

버섯류-마늘 혼합추출물이 생리활성 및 면역 증가에 미치는 영향

손준연 · 나행요¹ · 손정선^{2*}

조선이공대학교 생명환경화학공과, ¹조선대학교 공과대학 첨단소재공학과,
²조선대학교 기초교육대학 자유전공학부

Effect of Mushroom-Garlic Mixed Extract on Bioactivity and Immune Enhancement

Jun Youn Sohn, Haeng Yo Na¹, and Jeong Sun Sohn^{2*}

Department of Bioenvironmental & Chemical Engineering, Chosun College of Science & Technology

¹Department of Advanced Materials Engineering, Chosun University

²Division of Undeclared Majors, College of General Education, Chosun University

Abstract

As the world becomes an aging society, various geriatric diseases are induced, posing a tremendous social burden. For the development of healthy food, mushrooms and garlic, which are natural medicinal resource materials, and their mixed extracts were prepared, while the contents of general components, β -glucan, free sugar, and organic acid, were confirmed. In the case of garlic, the contents of alline and heavy metals were confirmed. The presence or absence of toxicity in each sample was checked through MTT assay in vitro, while the appropriate treatment concentration was established to confirm each extract's immune activation and anticancer effects. As a result of examining the anticancer effect from the thymus and lymph node cells of experimental mice administered orally, each extract in vivo confirmed that the CD4 T cells of thymocytes and lymph node cells were increased at all concentrations of the mixed two extracts, and they exhibit immunity activation and anticancer properties.

Key words: mushroom, garlic, mixed extracts, immune activation

서 론

UN의 기준에 따르면 고령화사회는 65세 이상의 인구가 전체 인구의 7% 이상인 경우를 말하고, 14%를 넘으면 고령사회, 20%를 넘으면 초고령사회로 분류된다. 2019년 기준으로 한국의 65세 이상의 노인 인구는 전체 인구의 15.5%에 이르며, 2060년에는 전체 인구의 41.0% 이상이 65세 이상인 초고령 사회로 진입할 것으로 추정된다. 현재 우리나라는 노인의 인구수가 급증하게 됨에 따라 고령사회로 돌입 되면서 노인성 각종 질병이 유발되어 사회적으로 크나큰 부담을 안고 있다. 노인성 질환의 원인은 대부분 유전자 불안정성으로 노화를 가속화 시키거나, 연령이 많아질수록 치매나 파킨슨병 등 신경계 및 뇌 관련 질환이 발생되고, 사회적 문제로 이슈되는 노인의 우울증은 삶의

질을 떨어뜨릴 뿐만 아니라 만성질환으로 이어지며 일상생활 활동이나 영양상태 등에도 영향을 미친다. 그리고 식이 요인에 의해 유도되는 인체의 생리적 퇴화에 기인되어 만성화가 주된 원인으로 알려져 있다(Jin et al., 2020). 이와 같은 노인성 질환을 극복할 수 있는 주요한 수단으로 식품을 통해 각종 영양소를 상호작용과 균형에 따라 적절하게 공급한다면 예방할 수 있다. 이러한 욕구를 충족시켜주는 천연 약용 자원 중의 하나로 버섯류를 꼽을 수 있으며, 다양한 영양소를 가지고 있어 식품적 가치가 우수할 뿐만 아니라 항암, 면역 증강과 같은 각종 약리 작용을 가지고 있는 기능성 소재로 크게 주목받고 있다(Chaturvedi et al., 2018; Waktola & Temesgen, 2018; An et al., 2019). 버섯의 주요성분인 β -glucan은 인체의 면역시스템에 작용하여 면역력을 증강시켜주는 Biological response modifiers (BRM)이 있고, 면역계 내의 대식 세포의 기능을 활성화시킴으로써 백혈구를 회복시키는 인터페론(interferon)이나 인터루킨(interleukin) 등 사이토카인(cytokine)을 생산하여 면역세포인 B cell과 T cell 등 활성화시켜 세포조직의 면역 기능을 증가시킨다(Shim et al., 2003). 최근에는 인플루엔자 또는 코로나바이러스 같은 RNA 바이러스의 인터페론

*Corresponding author: Jeong Sun Sohn, Division of Undeclared Majors, College of General Education, Chosun University, Gwangju 61452, Korea.

Tel: +82-062-230-7268; Fax:

E-mail: jss4347@chosun.ac.kr

Received August 20, 2021; revised October 2, 2021; accepted October 5, 2021

반응을 활성화 시키기 위한 잠재적인 역할로 주목받고 있다(Guggenheim et al., 2014; McCarty & DiNicolantonio, 2020). 버섯의 활용 범위가 넓어지고 관심이 증가함에 따라 버섯에 대한 유효성분과 효능에 대해 많은 연구가 활발히 진행되고 있다(Gao et al., 2004; Lull et al., 2005; Murphy et al., 2020). Hawksworth (2001)의 연구에 따르면 인류가 버섯을 널리 활용하는 분야로 식용과 약용이 있다(Cheng et al., 2003). 전 세계적으로 2천 여종의 버섯이 식용으로 사용되고 있고, 약 3백 여종이 약용버섯으로 사용되고 있다. 이 중 본 연구에서 사용되는 버섯류로는 식용버섯에 표고버섯, 백목이버섯이 있으며, 영지버섯, 동충하초는 약용버섯으로 분류된다. 표고버섯은 주름버섯목 느타리과로 세계에서 많이 재배되는 버섯 중 하나라고 알려져 있다. 정신을 맑게 하는데 도움이 되는 렌티오닌을 함유하고 있으며, 면역력 향상, 식욕부진, 소화불량, 유즙 부족 및 신체 피로 회복과 같은 다양한 효능을 가지고 있다. 백목이버섯은 이형담자균류 은이목 은이과로 한국, 중국, 일본 등 전 세계에 분포되어 있으며, 정력 및 정기를 증강시키고, 만성기관지염이나 항동맥경화, 항고혈압 및 뛰어난 간장의 해독 능력을 가진 버섯으로 알려져 많은 연구가 진행되고 있다(Lee et al., 2012; Ge et al., 2020; Yoo & Kang, 2021). 오래전부터 약용버섯으로 취급되는 영지버섯은 민주름버섯목 구멍장이버섯과로 고분자 물질인 polysaccharide 외에도 triterpene과 같은 저분자 물질, 단백질, 아미노산 등 다양한 물질을 함유하고 있다. 특히 항종양억제율이 70-80%로 뛰어난 항종양 효과가 보고되었으며(Shiao et al., 1994), 혈압조절과 혈장 및 간세포 보호, 면역증가, 항산화, 항염, 항알레르기에도 활성을 가진다고 알려져 있다. 마지막으로 동충하초는 겨울철 곤충의 체내에서 서식하며 영양분을 흡수하고, 여름철에는 숙주를 파괴시켜 곤충 밖으로 자실체가 자라나는 맥각균목으로 성기능 저하, 심장병, 부정맥, 고혈압, B형 간염, 간경화, 악성암, 백혈병, 비염, 기관지염, 당뇨병, 류마티스 관절염 및 항암, 항종양기능 등에 대한 약리 효과를 가진다(Tsubura et al., 2011; Jeong & Choi, 2015).

