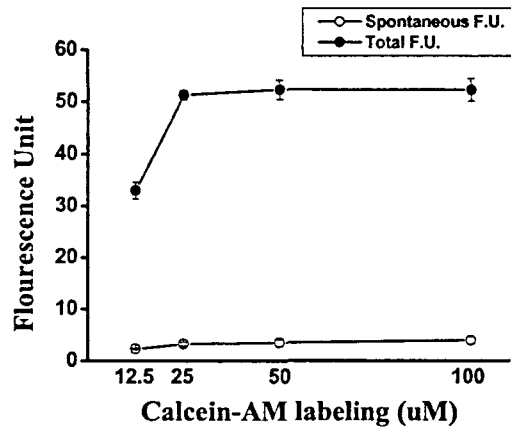


Fig. 6. Concentration dependent cell labeling with Calcein-AM

Table 19. Tumoricidal activity of NK cell isolated from mice intraperitoneally injected with the extracts from *Hericium erinaceus*.

Fraction No.	NK cell activity	
	Fluorescence unit	% of Cytotoxicity
Control	9.053±0.650	11.473±1.302
4	19.312±1.357	29.772±2.920
12	19.110±1.984	31.603±3.971

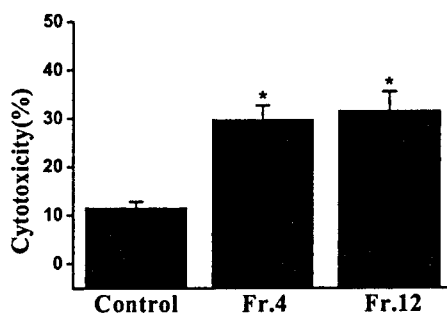


Fig. 7. Tumoricidal activity of NK cell isolated from BALB/C mice intraperitoneally injected with the extracts from *Hericium erinaceus*.

한편, 노루궁뎅이버섯 추출물을 정맥주사하지 않고 분리된 NK세포에 *in vitro* 에서 추출물을 처리한 다음, 표적세포인 YAC-1 세포를 반응시킨 경우의 종양 살해 활성을 조사한 결과, Table 20와 Fig. 8에서 보는 것처럼, 정맥주사로 추출 물을 투여한 경우보다는 다소 낮지만 역시 NK세포의 종양살해기능을 활성화시킨다는 사실을 알 수 있었다. 이상의 결과들은 노루궁뎅이버섯의 4번과 12번 추출물이 생체 내에서 나타내는 종양살해활성은 대식세포의 활성화를 통해서 뿐만 노루궁뎅이버섯 추출물에 함유된 성분에 의한 NK세포의 기능향진에 의하여 이루어진다는 사실을 시사하고 있다.

Table 20. Tumoricidal activity of NK cell pre-treated *in vitro* with the extracts from *Hericium erinaceus*.

Fraction No.	NK cell activity	
	Fluorescence unit	% of Cytotoxicity
Control	7.341±0.516	8.877±0.577
4	14.179±1.133	23.350±1.351
12	15.316±1.571	25.756±2.174

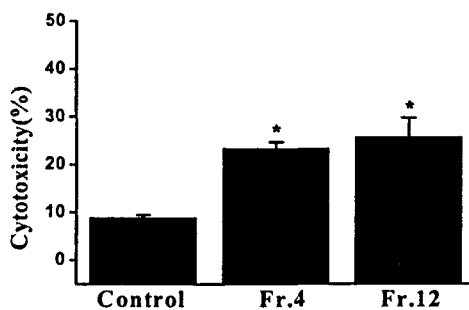


Fig. 8. Tumoricidal activity of NK cell pre-treated *in vitro* with the extracts from *Hericium erinaceus*.

이상의 결과를 요약하면 다음과 같다. 2차년도에서는 노루궁뎅이버섯의 대식세포 활성화유도능을 마우스에서 직접 분리한 복강대식세포를 대상으로 검정하였고, 그 결과 interferon- γ (IFN- γ)를 전처리하지 않은 조건에서 4번, 8번, 10번, 11번, 12번과 14번 추출분획에서 강력한 NO 생산 유도능이 발견되어, 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 검정한 결과와 상당히 일치함을 알았다. 또한 1번, 2번, 4번, 5번, 6번, 11번, 12번 추출분획에서 복강대식세포의 증식을 유의하게 유도하였으나 비장 림프구의 증식을 유도하지는 못하였다. 이상의 검정 결과를 바탕으로 다방면에서 대식세포의 활성화를 유도하는 4번과 12번 추출분획을 선발하여 대식세포의 cytokine 유도능을 조사한 결과, 두 분획 모두 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6과 같은 종양형성 억제와 관련된 cytokine에서 발현을 단백질 및 mRNA 전사수준에서 활성화시킨 것으로 나타났으며, 특히 12번 분획의 활성이 더 높았다. 4번과 12번 추출분획은 220 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리조건에서 마우스의 colon carcinoma cell line인 CT-26 cell을의 증식을 약 31% 및 40% 억제하는 것으로 나타났다. 또한, CT-26세포를 BALB/C 마우스의 피부에 이식한 다음, 4번과 12번 추출물분획을 복강 주사한 결과, 유의한 수준의 종양 감퇴가 관찰되었으며, 종양 발생으로 인한 대식세포의 NO 생성도 추출물의 투여로 증가하였다. NK세포에 의한 암세포의 제거는 제일 효과적인 경로로서 알려져 있다. 내재면역계에서 암세포의 제거기능을 가진 NK세포에 대한 활성화 유도능을 조사한 결과, 4번과 12번 추출물을 정맥투여한 마우스에서 spleen의 NK세포에서 유의한 종양세포 살해활성이 발견되었으며, 노루궁뎅이버섯 추출물을 전처리한 NK세포도 비슷한 수준의 종양세포 살해활성을 보였다. 따라서 노루궁뎅이버섯의 4번과 12번 추출물이 보이는 종양살해활성은 대식세포의 활성화와 더불어 NK세포의 기능향진에 의한 것임이 증명되었다.

제3절 노루궁뎅이버섯 단백다당류 분획의 품질특성

1. 단백다당류의 분자 크기에 따른 분획물의 이화학적 특성

에탄올로 50%의 농도에서 microwave로 추출한 추출물의 단백다당류의 기능이 가장 우수한 것으로 나타난 상기의 조건으로 추출한 후 막분리를 통하여 분획을 얻었다. 단백다당류의 분자 크기에 따른 분획물의 pH를 측정된 결과는 Fig. 9에 나타내었다. 한외여과 후 노루궁뎅이버섯 단백다당류의 pH는 분자량이 10 kDa 이하의 분획물은 6.62, 10~150 kDa의 분획물은 6.58, 150 kDa 이상의 분획물은 6.64로 모든 처리구가 유사하게 나타나, 분자량에 따른 단백다당류의 pH는 큰 차이를 나타내지 않았다.

단백다당류의 분자 크기에 따른 분획물의 산도를 측정된 결과는 Fig. 10에 나타내었다. 산도는 0.037~0.050%로 모두 유사하게 나타났으며 모든 처리구가 0.05%이하로 아주 낮게 나타났다.

단백다당류의 분자 크기에 따른 분획물의 총당을 측정된 결과는 Fig. 11에 나타내었다. 당 함량은 분자량이 150 kDa 이상의 분획물이 33.50 mg%, 10~150 kDa의 분획물이 32.20 mg%, 10 kDa 이하의 분획물이 30.00 mg%로 나타났다. 분자량 150 kDa 이상의 분획물에서 가장 높게 나타났으나 10~150 kDa의 분획물과 유사한 값을 나타내었고 10 kDa 이하의 가장 낮은 값을 나타내었다.

단백다당류의 분자 크기에 따른 분획물의 단백질을 측정된 결과는 Fig. 12에 나타내었다. 단백질 함량은 150 kDa 이상>10~150 kDa>10 kDa 이하 순으로 그 값은 각각 30.55 mg%, 29.23 mg%, 25.72 mg%로 나타났으며 이는 총당의 실험결과와 유사하게 나타났다.