마늘은 독특한 냄새와 뛰어난 항균작용이 있으며, 강정, 강장, 혈액순환개선, 해독, 살균작용 및 항암작용 등의 효과를 가진다. 마늘의 학명은 *Allium sativum*이며, 옛 시대부터 약용과 요리에 이용되어 왔고, 1990년대 이후 항암물질로 주목 받아 왔다(Arigo & Seki, 2006; Kim et al., 2010; Choi et al., 2019). 마늘의 대표성분인 황화합물 알리인(alliin)은 단백질로 특유의 냄새가 나지 않지만 마늘을 씹거나 다졌을 때 마늘의 표면에 상처가 나면 특유의 냄새가 난다. 이것은 알리인과 효소 알리나제의 결합에 의해 황을 포함한 단백질인 알리신이라는 휘발성물질로 변하기 때문이다. 마늘은 알리신이라는 티올성 화합물을 함유하고 있어 피톤치드 성질을 띠며, 여러 물질과 어렵지 않게 결

합하여 가공처리법에 따라 다양한 성질을 띠는 물질로 변하는 특성을 가진다(Chung, 2006). 미국의 국립암연구소(NCI)에서는 designer food program에서 70세가 되었을 때 암을 절반으로 줄일 수 있는 식품 중 하나로 마늘을 최상위로 꼽으며 designer food의 소재로 가장 주목 받고 있는 식품 중 하나이다.

본 연구에서는 국내에서 재배 가능한 버섯류와 마늘의 영양학적 기능과 이들에 함유된 기능성 유용성분의 생리활성을 분석하기 위해 각각의 버섯추출물과 마늘과의 혼합추출물을 제조하였다. 또한 버섯류의 일반성분, β -glucan, 유리당, 유기산의 함량 및 마늘의 알리인 함량을 조사하였고, *in vitro*에서 세포 독성 테스트를 거쳐 *in vivo*에서 흉선과 림프절 세포를 대상으로 연구를 수행하여 노인의 면역 증강 및 생리활성에 주요한 수단으로 개발 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

시료 및 기기

본 실험에서 사용되는 시료는 국내에서 생산된 버섯류 중 표고버섯(*Lentinula edodes*), 영지버섯(*Ganoderma lucidum*), 동충하초(*Cordyceps militaris*) 그리고 백목이버섯(*Tremella fuciformis*)의 4종과 (재)남해마늘연구소에서 2015년에 제조한 마늘분말을 사용하였다. 이를 분리 정제하여 버섯에 대한 일반성분은 AOAC방법에 따라 수행하였고, β -glucan 함량을 조사하기 위해 510 nm에서 흡광도(Agilent 8453, Agilent tech, Santa Clara, CA, USA)를 측정하였다. 그리고 고성능액체크로마토그래피(Agilent Technologies 1200 Series, Agilent tech)를 이용하여 유리당 및 유기산을 분석하였으며, 마늘 시료의 알리인 분석은 액체크로마토그래피(Agilent Technologies 1200 Series, Agilent tech) 및 자외선 흡광광도 검출기(Ultrascan Vis, Hunterlab, Reston, VA, USA)를 사용하여 208 nm에서 정량분석 하였다.

시료준비

각 시료들의 추출액을 제조하기 위해 동결건조 후 분쇄기로 세절하여 용매에 의한 가압열수로 추출하였다. 추출 시간에 따른 회수율은 10분에서는 80.5%, 70분에서는 88.8%가 나왔고, 70분 이상에서는 회수율의 변화는 없었으며, 추출압력은 압력을 높여 최대 15.2 MPa까지 높였을 때 회수율은 높아졌다. 따라서 glucan의 분리 조건은 추출 압력 10.1 MPa로 하여 30°C에서 70분 동안 진행 하였다. 그리고 여기서 얻어진 추출물은 메탄올 추출과정을 거쳐, 프로틴은 20% (w/v) TFA로 침전시켜 제거 하고 메탄올을 2:1 (v/v) 비율로 가하여 침전시킨 후 여기에 NaCl 용액을 가해주어 더 쉽게 침전물을 얻을 수 있었다. 침전물은 아세톤 등으로 세척하였다. 그리고 버섯류와 마늘의 용복합

적 특성을 확인하고 이를 활용한 즉, 세포활성 등이 우수한 고품질의 건강기능식품 개발을 위한 최적의 배합비를 설계하기 위하여, 각각 powder 상태로 얻어진 추출물들을 w/w%로 혼합하여 버섯류 4종의 혼합물(Mixed-M 1, Mixed-M 2)과 순수한 마늘(Garlic) 그리고 버섯류와 마늘의 혼합물(Mixed-M/G 1, Mixed-M/G 2)들에 대하여 실험하였다. 이들에 대한 대표적인 혼합비율을 Table 1에 나타내었다.