단백다당류의 분자 크기에 따른 분획물의 총 페놀성 물질을 측정된 결과는 Fig. 13에 나타내었다. 총 페놀성 물질은 150 kDa 이상>10~150 kDa>10 kDa 이하 순으로 그 값은 3.00~3.39 mg%로 모두 유사하게 나타났으나 분자량이 150 kDa 이상의 분획물에서 3.39 mg%로 가장 높게 나타나 노루궁뎅이버섯의 경우 150 kDa 이상의 분획물에서 페놀성분이 많이 함유하고 있는 것으로 생각

되면 이 분획물에서 항산화, 항암, 항미생물 및 아질산염 소거능 등의 활성이 있을 것으로 판단된다.

단백다당류의 분자 크기에 따른 분획물의 DPPH 유리기 소거능을 측정한 결과는 Fig. 14에 나타내었다. DPPH 유리기 소거능은 항산화성의 크기를 나타내는 지표로 분자량이 150 kDa 이상의 분획물이 80.59%로 가장 높았고 그 다음은 10-150 kDa(71.06%), 10 kDa 이하(69.29%) 순으로 나타나 분자량이 150 kDa 이상의 분획물에서 가장 높은 항산화성을 나타났었다. 이러한 결과는 총 페놀성 물질 측정결과와 유사하게 나타나 상호 밀접한 관계를 확인할 수 있었다.

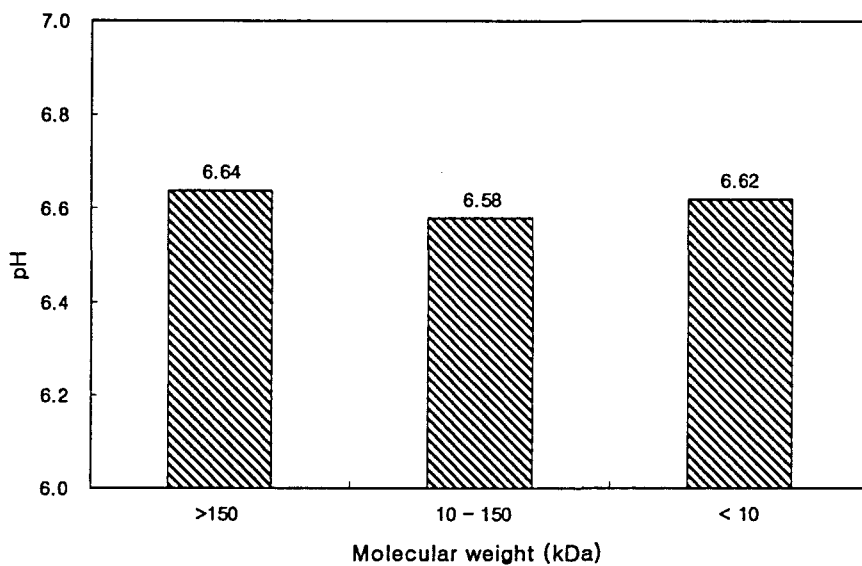


Fig. 9. pH of crude protein bound polysaccharides ultrafiltered from *Hericium erinaceus*.

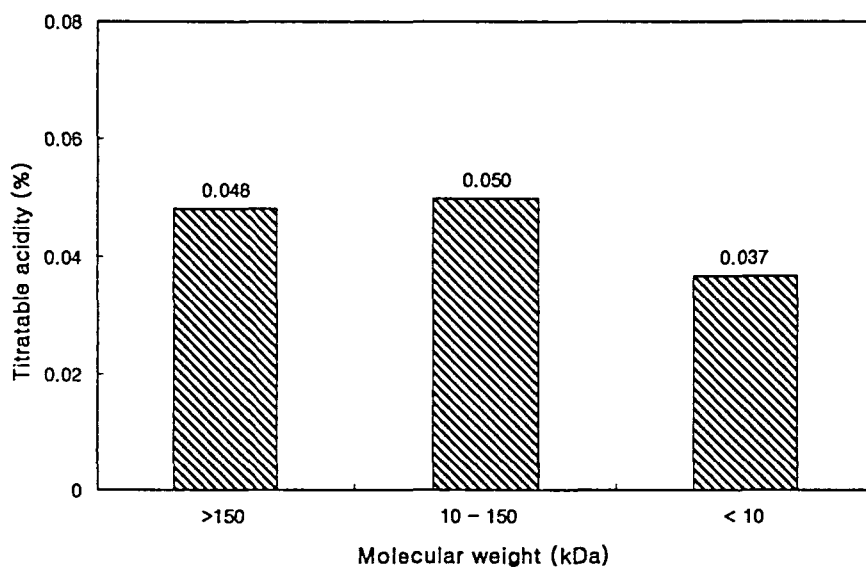


Fig. 10. Titratable acidity of crude protein bound polysaccharides ultrafiltered from *Hericium erinaceus*.

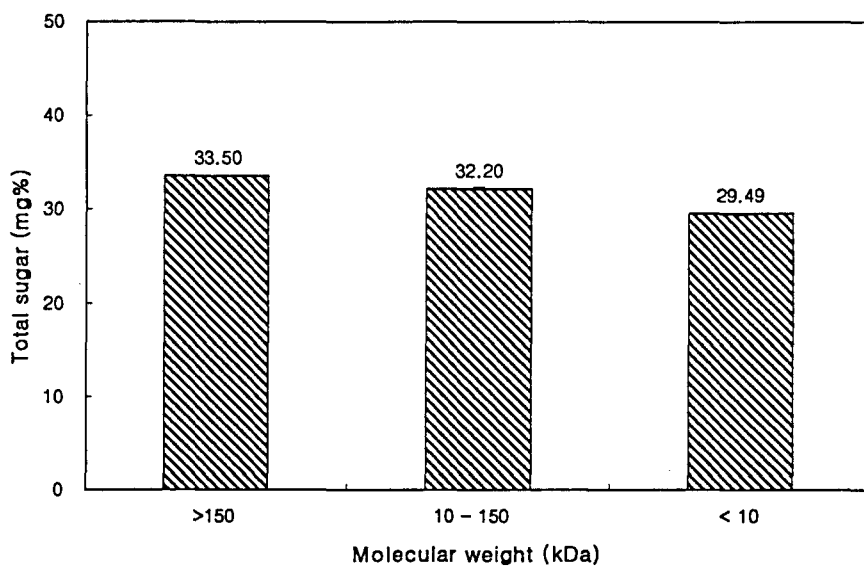


Fig. 11. Total sugar of crude protein bound polysaccharides ultrafiltrated from *Hericium erinaceus*.

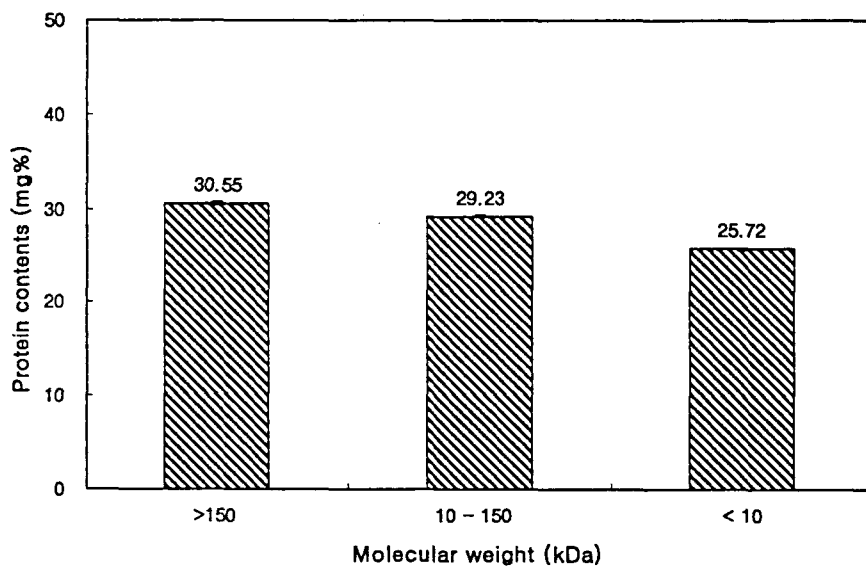


Fig. 12. Protein contents of crude protein bound polysaccharides ultrafiltered from *Hericium erinaceus*.