일반성분

버섯류에 대한 일반성분은 AOAC (Association of official Analytical chemists)방법에 따라 수행하였다. 수분은 버섯류 시료를 각각 0.5 g씩으로 하여 105°C의 dry oven에서 항량이 될 때까지 건조시켜 질량을 측정하여 구하였다. 조회분은 버섯류 시료 각각 0.5 g을 250°C에서 예비 회화한 후 600°C에서 회화 처리 한 후 함량을 계산하였고, 조단백질의 함량은 Kjeldahl법으로 측정된 질소량에 질소계수 6.25를 곱하여 계산하였으며, 조지방의 함량은 Soxhlet 추출법으로, 조섬유는 Henneberg Stohmann 개량법으로 구하였다. 그리고 총량에서 수분, 조회분, 조단백질, 조지방 및 조섬유의 함량을 제외한 값을 산출하여 가용성 무질소물의 함량으로 하였다.

β-glucan 함량

Total glucan을 구하여 α-glucan 량을 뺀 후, β-glucan 함량을 조사하였다. 먼저, total glucan을 구하기 위해 100 mesh 체로 거른 분쇄된 시료 100 mg을 순도 37% HCl 1.5 mL를 가한 후 30°C water bath에서 45분 동안 분해하였다. 여기에 증류수 10 mL를 넣어 혼합하고, 2시간 동안 100°C에서 incubation 한 후, room temperature에서 2 N KOH 10 mL씩 넣고 200 mM sodium acetate buffer로 100 mL를 정확히 재어 넣어준 뒤 충분히 교반시켰다. 그 후 상등액 0.1 mL에 200 mM sodium acetate buffer에 녹인 exo-1,3-β-glucan plus β-glucan 0.1 mL를, reagent blank는 0.2 mL의 acetate buffer를 넣고, D-glucose standard는 0.1 mL의 D-glucose standard와 0.1 mL의 acetate buffer를 혼합한 후 1시간 동안 40°C에서 incubation을 하였다. 여기에 GOPOD (glucose oxide/peroxidase mixture) 3 mL을 넣은 뒤 20분 동안 40°C에서 다시 incubation 한 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

α-glucan의 양을 측정하기 위해 100 mesh 체로 걸러 분쇄된 시료를 100 mg을 취한 뒤 tube에 넣고 2 M KOH 2 mL씩 가한 후 20분간 교반하였다. 여기에 1.2 M sodium acetate buffer 8 mL를 가한 후 mixing 한 다음, 아밀로글루코시다아제(amyloglucosidase; 130,000 U/mL, Sunson Industry Group Co., Beijing, China)와 인베르타아제(invertase; 45,000 U/g, Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan) 0.2 mL을 섞어 30분 동안 40°C water bath에서 incubation을 하였다. 상등액 0.1 mL에 200 mM sodium acetate buffer 0.1 mL와 GOPOD 3 mL를 가하고 20분 동안 40°C에서 incubation 하여 510 nm 흡광도에서 측정하였다.

유리당 및 유기산

유리당은 버섯 시료 1 g에 증류수를 넣어 60°C에서 4시간 추출한 후, 30분 동안 3,000 rpm에서 원심분리를 하여, 0.45 μm membrane filter (MF-Milipore, Milipore Co., Burlington, MA, USA)로 여과한 후 여액을 Hight (Agilent)를 이용하여 분석하였으며, 검출기는 ELSD, 이동상은 75% Acetonitrile을 사용하였다. 컬럼은 ZORBAX Carbohydrate (4.6 mm × 150 mm)을 사용하였고 컬럼의 온도는 30°C로 하였으며, 시료 주입량은 5 μL, 유속은 분당 1.4 mL로 하여 실험을 진행하였다.

유기산은 유리당과 같은 조건으로 처리한 후, HPLC를 이용하여 분석하였다. 이때 이동상은 pH 2.5의 25 mM KH₂PO₄를 사용하였고, 컬럼은 Grace Prevail Organic Acid (4.6 mm × 250 mm)을 사용하였으며, 컬럼의 온도는 30°C로 하였다. 검출파장은 210 nm, 시료 주입량은 5 μL, 유속은 분당 1.0 mL로 하여 실험을 진행하였다.

알리인

마늘의 알리인 분석은 시료를 pH 3.0으로 조절하기 위해 포름산을 가한 80% Methanol 용액을 넣어 10분간 초음파로 추출한 후 다시 80% Methanol (pH 3.0, 포름산) 용액으로 25 mL가 되게 재용해하여 0.45 μm membrane filter (Milipore)로 여과한 후 여액을 액체크로마토그래피 및 자외선흡광광도 검출기를 이용하여 208 nm에서 정량분석하였다. 분석조건으로 컬럼의 온도는 30°C로 하였으며, 이동상은 헵탄설폰산나트륨용액과 인산이수소나트륨(80:50)과 아세토니트릴용액을 사용하였고, 시료 주입량은 10 μL, 유량은 분당 0.4 mL로 하여 실험을 진행하였다.

Table 1. The composition of mixtures of 4 kinds of mushrooms and garlic (w/w%)

Samples	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Cordyceps militaris</i>	<i>Trenella fuciformis</i>	Garlic
Mixed-M 1	25	25	25	25	-
Mixed-M 2	11.1	22.2	33.3	33.3	-
Mixed-M/G 1	20	20	20	20	20
Mixed-M/G 2	10	20	30	30	10

독성검사 및 세포활성

버섯류, 마늘, 혼합물의 독성 여부와 적정 처리 농도를 결정하기 위해 각 추출물을 농도별로 Raw 264.7에서 처리하여 48시간 후에 MTT assay를 실시하였다. 면역 세포의 활성을 확인하기 위해 각 추출물을 경구 투여한 실험용 쥐 모델에서 흉선(thymocyte)과 림프절(lymph node, LN)을 분리하여 세포를 얻은 후 flow cytometry로 분석하였다.