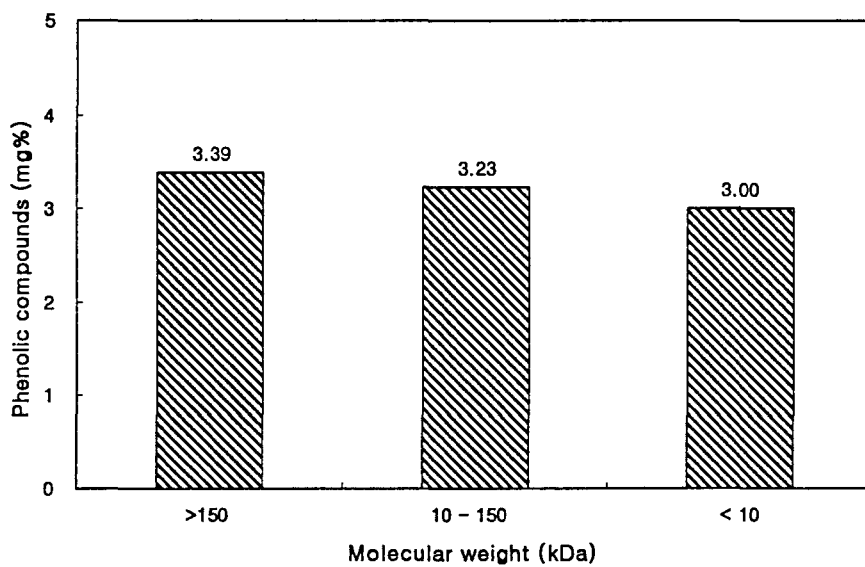


Fig. 13. Phenolic compounds of crude protein bound polysaccharides ultrafiltered from *Hericium erinaceus*.

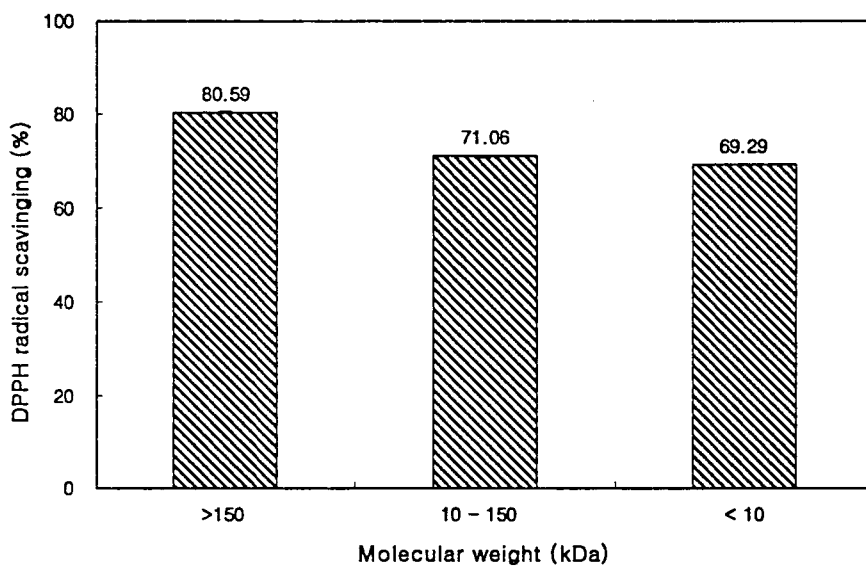


Fig. 14. DPPH radical scavenging of crude protein bound polysaccharides ultrafiltered from *Hericium erinaceus*.

2. 단백질의 분자 크기에 따른 분획물의 색도변화

단백질류의 분자 크기에 따른 분획물의 색도를 측정된 결과는 Table 21에 나타내었다. L 값은 10 kDa 이하 >10~150 kDa >150 kDa 이상 순으로 나타났는데, 그 값은 각각 79.18, 75.96, 75.59였다. 모든 실험구간 큰 차이가 없었으나 분자량이 10 kDa 이하의 분획물이 10~150 kDa과 150 kDa 이상의 분획물보다 조금 더 밝은 것으로 나타났다. 이는 막의 크기가 증가할수록 추출액 중의 저분자물질, 당, 색소물질이 막을 쉽게 통과하여 어두운 색상을 나타내기 때문인 것으로 판단된다. 적색도를 나타내는 a 값은 분자량이 10 kDa 이하인 분획물이 -1.22, 10-150 kDa 분획물이 -2.23, 150 kDa 이상의 분획물이 -2.31 순으로 나타났으나 모든 실험구가 유사하게 나타났으며, 그 수치가 모두 (-)값을 나타내 모든 추출액이 붉은 색은 띄지 않음을 알 수 있었다. b 값은 분자량이 150 kDa 이상의 분획물이 10.11, 10-150 kDa의 분획물이 9.20, 10 kDa 이하의 분획물이 3.56으로 150 kDa 이상과 10-150 kDa의 분획물이 10 kDa 이하의 분획물보다 노란빛을 띠는 것으로 나타났다. 전체적인 색상을 나타내는 hue angle은 150 kDa 이상이 102.9°, 10-150 kDa이 103.6°, 10 kDa 이하 109.3°로 모두 유사하게 나타났으며, 모든 실험구가 90° 이상의 값을 나타내 녹색 빛이 섞인 노란색을 띠는 것을 알 수 있었다.

Table . Color of crude protein bound polysaccharides ultrafiltered from *Hericium erinaceus*.

Molecular weight (kDa)	Color			
	L	a	b	H°
> 150	75.59±1.17	-2.31±0.20	10.11±1.48	102.9±0.73
10 - 150	75.96±0.85	-2.23±0.15	9.20±1.05	103.6±0.60
< 10	79.18±0.74	-1.22±0.21	3.56±1.01	109.3±1.89

3. 조단백 다당류 분획의 항변이원성

DNA의 손상 유무에 관계없이 발현되는 효소인 alkaline phosphatase의 활성을 측정함으로써 배양액 내 세포의 성장 정도를 측정한 결과, Table 22에 나타내고 있는 바와 같이 노루궁뎅이 버섯 다당 분획은 고농도의 경우에서 성장을 약간 저해하는 경향이 있었지만, 낮은 농도에서는 오히려 지시세포인 *E. coli* PQ 37 균주의 성장을 촉진시키고 있음을 알 수 있었다.

SOS chromotest에 사용하는 지시균주인 *Escherichia coli* PQ 37은 일련의 SOS 유전자 사이에 *sfIA:lacZ*의 융합 유전자를 삽입시킨 균주로 항생제인 ampicilline에 대한 내성이 있으며, 돌연변이 유발물질의 균체내 흡수가 용이하며, 세포 DNA가 손상되면 이 손상이 수복되기까지의 일련의 반응인 SOS 반응이 증폭되게 고안된 것으로 이때 발현되는 β -galactosidase 활성의 크기로서 변이원성의 정도를 측정할 수 있는 것이다. Table 23에 나타내고 있는 바와 같이 다당 분획의 처리 농도에 따라서 항변이원성에는 차이가 있었으며, 오히려 낮은 농도를 사용하는 경우에 항변이원성이 큰 것을 알 수 있다. 또한 다당 분획중에서는 분자량이 클수록 항변이원성은 높은 경향이 있었다.

Table 22. Alkaline phosphatase activities of each extraxts using *E. coli* PQ 37 as an indicator cell

Samples	0.1mg/tube		1mg /tube	
	Activity of alkaline phosphatase (units)	%	Activity of alkaline phosphatase (units)	%
Control	22.75	100	25.62	100
> 150	28.14	124	24.90	97.2
10 - 150	26.35	116	25,12	98.0
< 10	25.92	114	26.07	101

Table 23. Inhibitory activity of each extracts on Mitomycin C-induced mutagenesis in *E. coli* PQ 37 using as an indicator cell

Samples	0.1 mg/tube				1 mg/tube			
	β -Gal ¹ (units)	Alkaline ² (units)	Antimutagenicity		β -Gal ¹ (units)	Alkaline ² (units)	Antimutagenicity	
			R	%			R	%
-MMC	3.95	45.15	-	-	9.93	52.78	-	-
+MMC	27.12	22.75	1.19	0	26.52	25.62	1.03	0
> 150	26.54	28.14	0.943	20.7	24.83	24.90	0.997	3.2
10 - 150	25.31	26.35	0.976	18.0	24.97	25.12	0.994	3.5
< 10	24.87	25.92	0.959	19.4	25.23	26.07	0.967	6.1

4. 단백다당류 분획의 항보체 활성화

체액성 면역계를 담당하는 인자로서 항원 침입시 비 특이적으로 활성화 되어 세균이나 virus 등의 표적세포를 분해하고 대식세포와 림프구의 활성화를 유도 하는 혈중 순환 단백질로 구성되어 있는 보체계(Complement system)는 숙주가 면역화 되기 이전에 즉각적으로 반응한다는 점에서 중요한 생체 방어 기전인 것이다. 최근에 이러한 보체계를 활성화 하는 물질(혹은 항보체 활성화 물질)들이 생체의 면역 부전 상태를 개선하거나 치료하는 면역 요법제로 개발되어 질병의 예방과 치료에 효과적으로 이용될 수 있을 가능성이 제시되고 있으며, 항보체 활성화 물질이 생체내 대식세포 등의 면세포를 자극하여 cytokine의 분비를 유도 하고 암치료에 도움이 될 수 있다는 가능성이 제시되고 있다. Table 24에서 알 수 있듯이 다당 분획들은 항 보체 활성화가 대체로 높았으며, 항변이원성의 경우와 마찬가지로 분자량이 클수록 항보체 활성화도 높은 경향이 있음을 알 수 있었다.

Table 24. Anti-complementary activity of the extracts

Samples	0.1 mg/mL		1 mg/mL	
	OD at 412 nm	Inhibition of TCH ₅₀ (%)	OD at 412 nm	Inhibition of TCH ₅₀ (%)
Control	1.312	0	1.312	0
> 150	0.815	37.8	0.523	60.1
10 - 150	0.901	31.3	0.601	54.2
< 10	0.917	30.1	0.639	51.3

제4절 단백질다당류를 이용한 가공제품의 개발과 품질 특성

1. 가공품의 제조

본 연구에서 기능성이 우수한 노루궁뎅이 버섯을 효과적으로 섭취하기 위하여 분말, 과립, 타블렛, 캡셀 제품을 제조하였으며 제조된 노루궁뎅이 버섯 제품은 Fig. 15.에 나타내었다.

분말 제품은 표면적이 크기 때문에 용해, 흡수면에서 과립, 타블렛 등과 같은 제품에 비해 유리하나 저장시 그만큼 흡습이 잘되어 저장시 caking과 같은 문제가 발생한다. 과립 제품은 분말제품보다 흡습성이 좋으며 물리적 화학적으로 안정하여 저장시 caking과 같은 문제는 발생하지 않으며, 또한 미세한 분말의 경우 용해시 용매 표면에 떠 용해성에 문제가 있으므로 이때 과립으로 제조하면 그런 문제점을 보완할 수 있다. 타블렛 제품은 과립을 작은 원판 모양을 압축하여 복용, 휴대, 보관을 편리하게 만든 것으로, 보통 내용물 그대로 또는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제 등을 첨가하여 과립으로 제조하고 이것을 압축기를 이용하여 성형한다. 캡셀 제품은 젤라틴 캡셀에 충전한 경질캡셀제와 탄력성이 있는 젤라틴막으로 성형한 연질캡셀제가 있는데 주로 분말이나 과립의 경우에는 경질캡셀제를 이용한다. 이러한 캡셀은 젤라틴으로 싸여 있어 불쾌한 맛이나 냄새를 감지할 수 없고 또 물에 적시면 쉽게 용해되어 5분 이내에 젤라틴이 용해하여 내용물이 방출된다. 캡셀제는 타블렛과 같이 강한 압축으로 제조하지 않고 충전할 수 있으므로 분산성이 양호하기 때문에 체내흡수가 빠르다. 캡셀 제품은 캡셀제 안에 내용물을 그대로 충전하여 성형에 필요한 다른 첨가제가 필요하지 않으므로 주성분을 많이 넣을 수 있다. 또한 제조 공정이 간단하고 자동 충전기 개발로 대량생산이 가능할 뿐만 아니라 휴대가 용이하여 건강식품에 많이 사용된다. 본 연구에서는 캡셀형태의 건강식품으로의 개발가능성을 검증하고자 하였으며 품질 특성에 관한 연구는 따로 수행하지 않았다.

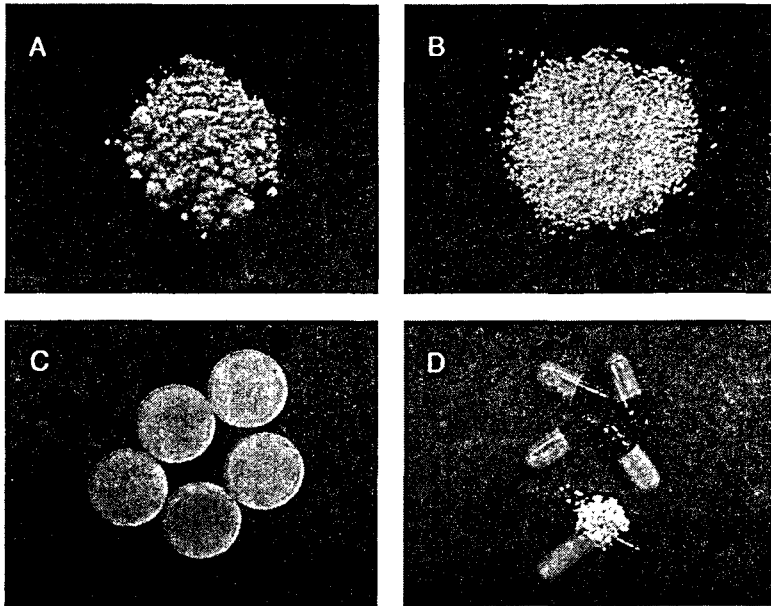


Fig. 15. Photographs of spray dry powder(A), granule(B), tablet(C) capsule(D) made of *Hericium erinaceus*.

2. 노루궁뎅이 버섯을 이용한 분말, 과립, 타블렛 제품의 품질 특성

노루궁뎅이 버섯 제품의 수분함량을 측정한 결과는 Fig. 16에 나타내었다. 수분함량은 분무건조 분말>과립>타블렛 순으로 그 값은 각각 4.37%, 3.78%, 3.43%로 나타났다. 분말제품의 경우 수분함량이 3%이상이면 caking 현상을 발생하여 저장시 문제가 될 수 있으므로 분무건조 분말제품은 anticaking agent 를 처리하는 것이 적절한 것으로 판단된다.

노루궁뎅이 버섯 제품의 총당을 측정한 결과는 Fig. 17에 나타내었다. 총당함량은 과립과 타블렛의 경우에는 37.58 g%, 35.76 g%로 유사하게 나타났고 분무건조 분말은 19.14 g%로 낮은 함량을 나타내었다. 이는 노루궁뎅이 버섯 제품 제조시 사용된 부형제는 모두 탄수화물 제제이므로 과립과 타블렛 제조시 많은 양의 부형제가 사용된 결과라 판단된다.

노루궁뎅이 버섯 제품의 단백질을 측정한 결과는 Fig. 18에 나타내었다. 단백질 함량은 분무건조 분말>과립>타블렛 순으로 그 값은 각각 4.39 g%, 1.04g%, 0.75g%로 나타났다. 이는 총당 측정 결과와 마찬가지로 과립과 타블렛 제품 제조시 분무건조 분말을 제조할 때보다 부형제의 사용량이 더 많아 당 함량이 낮은 분무건조 분말이 상대적으로 단백질 함량이 높게 나타난 것으로 판단된다.