결과 및 고찰

일반성분함량

국내에서 생산하는 버섯류의 일반성분 함량의 분석 결과는 Table 2에 나타냈으며, A, B, C, D는 백목이, 동충하초, 영지 그리고 표고버섯으로 수분은 각각 $8.55\pm 1.08\%$, $7.58\pm 1.45\%$, $6.47\pm 2.00\%$, $4.42\pm 1.03\%$ 으로 미생물이 번식하기 힘든 13% 이하를 유지 하였고, 버섯균이 이용하는 탄소원으로 버섯의 기본적인 골격을 이루는데 사용되는 가용성무질소물은 전체 100에서 수분, 회분, 조단백질, 조지방, 조섬유를 뺀 나머지를 말하며, 백목이버섯의 경우 시료간 중 수분과 회분의 함량이 다소 높은 값을 보였지만 조단백질, 조지방의 함량은 큰 차이를 보이지 않았고, 조섬유에서의 함량이 0%으로 가장 낮은 함량을 가져 가용성무질소물의 함량이 $69.46\pm 3.80\%$ 로 시료간 중 가장 우수한 값을 보였다. 그 다음으로 동충하초는 조단백질의 함량이 $26.36\pm 4.42\%$ 의 값으로 시료들 중 다소 높은 값을 보였지만, 조섬유의 함량이 백목이버섯 다음으로 낮은 값인 $4.96\pm 0.15\%$ 의 함량을 보여 가용성무질소물의 함량이 $55.66\pm 4.09\%$ 의 값을 보였다. 조섬유에서 $47.18\pm 4.35\%$ 로 제일 높은 함량을 가진 영지버섯의 경우 나머지 성분에서 대체적으로 비슷한 함량을 보였고 가용성무질소물의 함량이 $28.59\pm 3.70\%$ 으로 가장 낮은 값을 나타내는 분석결과를 보였다.

β -glucan 함량

다당류의 일종인 β -glucan은 인체의 정상적인 세포조직의 면역기능을 활성화시켜 면역기능을 활발하게 하고 항당뇨, 혈압조절 작용을 하며, 암세포가 있는 체내로 들어가 사이토카인(cytokine)을 생성시킴으로써 면역세포인 T세포와 B세포의 활동을 지원하여 세포조직의 면역기능을 활성화

시켜주는 역할을 한다(Alexander et al., 2018). 본 실험에서는 버섯 원물, 버섯 추출물 그리고 혼합 추출물에 대해 β -glucan의 함량을 분석하였고, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 우선 버섯 중 높은 β -glucan을 함유하고 있다고 보고된 꽃송이버섯의 경우 40% 이상의 β -glucan의 함량을 가지고 있고(Ohno et al., 2000), 본 실험에서는 시료 중 가장 높은 β -glucan 함량을 보인 것은 $36.38\pm 2.97\%$ 의 표고버섯으로 꽃송이 버섯과 β -glucan의 함량을 비교하였을 때 비슷한 함량치를 보였다. 그 다음으로는 영지버섯으로 $22.58\pm 4.38\%$ 의 함량을 보였다. 그리고 버섯 원물과 추출물의 β -glucan의 함량을 비교해 본 결과, 버섯 추출물의 함량의 수준이 낮은 경향을 나타냈다.

유리당 및 유기산

버섯의 유리당과 유기산의 함량은 외부표준법으로 계산하고 그 결과를 각각 Table 4, 5에 나타냈다. Fucose, Arabinose, Glucose, Sucrose 및 Lactose의 5가지 유리당을 분석하였고, 이중 주요 유리당은 Glucose와 Lactose로 나타났다. 표고버섯원물의 경우 유리당 함량이 가장 높았으나, 영지버섯원물은 유리당이 전혀 나타나지 않았다. 유기산은 Oxalic acid, Malic acid 및 Citric acid의 3가지가 검출되었으며, 여기서 Citric acid는 시료 중 백목이버섯 원물만이 검출되었고, Oxalic acid는 $2.48\pm 0.06\%$ 로 버섯 혼합물의 추출물이 시료 중 높은 함량을 보여주었다. 그리고 Malic acid는 표고버섯원물이 $10.89\pm 1.58\%$ 로 시료 중 많이 함유하고 있고, 전체적으로 유기산을 많이 함유하고 있는

Table 3. The β -glucan contents of mushrooms and extracts

Samples	β -glucan
A	13.85 ± 3.12
B	7.85 ± 1.85
C	22.58 ± 4.38
D	36.38 ± 2.97
E	10.33 ± 0.10
F	2.84 ± 0.69
G	17.71 ± 3.84
H	5.59 ± 2.01

A, *Tremella fuciformis*; B, *Cordyceps militaris*; C, *Ganoderma lucidum*; D, *Lentinula edodes*; E, *Tremella fuciformis* (liquid type); F, *Cordyceps militaris* (liquid type); G, *Ganoderma lucidum* (liquid type); H, *Lentinula edodes* (liquid type)

Table 2. The contents (%) of general ingredients of mushrooms

Samples	Moisture (%)	Ash (%)	Crude protein (%)	Crude fat (%)	Crude fiber (%)	Nitrogen free extract (%)
A	8.55 ± 1.08	3.59 ± 1.71	14.83 ± 3.05	0.57 ± 0.02	0	69.46 ± 3.80
B	7.58 ± 1.45	2.93 ± 0.84	26.36 ± 4.42	2.50 ± 0.05	4.96 ± 0.15	55.66 ± 4.09
C	6.47 ± 2.00	1.17 ± 0.22	14.78 ± 2.09	1.81 ± 4.35	47.18 ± 4.35	28.59 ± 3.70
D	4.42 ± 1.03	4.87 ± 0.60	25.53 ± 3.66	1.56 ± 2.81	9.36 ± 2.81	54.27 ± 2.84

A, *Tremella fuciformis*; B, *Cordyceps militaris*; C, *Ganoderma lucidum*; D, *Lentinula edodes*

Table 4. The contents (%) of free sugar of mushrooms and extracts

Samples	Fucose	Arabinose	Glucose	Sucrose	Lactose	Total
A	0	0	3.48+0.57	0	0.67+0.12	4.14+1.02
B	0	0	0.92+0.10	0	3.12+0.88	4.05+1.83
C	0	0	0	0	0	0
D	0	0.51+0.09	2.40+0.22	0	4.02+1.04	6.93+2.04
E	0	0	0.04+0.01	0	0	0.04+0.01
F	0	0	0.28+0.06	0	1.87+0.22	2.15+0.08
G	0.09+0.01	0	0.23+0.06	0.12+0.03	0.18+0.11	0.62+0.05
H	0	0.14+0.05	0.18+0.07	0	0.24+0.09	0.57+0.04
I	0.13+0.03	0	0.52+0.02	0.21+0.05	0.70+0.08	1.56+0.90

A, *Tremella fuciformis*; B, *Cordyceps militaris*; C, *Ganoderma lucidum*; D, *Lentinula edodes*; E, *Tremella fuciformis* (liquid type); F, *Cordyceps militaris* (liquid type); G, *Ganoderma lucidum* (liquid type); H, *Lentinula edodes* (liquid type); I, Mixed extract (liquid type)

Table 5. The contents (%) of organic acids of mushrooms and extracts

Samples	Oxalic acid	Malic acid	Citric acid	Total
A	0.10+0.01	0	0.37+0.05	0.47+0.06
B	1.21+0.05	3.22+0.22	0	4.42+0.23
C	0.10+0.03	1.41+0.14	0	1.50+0.05
D	0.67+0.04	10.89+1.58	0	11.55+1.09
E	0.06+0.02	0	0	0.06+0.02
F	0.97+0.02	0.22+0.09	0	1.19+0.16
G	0.04+0.04	0.12+0.05	0	0.17+0.05
H	0.44+0.05	1.76+0.11	0	2.20+0.12
I	2.48+0.06	0	0	2.48+0.06

A, *Tremella fuciformis*; B, *Cordyceps militaris*; C, *Ganoderma lucidum*; D, *Lentinula edodes*; E, *Tremella fuciformis* (liquid type); F, *Cordyceps militaris* (liquid type); G, *Ganoderma lucidum* (liquid type); H, *Lentinula edodes* (liquid type); I, Mixed extract (liquid type)

시료 역시 표고버섯원물로 확인되었다.

알리인

마늘의 주요 성분은 알리인(Alliin)으로 「건강기능식품의 기준 및 규격」에서 기능성분(또는 지표성분)의 함량으로 제시한 기준은 10 mg/g 이상의 알리인을 함유하고 있어야 하며, 중금속 부분에서는 납, 카드뮴, 총수은 그리고 총비소는 0.5 mg/kg 이하로 규격을 제시하고 있다. 그리고 대장균군은 음성으로 설정되어 있으며, 세균수(일반세균수)는 1 g 당 5,000 이하이어야 한다고 제시하고 있다. 본 연구에서는 남해마늘연구소에서 제조한 마늘의 상위 항목을 분석한 결과를 Table 6에 나타내었고, 평균적인 알리인 함량은 15.84±0.23의 값을 얻었으며, 중금속 분석, 대장균군 그리고 세균수를 측정된 결과 적합 판정을 받았다.

독성 검사 및 세포 활성

4종류의 버섯(표고, 영지, 동충하초 그리고 백목이)과 마늘, 그리고 혼합 추출물의 독성여부를 확인하고 적정 처리 농도를 확립하기 위해 Raw 264.7에 각 추출물을 농도별로

Table 6. Test items and results for garlic

Test items	Standard	Results
Description		Conformity
Bacterial count	3,000 cfu/g	4.3×10 ¹
Coliform group	Negative	Negative
Alliin	10 mg/g	15.84±0.23
Cadmium	≤ 0.5 mg/kg	Conformity
Lead	≤ 0.5 mg/kg	Conformity
Total arsenic	≤ 0.5 mg/kg	Conformity
Total mercury	≤ 0.5 mg/kg	Conformity

*Received a test report from Namhae Garlic Research Institute.

준비한 후 48시간 후에 MTT assay를 측정하였다. 그 결과 마늘을 제외한 버섯과 혼합 추출물(Mixed-M 1, Mixed-M 2, Mixed-M/G 1, Mixed-M/G 2)은 50 µg/mL에서 독성을 보여, 각 추출물 처리 농도를 EC₅₀ 12.5 µg/mL로 정하여 분석하였다(Fig. 1).

Raw 264.7에서 버섯과 마늘의 혼합 추출물에 의한 염증 반응 지표 물질의 감소효과를 ROS (Reactive oxygen species)와 NO의 양을 통해 분석하고자 Raw 264.7에 농도별로 각각의 추출물을 준비한 후 LPS (500 ng/mL)를 처리하여 ROS와 NO의 생성을 촉진시켰고, 그 결과를 Fig. 2과 3에 나타내었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 LPS에 의해 촉진된 ROS의 양은 Mixed-M 1, Mixed-M 2, Garlic, Mixed-M/G 2에서 다소 감소하였고, NO의 양은 대조군에 비해 모든 추출물에서 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(Fig. 3).

Fig. 4는 각 시료들에 대한 생체 내 실험결과이다. 3주간 이들에 한번 실험용 쥐 당 Mixed-M 1, Mixed-M 2, Garlic, Mixed-M/G 1, Mixed-M/G 2 추출물을 20 µg, 100 µg, 500 µg씩 경구 투여로 수행하였고, 3주 동안 실험용 쥐의 장기를 분리하여 무게 변화를 확인한 결과, 모든 실험용 쥐에서 독성을 보이지 않았음을 확인할 수 있었다. 3주 후 추출물 경구 투여에 의한 실험용 쥐의 장기 무게 및 길이를 측정하여 독성이 없는 것을 Fig. 5의 결과를 통

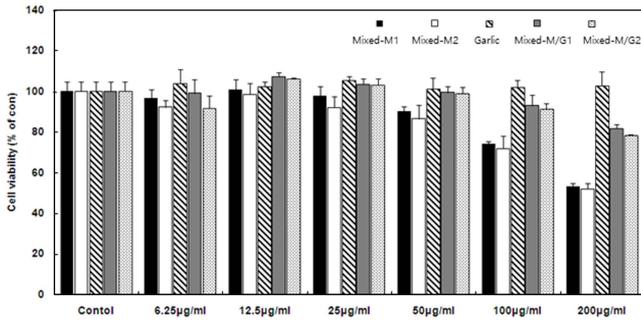


Fig. 1. Toxicity test of mushroom, garlic and mixed extracts through MTT assay in Raw 264.7.