노루궁뎅이 버섯 제품의 수분결합지수를 측정한 결과는 Fig. 19에 나타내었는데 수분결합지수는 시료 0.5 g을 증류수 20 mL에서 1분간 용해시키고 30분간 원심분리하여 남은 고형분의 양을 측정하여 나타내었다. 노루궁뎅이 버섯이 제품의 수분결합지수는 분무건조 분말>타블렛>과립 순으로 그 값은 2.48 g/g, 0.32 g/g, 0.12 g/g로 나타났다. 과립과 타블렛 제품이 분무건조 분말제품보다 수분결합지수가 낮은 것으로 나타났는데 이는 과립과 타블렛 제조시 가용성의 탄수화물제제인 부형제가 많이 첨가되었기 때문인 것으로 판단된다. 타블렛의 경우 과립제품보다 수분결합지수 약간 높은 것으로 나타났는데 이는 타블렛의 제조시 성형압력을 가하므로 과립보다 조직이 치밀하여 붕해성이 낮기 때문인 것으로 판단되며, 과립의 경우 타블렛보다는 조직이 덜 치밀하며, 비중이 있어 물과 혼합이 잘되어 용해성이 높아져 수분결합지수가 가장 낮은 것으로 판단된다.

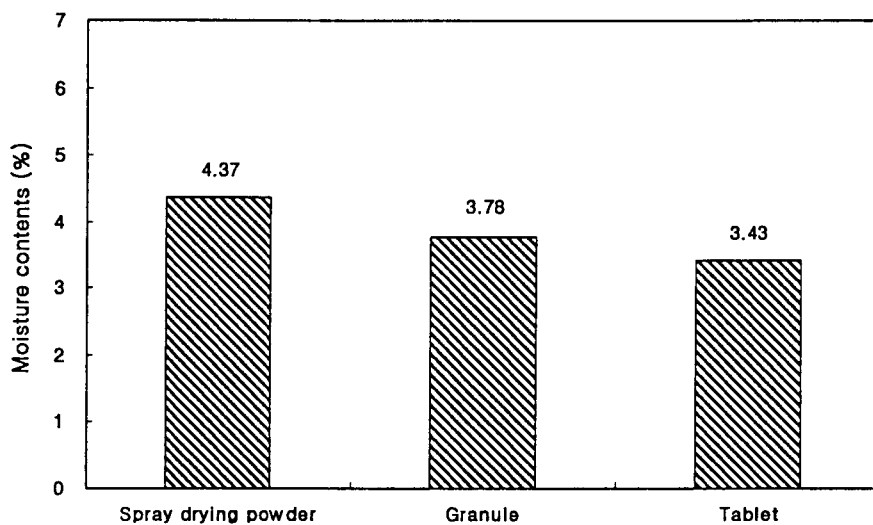


Fig. 16. Moisture contents of spray drying powder, granule, tablet made of *Hericium erinaceus*.

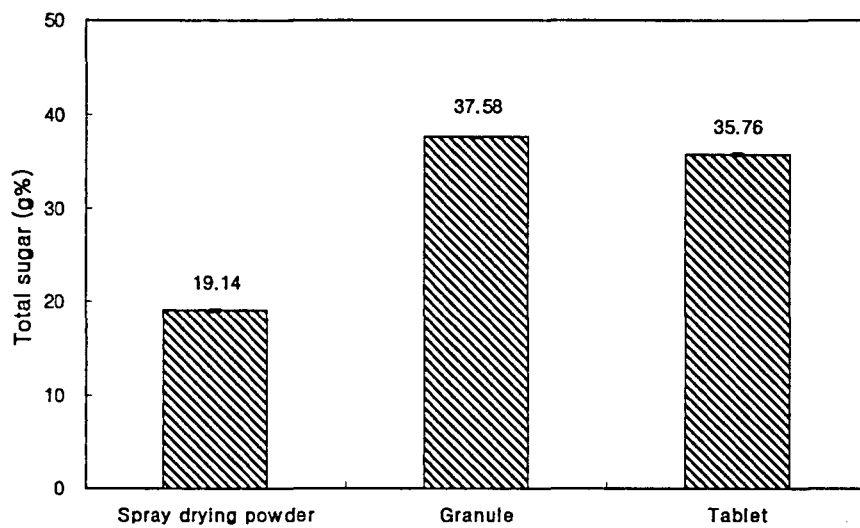


Fig. 17. Total sugar of spray drying powder, granule, tablet made of *Hericum erinaceus*.

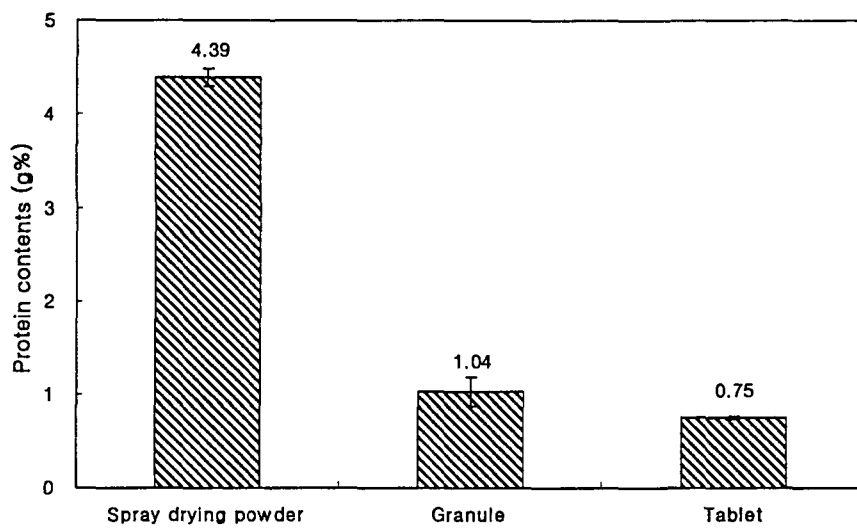


Fig. 18. Protein contents of spray drying powder, granule, tablet made of *Hericium erinaceus*.

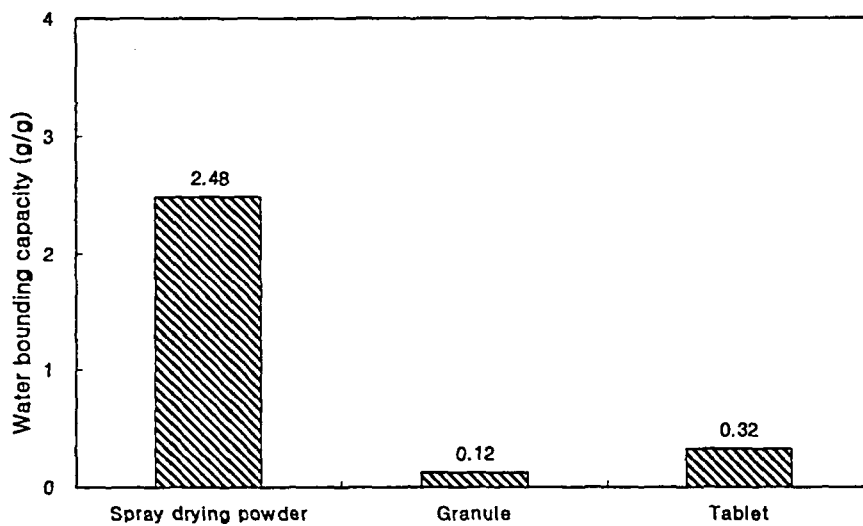


Fig. 19. Water bounding capacity of spray drying powder, granule, tablet made of *Hericium erinaceus*.

3. 노루궁뎅이 버섯을 이용한 분말, 과립, 타블렛 제품의 색도변화

노루궁뎅이 버섯 제품의 색도를 측정된 결과는 Table 25에 나타내었다. L 값은 타블렛>과립>분무건조 분말의 순으로 밝게 나타났는데 그 값은 각각 91.67, 88.73, 82.75였다. 타블렛과 과립의 경우 비슷한 수치를 나타내었는데 이는 이들 제조시 많이 사용된 부형제의 색이 모두 흰색계열의 밝은 색을 나타내어 이 색이 반영된 결과인 것으로 판단된다. 적색도를 나타내는 a 값은 분무건조 분말>과립>타블렛순으로 모든 실험구가 유사하게 나타났으며, 그 값은 각각 1.50, -0.67, -1.31로 나타났다. b 값은 분무건조 분말이 18.83, 과립이 13.77, 타블렛이 8.03으로 분무건조 분말이 노란 색을 띠음을 알 수 있는데 과립 및 타블렛 제조시 부형제의 첨가량이 많아 추출액 본래의 색에 영향을 끼친 것으로 판단된다. 이는 앞의 제품 사진(Fig. 15)과 유사한 결과로 분무건조 분말은 황토색을 나타내었고 과립과 타블렛은 노란빛을 띠는 흰색을 나타내었다. 전체적인 색상을 나타내는 hue angle은 +a 축을 시작으로 +a(red)는 0°, +b(yellow)는 90°, -a(green)는 180° 그리고 -b(blue)는 270°로 표현된다. 노루궁뎅이 버섯 제품의 hue angle은 분무건조 분말이 85.50°, 과립이 95.37°, 타블렛이 94.67°로 나타났다. 모든 실험구가 90° 전후로 나타나 노란빛을 띠음을 알 수 있었는데 분무건조 분말은 90°이하의 값을 나타내 붉은 빛이 약간 섞인 노란색을 띠음을 알 수 있었고 과립과 타블렛은 90°이상의 값을 나타내 녹색 빛이 섞인 노란색을 띠음을 알 수 있었다.

Table 25. Color of spray drying powder, granule, tablet made of *Hericium erinaceus*.

	Color			
	L	a	b	H°
Spray drying powder	82.75±1.50	1.50±0.24	18.83 ±0.58	85.50±0.62
Granule	88.73±0.97	-1.31±0.04	13.77 ±0.33	95.37 ±0.21
Tablet	91.67±0.47	-0.67±0.08	8.05 ±0.51	94.67 ±0.31

4. 노루궁뎅이 버섯을 이용한 분말, 과립, 타블렛 제품의 흡습특성

노루궁뎅이 버섯을 이용하여 제조한 분무건조 분말, 과립, 타블렛의 저장안정성을 알아보기 위하여 흡습특성에 대하여 조사한 결과를 Fig. 20에 나타내었는데 흡습특성은 시료 0.5 g을 포화 데시게이터 내에서 15시간동안 방치하면서 1시간 간격으로 중량증가를 측정하여 나타내었다. 분무건조 분말이 가장 높은 흡습성을 보였으며 과립, 타블렛 순으로 뚜렷한 차이를 나타냈다. 분무건조 분말의 경우 방치 1시간까지 빠른 무게 증가를 보였고 방치 1시간이후에도 증가폭은 크지 않았지만 꾸준한 증가를 보였는데, 이는 분말입자가 미세하므로 표면적이 넓어 수분 흡수가 용이한 것으로 판단된다. 과립의 경우도 분무건조 분말과 유사하게 방치 1시간까지 빠른 무게 증가를 보였으나 방치 1시간이후에는 증가폭은 감소하였다. 타블렛의 경우는 방치 1시간까지 가장 많은 무게 증가폭을 보였으나 그 후 무게 증가폭과 유사하게 나타났다. 이는 타블렛 제조시 200 kg/cm²의 높은 압력으로 성형을 하여 조직이 치밀하고 균일하므로 무게 증가폭이 유사하게 나타났으며 수분흡수가 가장 적게 되었을 것으로 판단된다. 따라서 분무건조 분말보다는 타블렛 형태로 제조한다면 저장성 면에서 더 우수한 제품을 얻을 것으로 사료된다.

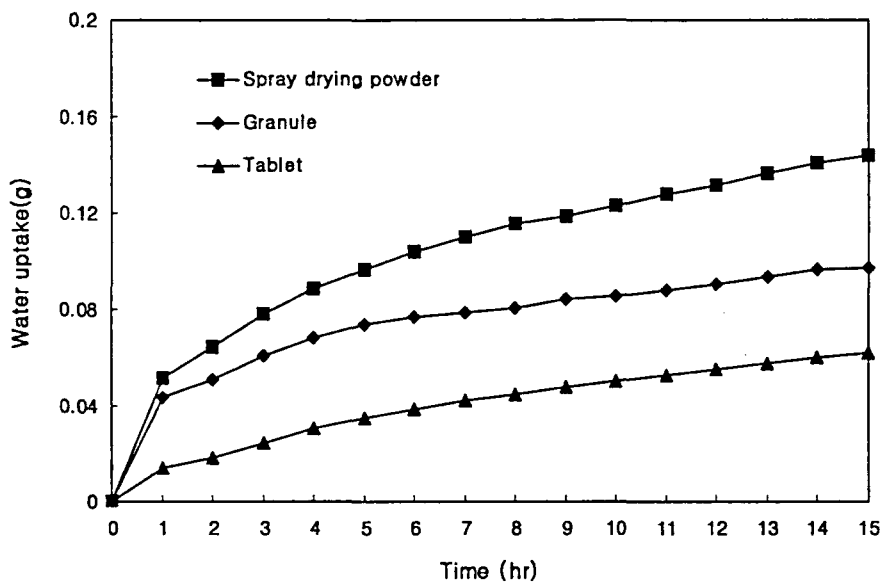


Fig. 20. Water uptake of spray drying powder, granule, tablet made of *Hericium erinaceus*.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 목표달성도

노루궁뎅이 버섯의 다당류를 고용해성이 부여된 생체기능성 조절 물질로 개발하고자 유용성분을 효율적으로 추출 및 분리할 수 있는 공정을 확립하고 추출조건에 따른 항암 및 면역활성을 측정하여 기능성을 확인하고 부가가치를 높일 수 있는 기술을 개발하고자 하였다.

노루궁뎅이 버섯 분말의 일반성분 및 당 함량 분석을 실시하였으며, 추출공정에 따른 단백다당류의 수율, 당 및 단백질 함량, 전자공여작용, β -glucan 등의 특성 분석 결과, 생리활성이 기대되는 노루궁뎅이 버섯의 유용성분을 효율적으로 추출할 수 있는 공정을 확립할 수 있었다.

노루궁뎅이 버섯의 다당류의 추출조건 설정을 위한 screening 단계이므로, 추출 조건을 달리하여 제조한 각각의 다당 분획 시료들에 대하여 MTT assay에 의한 세포독성을 검정하였으며, E. Coli PQ 37 균주를 이용한 SOS chromo test를 실시하여 항변이원성을 검정하였고, macrophage의 NO 생산능을 측정함으로써 섭식 세포의 cytokine 생산 및 NO 생산 양상을 검정하였고, 시료에 의한 보체 소비 후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈정도에 근거를 둔 complement fixation test로써 항보체 활성을 측정하여, 항암 및 면역 증강 효과가 큰 다당 분획의 추출조건을 확립하는 기준을 설정하였다.

가장 우수한 기능성을 보이는 추출조건으로 마이크로웨이브추출(80W, 3분)을 선정하였으며 위의 조건에서 추출한 단백다당류의 분획물을 막분리를 통하여 10 kDa, 10~150 kDa, 150 kDa 이상으로 분획하였다. 분자량에 따른 기능성을 확인하고자 당과 단백질, 페놀성 물질의 함량과 DPPH 유리기 소거능을 분석하여 항산화, 항암, 항미생물 및 아질산염 소거능 등의 활성을 확인하였다. 또한 분획의 항변이원성과 항보체 활성을 확인하여 기능성을 확인하였다.

기능성이 확인된 노루궁뎅이 버섯의 고용해성 단백다당류를 얻기 위하여 분무건조를 통하여 미세 분말을 얻고 효과적으로 섭취하기 위하여 분말, 과립, 타블렛, 캡슐 제품을 가공제품을 제조한 후 수분결합지수와 흡습성 등을 조사하여 품질 특성을 조사하였다.