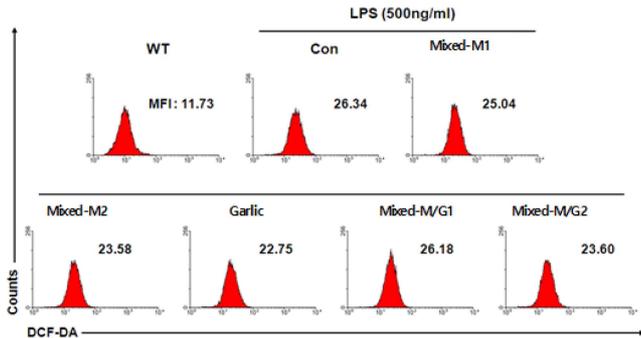


Fig. 2. Measurement of ROS by each extract in Raw 264.7.

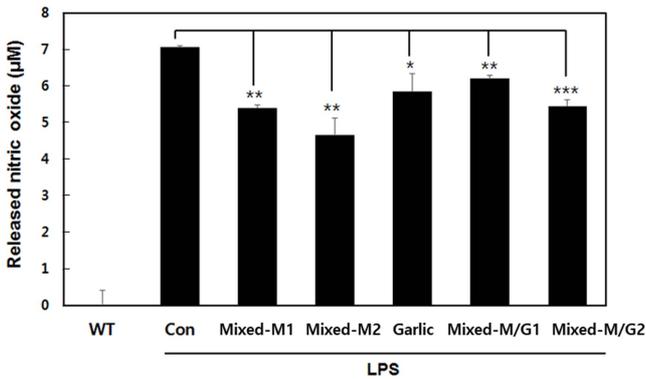


Fig. 3. Measurement of NO by each extract in Raw 264.7.

해 확인 하였다.

면역 세포의 활성을 확인하기 위해 각 추출물을 경구 투여한 실험용 쥐 모델에서 흉선(thymocyte)과 림프절(lymph node, LN)을 분리하여 세포를 얻은 후, CD4 (CD4 T cell marker), CD8 (CD8 T cell marker), CD69 (activation marker)항체로 형광 염색하였고, flow cytometry로 분석하였다. 먼저, 흉선에서 CD4 및 CD8 T cell의 비율을 분석한 결과, 각 추출물 경구 투여한 실험용 쥐 모델들을 비교했을 때 전체적으로 CD4 및 CD8의 비율은 증가되지 않았지만, Mixed-M/G 2 추출물이 모든 농도에서 CD4 T cell이 증가된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 다음으로

Group	Day	0	2	6	8	10	12	14	16
Control	100µg/mouse	100.00	102.38 (±2.34)	107.62 (±3.28)	106.92 (±6.26)	109.36 (±5.99)	114.52 (±7.12)	112.40 (±9.46)	113.06 (±7.32)
	20µg/mouse	100.00	102.05 (±2.06)	104.77 (±1.93)	106.80 (±2.11)	110.86 (±4.11)	112.34 (±3.31)	112.90 (±2.70)	114.22 (±2.18)
	100µg/mouse	100.00	106.07 (±3.30)	108.37 (±0.67)	115.42 (±2.71)	113.86 (±3.07)	117.21 (±0.74)	116.31 (±4.03)	118.23 (±2.70)
	500µg/mouse	100.00	103.27 (±2.77)	103.79 (±1.29)	107.09 (±3.27)	109.44 (±3.18)	111.26 (±2.91)	111.78 (±5.68)	113.28 (±3.94)
Mixed M1	100µg/mouse	100.00	103.95 (±5.16)	107.52 (±5.32)	111.47 (±10.48)	113.16 (±10.08)	116.18 (±11.57)	116.03 (±12.26)	116.27 (±13.82)
	20µg/mouse	100.00	102.25 (±0.23)	103.56 (±0.16)	109.07 (±1.76)	108.77 (±4.14)	113.82 (±1.29)	112.89 (±2.52)	112.86 (±5.63)
	100µg/mouse	100.00	100.88 (±0.33)	103.06 (±0.31)	107.73 (±0.04)	109.63 (±0.63)	115.38 (±0.41)	111.63 (±4.63)	114.35 (±5.34)
	500µg/mouse	100.00	100.88 (±0.33)	103.06 (±0.31)	107.73 (±0.04)	109.63 (±0.63)	115.38 (±0.41)	111.63 (±4.63)	114.35 (±5.34)
Garlic	100µg/mouse	100.00	100.36 (±1.10)	103.59 (±0.27)	104.20 (±2.72)	107.52 (±1.80)	112.35 (±0.74)	109.46 (±3.09)	111.88 (±2.91)
	20µg/mouse	100.00	101.45 (±3.13)	101.90 (±5.35)	104.08 (±5.33)	107.48 (±7.22)	111.90 (±7.19)	111.43 (±7.73)	113.53 (±7.89)
	100µg/mouse	100.00	101.79 (±0.36)	103.92 (±2.96)	107.23 (±1.53)	108.72 (±1.88)	113.38 (±3.21)	110.87 (±1.89)	114.64 (±4.58)
	500µg/mouse	100.00	103.32 (±0.71)	103.22 (±1.87)	106.03 (±1.88)	107.18 (±3.71)	109.22 (±1.42)	109.46 (±2.87)	109.86 (±3.12)
Mixed M/G1	100µg/mouse	100.00	102.97 (±2.33)	107.32 (±0.98)	107.61 (±3.56)	111.41 (±2.43)	113.66 (±0.36)	112.42 (±3.43)	110.14 (±0.38)
	20µg/mouse	100.00	102.76 (±2.00)	105.82 (±3.44)	108.61 (±3.96)	110.86 (±4.00)	116.77 (±0.98)	113.96 (±5.68)	116.21 (±2.02)
	100µg/mouse	100.00	102.26 (±0.96)	103.38 (±3.78)	105.69 (±2.88)	109.79 (±3.89)	111.70 (±1.10)	114.59 (±5.54)	114.25 (±4.18)
	500µg/mouse	100.00	101.31 (±1.65)	106.36 (±0.63)	107.17 (±0.88)	111.30 (±2.20)	113.11 (±2.88)	111.56 (±1.03)	114.89 (±7.17)
Mixed M/G2	100µg/mouse	100.00	102.44 (±0.66)	104.45 (±0.07)	109.14 (±4.19)	114.08 (±2.46)	114.37 (±5.45)	114.70 (±5.10)	115.98 (±3.78)
	20µg/mouse	100.00	102.26 (±0.96)	103.38 (±3.78)	105.69 (±2.88)	109.79 (±3.89)	111.70 (±1.10)	114.59 (±5.54)	114.25 (±4.18)
	100µg/mouse	100.00	101.31 (±1.65)	106.36 (±0.63)	107.17 (±0.88)	111.30 (±2.20)	113.11 (±2.88)	111.56 (±1.03)	114.89 (±7.17)
	500µg/mouse	100.00	102.44 (±0.66)	104.45 (±0.07)	109.14 (±4.19)	114.08 (±2.46)	114.37 (±5.45)	114.70 (±5.10)	115.98 (±3.78)

Fig. 4. Weight change in rats by oral injection of the extracts.

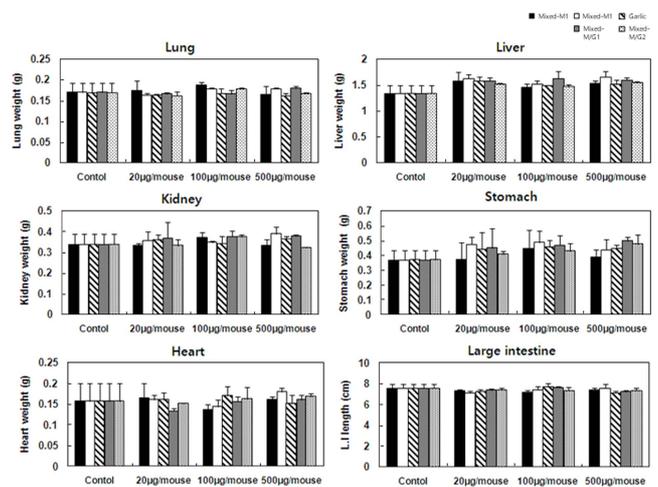


Fig. 5. The changes of organ weight and length in rats by oral injection of the extracts.

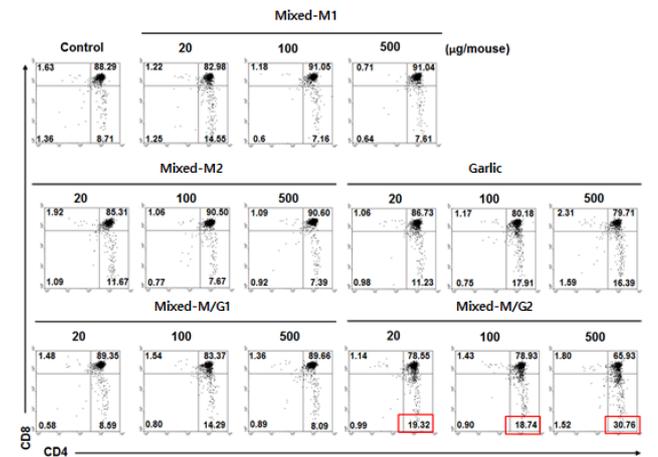


Fig. 6. The ratio of CD4 and CD8 in Thymus of rats by oral injection of the extracts.

Fig. 7은 LN에서의 결과값들이다. LN에서의 CD4 T cell의 활성을 확인하였고, 그 결과 모든 추출물에 의해 CD4 T cell이 증가하였음을 확인할 수 있었다. CD4 T cell은 다양한 사이토카인을 생산시켜 B cell와 T cell 등을 활성

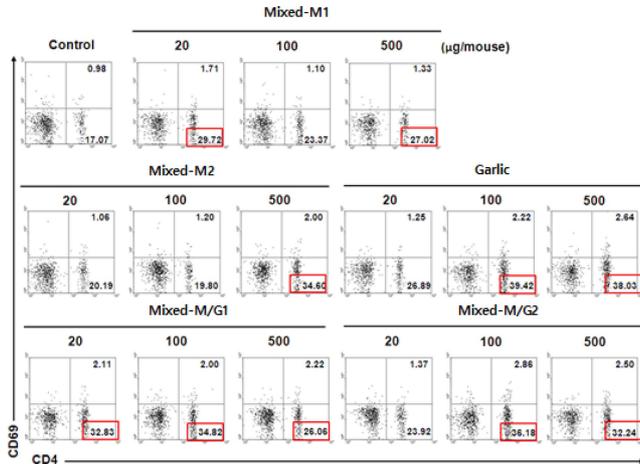


Fig. 7. The CD4 T cell activity in Lymph node of rats by oral injection of the extracts.

화시키기 때문에 T cell의 증가는 세포조직의 면역활성화 증가를 의미한다고 할 수 있다.

요 약

본 연구에서는 농산물인 버섯-마늘 추출물의 최적의 혼합물을 사용하여 생리활성 및 면역증가 등 그들의 특성을 조사하였다. 국내에서 재배되는 버섯과 마늘을 시료로 사용하였으며 유용성분을 분석하기 위해 각각의 추출물을 획득하고 이를 분리정제였다. 버섯의 일반성분의 함량과 β -glucan 함량, 유리당 및 유기산에 대한 함량을 비교한 결과 일반성분에서는 수분 $8.55 \pm 1.08\%$, 회분 $6.59 \pm 1.71\%$, 가용성무질소물 $69.46 \pm 3.80\%$ 의 함량을 가진 백목이버섯이 가장 높았고, 조단백질과 조지방에서 높은 함량을 보인 버섯으로는 동충하초로 각각 $26.36 \pm 4.42\%$, $2.50 \pm 0.05\%$ 을 나타내었다. 그리고 조섬유의 함량은 $47.18 \pm 4.35\%$ 의 영지버섯이 높았다. β -glucan 함량은 표고버섯이 $36.38 \pm 2.67\%$ 으로 가장 높았고 그 다음으로 영지버섯이 $22.58 \pm 4.38\%$ 의 수치를 보였다. 버섯의 유리당은 표고버섯원물인 경우 가장 높은 함량을 보여주었고, 영지 버섯의 원물인 경우 유리당이 전혀 나타나지 않았다. 유기산에서 Citric acid는 시료 중 백목이버섯 원물만이 검출되었고, 전체적으로 유기산을 많이 함유하고 있는 시료는 표고버섯원물로 확인되었다. 마늘은 「건강기능식품의 기준 및 규격」에서 제시한 알리인 함량, 중금속 및 대장균에 대한 규격에 대해 남해마늘연구소에서 적합판정을 받았다. 그리고 각각의 추출물에서 세포 독성 테스트를 거친 경구 투여한 실험용 마우스에서 흉선과 림프절 세포를 얻어 항암효과를 탐색한 결과, Mixed-M/G 2 추출물의 모든 농도에서 흉선세포와 림프절세포의 CD4 T cell이 증가하였음을 확인하였다. 본 연구결과로부터 Mixed-M/G 2 추출물이 버섯과 마늘의 혼합 시 시너