▶ 추출방법에 따른 노루궁뎅이 버섯 단백다당류의 특성

- 노루궁뎅이 버섯의 일반성분 및 당 조성 : 100% 달성
- 추출방법(열수, 마이크로웨이브, 산, 알카리)에 따른 단백다당류의 성분 측정 : 100% 달성

▶ 노루궁뎅이 버섯 추출물의 항암 및 면역조절 활성

- 세포독성 측정 : 100% 달성
- 암세포 살해활성의 측정 : 100% 달성
- 섭식세포의 cytokine 측정, NO 생산양상 측정 : 100% 달성
- 보체생상양상 측정
- 섭식세포의 암세포 살해활성 : 100% 달성
- 섭식세포의 cytokine, NO 생성양상의 분석 : 100% 달성
- 섭식세포의 cytokine 생산양상 측정 : 100% 달성
- 섭식세포의 포식활성 측정 : 100% 달성
- 암세포 살해활성 측정 : 100% 달성
- 이식종양 퇴행유도 활성 측정 : 100% 달성
- 발암생쥐 복강대식세포의 항종양활성 : 100% 달성

▶ 노루궁뎅이버섯 단백다당류 분획의 품질특성

- 막분리를 이용한 단백다당류의 분리 : 100% 달성
- 분자량에 따른 분획물의 이화학적 특성 : 100% 달성
- 단백 다당류 분획의 항변이원성 및 항보체 활성 : 100% 달성

▶ 단백다당류를 이용한 가공제품의 개발과 품질 특성

- 가공제품(분말, 과립, 타블렛, 캡슐)의 제조 : 100% 달성
- 가공제품의 흡습성, 수분결합지수 등 품질 특성 측정 : 100% 달성

제2절 관련분야에의 기여도

국제적으로 각종 첨가물에 대한 규제가 엄격해지면서 식품이나 의약품에 천연물 소재 이외에는 첨가 허용이 제한될 것으로 전망되므로, 생리활성 효과가 탁월한 물질을 함유하는 천연소재의 개발은 필수 불가결한 산업개발 분야가 될 것이다. 우리나라의 농업은 세계적인 자유무역 체제 내에서 가격이나 양적 우월성으로 경쟁하기는 어려우며, 틈새시장(niche market)을 겨냥한 농업자원을 개발해야 한다.

노루궁뎅이 버섯으로부터 차별화된 기능성을 가진 항암·면역증진 활성의 다당류가 생산되고 그 효능이 생리·생화학적으로 구명됨으로써 의약산업의 소재로 자리매김할 수 있게 될 것이며, 유전공학과 같은 대규모의 투자와 교육이 없이도 재배농가에 고부가가치를 보장하는 농업 소재로서 우월성을 발휘할 수 있다.

노루궁뎅이 버섯이 항암·면역증진 활성 뿐 아니라 이미 고지혈증, 동맥경화 및 노인성 치매의 예방에도 매우 유효하다는 약리적 활성이 증명되어 있으므로, 막분리 및 분무건조 공정을 이용한 고용해성 다당류의 대량 생산 체계를 확립하고 이를 바탕으로 가공식품이나 만성질환에 대한 종합 건강보조품의 개발을 통해 수출전략용 상품으로의 가능성이 있다.

노루궁뎅이 버섯 기능성 다당류의 생산기술 및 개발원리는 유사한 기능성 버섯류에도 적용되어 보다 다양한 약리기능을 가진 다당류의 분자크기에 따른 분리 및 생리활성의 구명에 기여함으로써 관련 산업분야의 발전에 기여할 것이

다.

노루궁뎅이 버섯에서 분리한 고용해성 다당류의 항암·면역증진 효과를 가지는 분자를 화학적, 생리학적으로 확인하고 활성물질의 제조공정을 확립함으로써, 의약산업 및 식품산업에서 효용가치를 극대화시켜서 대량소비를 유도하여 재배농가 및 관련산업의 부가가치 창출에 기여할 수 있다.

대량 생산에 적용가능한 공정 개발을 통해 다양한 기능성 식품 산업으로의 기술 이전이 가능하며 다양한 형태의 제품 개발로 건강 기능성 식품의 고급화 및 수출 전략용 상품으로의 육성이 기대된다.

제5장 연구결과의 활용

▶ 노루궁뎅이버섯에서 분리한 고용해성 다당류의 분자량 크기에 따른 항암활성 뿐만 아니라 세포성 또는 체액성 면역 특이적 항진작용을 보이는 새로운 면역제어물질이 밝혀질 가능성이 있으며 이것은 면역력 강화가 필요한 유아 식품업이나 제약관련 산업의 발달을 도모할 수 있으며 이는 물질 특허 및 산업화로 활용가능하다.

▶ 소비확대를 위한 노루궁뎅이 버섯 고용해성 다당류의 상품화의 일환으로 이미 버섯에서 분리된 항암성분인 lentinan, PS-K 및 meshima같이 직접적인 항암치료제나 항암치료 보조제로의 개발이 가능하며, 다당류의 분획화로 다양한 면역증강효과를 가진 다당류를 분리함으로써 소비자의 수요에 부응한 건강보조 식품으로 개발하는 것도 가능하며 산업화에 활용할 수 있다..

▶ 노루궁뎅이 버섯에서 분리한 고용해성 다당류의 항암 및 면역증진 효과를 확인하고 유용물질의 제조공정을 확립함으로써, 의약산업 및 식품산업에서 효용 가치를 높여 관련 산업분야의 발전에 활용할 수 있다.

▶ 노루궁뎅이 버섯 기능성 다당류의 생산기술 및 개발원리는 유사한 기능성 버섯류에도 적용되어 보다 다양한 약리기능을 가진 다당류의 분자크기에 따른 분리 및 생리활성의 구명에 활용할 수 있다.

▶ 제조공정 및 제품개발에 관련된 특허 출원으로 국내 기술의 보호 및 기타 가공식품으로의 적용이 가능할 것이다..

제6장 참고문헌

Boudard F., Vallit N., Cabaner C. and Bastide M. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods*, 174, 259-268, 1994.

Brian C.S. To, Mark R. Etzel. Spray Drying, Freeze Drying, of Freezing of Three Different Lactic Acid Bacteria Species. *J. Food Sci.*, 62, p.576-578, 1997.

Cavazzoni, V. and A. Adami. Exopolysaccharides produced by mycelial edible mushrooms. *Ital. J. Food Sci.*, 1, p.9-15, 1992.

Chin-Cheng Lin, Shan-Yang Lin, Luck Sun Hwang. Microencapsulation of Squid oil with Hydrophilic Macromolecules for Oxidative and Thermal Stabilization. *J. Food sci.*, 60, p.36-39, 1995.

Chomczynski P. and Sacchi N. Single-step method of RNS isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, p156-159, 1987.

Chong L.V. and Chen X.D. A mathematical model of the self-heating of spray-dried food powders containing fat, protein, sugar and moisture. *Chemical Engineering Science*, 54, p.4165-4178, 1999.

Felder Ch.B., Vorlanender N., Gander B., Merkle H.P. and Bertschinger H.U. Microencapsulated enterotoxigenic *Escherichia coli* and detached fimbriae for

peroral vaccinatio of pigs. *Vaccine*, 19, p.706-715, 2001.

Grandison A.S. and Lewis M.J. Separation processes in the food and biotechnology industries: Principles and Application. Woodhead publishing Ltd., England., p.97, 1996.

Hafedh Belghith, Semia Ellouz Chaabouni and Ali Gargouri. Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of Maltodextrin. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, p.253-258, 2001.

Hirokazu, K., Aya, N., Takayuki, Y. and Takashi, M. Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. *Carbohyd. Res.*, 183, p.150-154, 1988.

Hirokazu, K., Ryuichi, I., Teturo, K. and Takashi, M. Fractionation and antitumor activity of the water-in-soluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohyd. Res.*, 186, p.267-273, 1989.

J. Straatsma, G. Van Houwelingen, A.E. Steenbergen, and P. De Jong. Spray drying of food products: 1. simulation model. *J. Food Eng.*, 42, p.67-72, 1999.

J. Straatsma, G. Van Houwelingen, A.E. Steenbergen, P. De Jong. Spray drying of food products: 2. Prediction of insolubility index. *J. Food Eng.*, 42, p.73-77, 1999.

Katrin heinzelmann, Knut Franke. Using freezing and drying techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation

stability. *Colloids and Surfaces B: biointerfaces*, 12, p.223-229, 1999.

Kawagishi H., Shimada A., Hosokawa S., Mori H., Sakamoto H., Ishiguro Y., Sakemi S., Bordner J., Kojima N. and Furukawa S. Erinacines E, F, and G, Stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Letters*, 37, p.7399-7402, 1996.