지 효과를 갖는 시료라고 사료되며 노인의 면역 증강 및 생리활성의 주요한 수단으로 개발 가능성을 기대해본다.

References

- Alexander MP, Fiering SN, Ostroff GR. 2018. Beta-glucan-induced inflammatory monocytes mediate antitumor efficacy in the murine lung. *Cancer Immunol Immunother*, 67: 1731-1742.
- An GH, Han JG, Cho JH. 2019. Antioxidant activities and β -glucan contents of wild mushrooms in Korea. *J. Mushrooms*, 17: 144-151.
- Ariga T, Seki T. 2006. Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: A review. *Biofactors*, 26: 93-103.
- Chaturvedi VK, Agarwal S, Gupta KK. 2018. Medicinal mushroom: boon for therapeutic applications. *3 Biotech*, 8: 1-20.
- Cheng HH, Hou WC, Lu ML. 2003. Interactions of lipid metabolism and intestinal physiology with *Tremella fuciformis* Berk edible mushroom in rats fed a high cholesterol diet with or without Nebacitin. *J. Agric. Food Chem*, 50: 7438-7443.
- Choi SH, Seung OT, Lee MS. 2019. Improving Effect to Cognitive Ability of Cordyceps militaris Extract in PC12 and BV2 cells. *KOCS*, 36: 468-478.
- Chung LY. 2006. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *J. Med. Food*, 9: 205-213.
- Gao Y, Chan E, Zhou S. 2004. Immunomodulating activities of *Ganoderma*, a mushroom with medicinal properties. *Food Rev. Int*, 20: 123-161.
- Ge X, Huang W, Xu X, Lei P, Sun D, Xu H, Li S. 2020. Production, structure, and bioactivity of polysaccharide isolated from *Tremella fuciformis* XY. *Int. J. Biol. Macromol*, 148: 173-181.
- Guggenheim AG, Wright KM, Zwickey HL. 2014. Immune modulation from five major mushrooms: application to integrative oncology. *Integr. Med (Encinitas)*, 13: 32-44.
- Hawksworth DL. 2001. Mushrooms: The extent of the unexplored potential. *Int. J. Med. Mushrooms*, 3: 333-337.
- Jeong JW, Choi YH. 2015. Anti-cancer properties and relevant mechanisms of cordycepin, an active ingredient of the insect fungus cordyceps spp. *J. Life Sci*, 25: 607-614.
- Jin Y, Lee YJ, Kim TH, Lim SJ, Chung WJ. 2020. Associations between chronic diseases and depression in the Korean elderly: A gender-specific analysis. *Korean J. Health Policy Adm*, 30: 231-244.
- Kim HJ, Han CH, Kim NY, Lee EK, Lee KN, Cho HE, Chong MS. 2010. Effect of garlic extracts with extraction conditions on antioxidant and anticancer activity. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 24: 111-117.
- Lee BE, Ryu SY, Kim EH, Kim YH, Kwak KA, Song HY. 2012. Immunostimulating effect of mycelium extract of *Phellinus linteus*. *Korean J. Pharmacogn*, 43: 157-162.
- Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HF. 2005. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediat. Inflamm*, 2005: 63-80.
- McCarty MF, DiNicolantonio JJ. 2020. Nutraceuticals have potential for boosting the type 1 interferon response to RNA viruses

- including influenza and coronavirus. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 63: 383-385 .
- Murphy EJ, Masterson C, Rezoagli E, O'Toole D, Major I, Stack GD, Rowan NJ. 2020. β -Glucan extracts from the same edible shiitake mushroom *Lentinus edodes* produce differential in-vitro immunomodulatory and pulmonary cytoprotective effects—Implications for coronavirus disease (COVID-19) immunotherapies. *Sci. Total Environ.* 732: 139330.
- Ohno N, Miura NN, Nakajima M, Yadomae T. 2000. Antitumor 1, 3- β -glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. *Bio. Pharm. Bull.* 23: 866-872.
- Shiao MS, Lee KR, Lin JJ, Wang CT. 1994. Natural products and biological activities of the chinese medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. In: *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II*. Ho CT, Osawa T, Huang MT, Rosen RT. (EDS). ACS. Washington, D.C., USA, pp 342-354.
- Shim JH, Choi WA, Kim JW, Lee HS, Baek TW, Cho MC, Lee KA, Sang BC, Yoon DY. 2003. Immune stimulating efficacy of soluble β -1,3-glucans. *Immune Netw.* 3: 156-163.
- Tsubura A, Lai YC, Kuwata M, Uehara N, Yoshizawa K. 2011. Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 11: 249-253.
- Waktola G, Temesgen T. 2018. Application of mushroom as food and medicine. *AIBM.* 113: 1-20.
- Yoo SH, Kang SA. 2021. Anti-inflammatory effects of polysaccharides isolated from *Tremella fuciformis* mycelium on dextran sulfate sodium-induced colitis model. *Korea J. Food & Nutr.* 34: 146-155.

Author Information

손준연: 조선이공대학교 생명환경화학공과 조교수

나행요: 조선대학교 공과대학 첨단소재공학과 박사과정
대학원생

손정선: 조선대학교 기초교육대학 자유전공학부 교수