Kenmoku H., Sassa T. and Kato N. Isolation of erinacine P, a new parental metabolite of cyathane-xylosides, from *Hericium erinaceum* and its biomimetic conversion into erinacines A and B. *Tetrahedron Letters*, 41, p.4389-4393, 2000.

Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sasaki, S. Host mediated antitumor action of *Schizophyllum commune*. *Gann*, 60, p.557-563, 1971.

Lagoueyte N. and Paquin P. Effects of microfluidization on the functional properties of xanthan gum. *Food hydrocolloids*, 12, p.365-371, 1998.

Lee S.W., Kim M.H. and Kim C.K. Encapsulation of ethanol by spray drying technique: effects of sodium lauryl sulfate. *International Journal of Pharmaceutics*, 187, p.193-198, 1999.

Levis S.R. and Deasy P.B. production and evaluation of size reduced grades of microcrystalline cellulose. *International Journal of Pharmaceutics*, 213, p.13-24, 2001.

- Master K. Spray drying handbook, Longman, Sci. & Tech. p.112-125, 1999.
- Mau J.L., Lin H.C. and Song S.F. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res., Inter.*, 35, p.519-526, 2002.
- Misuno T. Antitumor activity and some properties of water soluble polysaccharides from fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric. Biol. Chem.*, 54(11), p.2889-2896, 1990.
- Mizuno T., Keiko, O. and Naomi, H. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. *Agric. Biol. Chem.*, 50(7), p.1679-1688, 1986.
- Mizuno, T., Inagaki, R., Kanto, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. and Asakura, A. Antitumor activity and some properties of water-insoluble polysaccharides from Himematsutake, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric. Biol. Chem.* 54, p.2897-2905, 1990.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods*, 65, p55-63, 1983.
- Mulder, M. Basic principle of Membrane Technology. Kluwer Academic Publishers. U.S.A., 209-211 (1991)2. J. Filipov, D. Voinovich. Chitosan microspheres with hydrocortisone and hydrocortisone-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *Pham., sci.*, 9, p.373-379, 2000.

Murakami A., Gao G., Kim O.K., Omura M., Yano M., Ito I., Furukawa H., Jiwajinda S., Koshimizu K. and Ohigashi, H. Identification of coumarins from the fruit of *Citrus hystrix* DC as inhibitor of nitric oxide generation in mouse macrophage RAW 264.7 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 47, p333-339 1999.

Naama H.A., Mack V.E., Smyth G.P., Stapleton P.P. and Daly J.M. Macrophage effector mechanism in melanoma in an experimental study. *Arch. Surg.*, 136, p804-809, 2001.

Nelly, B. and Gustav, A. H. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochem.* 54, p484-489, 1973.

Onmulata C., Smith P.W., Craig J.C., JR. and Holsinger V.H. Physical Properties of Encapsulated Spray-Dried Milkfat. *J. Food sci.*, 59, p316-319, 1994.

Owen C. Chidavaenzi, Graham Buckton and Fariba Koosha. The effect of co-spray drying with polyethylene glycol 4000 on the crystallinity and physical form of lactose. *Inter., J. Pharmaceutics*, 216, p.43-49, 2001.

Pamela, M. and Laura, P. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chem.* 68, p.315-318, 2000.

Ping He, Stanley S. Davis, Lisbeth Illum. chitosan microspheres prepared by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 187, p.53-65, 1999.

Konstance R.P., Onwulata C.I. and Holsinger V.H. Flow Properties of Spray-Dried encapsulated Butteroil. *J. Food sci.*, 60, p.841-844, 1995.

- Ratti, C. Shrinkage during of foodstuffs. *J. Food Eng.*, 23(1), p.91-105, 1994.
- Regina, C.R., Notoya, M. and Mario, S. M. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murill extracts on V79 cells. *Mutation Res.* 496, p.5-13, 2001.
- Rey, L., May, J. and Marcel, D. Freeze-drying/Lyophilization of pharmaceutical and biological products. *European J. Pharm. Biopharmaceutics*, 51, p.163-164, 2001.
- Roden M.M., Lee K.H., Panelli M.C. and Marincola F.M. A novel cytotoxicity assay using fluorescence labeling and quantitative fluorescent scanning technology. *J. Immunol. Methods*, 226, p.29-41, 1999.
- Sasaki, T. and Takasuka, N. Further studies of the structure of lentinan, An antitumor polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Carbohydr. Res.* 47, p.99-106, 1976.
- Sheu T.Y. and Rosenberg M. Microstructure of Microcapsules Consisting of Whey Proteins and Carbohydrates. *J. Food Sci.*, 63, p.491-494, 1998.
- Staugas R.E.M., Harvey D.P., Ferrante A., Nandoskar M. and Allison A. Induction of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin- α (IL-1) by *Pseudomonas aeruginosa* and exotoxin A-induced suppression of lymphoproliferation and TNF, lymphotoxin, gamma interferon, and IL-1 β production in human leukocytes. *Infect. Immun.*, 60, p.3162-3168, 1992.

Stephane A. Desobry, Flavia M. Netto, Theodore P. Labuza. Comparison of Spray-drying, Drum-drying and Freeze-drying for β -Carotene Encapsulation and preservation. J. Food sci., 62, p.1158-1162, 1997.

Straatsma J., Houwelingen G.V., Steenbergen A.E. and Jong P.D. Spray drying of food products: 1. simulation model. Journal of Food Engineering, 42, p.67-72, 1999.

Straatsma J., Houwelingen G.V., Steenbergen A.E. and Jong P.D. Spray drying of food products: 2. Prediction of insolubility index. Journal of Food Engineering, 42, p.73-77, 1999.

Tomoaki H., Saburo S., Naozumi O., Minoru F., Hiroyuki M., Osami W., Katsushi K. and Koji N. Development of a new type nozzle and spray-drier for industrial production of fine powders. European J. Pharm., Biopharmaceutics, 49, p.79-85, 2000.

Tsugagoshi, S. and Ohashi, F. Protein-bound polysaccharides preparation, PS-K, effective against sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by use. Gann. 65, p.557-565, 1974.

W.L. Boatright, N.S. Hettiarachchy. Spray-Dried Soy Protein Isolate Solubility, Gelling Characteristics, and extractable Protein as Affected by antioxidants. J. Food sci., 60, p.806-809, 1995.

Wan-Yin Fu, Mark R. Etzel. Spray Drying of *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* C2 and Cellular Injury. J. Food sci., 60, p.195-200, 1995.

Yoon T.J., Yoo Y.C., Lee S.W., Shin K.S., Choi W.H., Hwang S.H., Ha E.S., Jo S.K., Kim S.H. and Park W.M. Anti-metastatic activity of *Acanthopanax senticosus* extract and its possible immunological mechanism of action. *J. Ethnopharm.*, 93, p247-253, 2004.

Yoshino S., Sasatomi E. and Ohsawa M. Bacterial lipopolysaccharide as an adjuvant to induce autoimmune arthritis in mice. *Immunol.*, 99, p607-614, 2000.

Zheng, R., Jie, S., Hanchuan, D. and Moucheng, W. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Int. Immunopharmacol.*, 5, p811-820, 2005.

김현정, 이병훈, 김옥미, 이갑득, 이갑량. 한국산 야생버섯류중 항변이원성 효과의 검색. *한국식품과학회지*, 30, p.688-692, 1998.

박선희, 김옥미, 이갑량. 노루궁뎅이버섯 추출물의 항돌연변이원성 및 Quinone Reductase 유도 효과. *한국식품영양과학회지*, 30, p.1287-1292, 2001.

박선희, 김지영, 장종선, 오은정, 김옥미, 배준태, 김현정, 하대중, 이갑량. 노루궁뎅이버섯 추출물의 벤조피렌 유발 간 독성에 대한 보호효과. *한국식품영양과학회지*, 30, p.928-932, 2001.

박선희, 장종선, 이갑량. 노루궁뎅이버섯 추출물이 암세포의 성장과 세포주기 조절단백질에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*, 32, p.931-936, 2003.