

수삼추출물 첨가 mushroom complete medium에서 배양된 영지버섯 균사체의 면역증진 효과 및 활성다당류

김훈^{1,2} · 정재현¹ · 정헌상³ · 황중현 · 유광원*

충주대학교 식품영양학과, ¹충주대학교 식품공학과, ²(주)코시스바이오 기업부설연구소, ³충북대학교 식품공학과

Active Polysaccharide and Immune Enhancement of *Ganoderma lucidum* Mycelium Cultured in Mushroom Complete Medium Supplemented with Ginseng Extract

Hoon Kim^{1,2}, Jae-Hyun Jeong¹, Heon-Sang Jeong³, Jong-Hyun Hwang, and Kwang-Won Yu*

Department of Food and Nutrition, Chungju National University

¹Department of Food Science and Technology, Chungju National University

²R&D Center, Cosis Bio Corporation Limited

³Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University

Abstract After *Ganoderma lucidum* was cultured in mushroom complete medium (MCM) supplemented with ginseng extract (GE), crude polysaccharide (GL-GE-CP) was fractionated from mycelium. Among GL-GE-CP from mycelium in MCM supplemented with 5, 10, and 15% GE (v/v ratio of MCM to GE), GL-GE-15-CP (15% GE) most significantly enhanced macrophage stimulation and intestinal immune system modulating activity compared with GL-CP in MCM without GE. When GL-GE-15-CP was further fractionated on DEAE-Sepharose CL-6B, GL-GE-15-CP-II displayed more potent activity than subfractions from GL-CP on macrophage stimulation, interleukin-12 production, and intestinal immune system modulation (1.75-, 5.68-, and 1.76-fold, respectively). Anti-metastasis effect against colon 26-M3.1 carcinoma cells was also enhanced by GL-GE-15-CP-II (72.8% inhibition). In addition, GL-GE-15-CP-II contained neutral sugar (83.00%) and uronic acid (9.11%), and consisted of Ara, Man, Gal and Glc (molar ratio of 0.39:0.50:0.75:1.00). Furthermore, GE supplementation helped to enhance the immunomodulation in *G. lucidum*, and it is assumed that neutral polysaccharides play an important role.

Keywords: *Ganoderma lucidum* mycelium, ginseng extract, mushroom complete medium, polysaccharide, immunomodulation

서 론

예로부터 버섯은 식용이나 한방 및 민간에서 우수한 생약으로 사용되어 왔으며(1), 최근 들어 버섯에 함유되어 있는 각종 유용 성분이 규명됨으로써 버섯 유래 생리활성 물질의 개발과 이용은 산업적인 중요과제로 인식되고 있다(2,3). 버섯은 당질, 단백질, 비타민 및 무기질과 같은 영양소를 균형 있게 다량으로 함유하고 있어 식품으로서의 영양학적인 가치가 높아 식용으로 꾸준히 이용될 뿐만 아니라, 다양한 생리활성이 지속적으로 밝혀지면서 기능성식품 신소재로서의 소비 또한 꾸준히 증가하고 있다(4). 특히, 버섯류의 항균·항바이러스 작용, 콜레스테롤 저하작용, 혈압 강화작용, 항혈전작용, 인터페론 유도작용, 면역증강작용 및 항종양작용 등의 다양한 효과가 보고되고 있으며(5-7), 이와 관련된

생리활성 물질의 탐색과 개발 및 이용에 대한 산업적 관심이 매우 고조된 상태이다. 현재 schizophyllan, lentinan, PS-K(또는 krestin)는 버섯으로부터 추출한 성분으로 이미 면역증강제로 시판되고 있으며, *Agaricus blazei*, *Phellinus linteus*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceum*, *Cordyceps sinensis* 등의 버섯류도 기능성식품 소재 또는 부가가치가 높은 천연 생리활성을 갖고 있어 현재 활발한 연구가 진행되고 있다(8-10).

영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 우리나라에서 만년버섯 또는 불로초라 불렀던 버섯으로 전통적으로 한방에서는 건위, 건뇌, 강장, 이뇨, 해독, 항균, 면역, 진해, 진통, 신경쇠약, 불면증, 급·만성 간염, 위궤양, 혈압강하 등에 효과가 있는 약용버섯으로서 이용되어 왔다(11). 현재 영지버섯에는 항암 및 항산화작용, 돌연변이 억제작용, 항염증작용, 고지혈증 개선, 혈당강하작용 및 항고혈압작용(12-15) 등의 효능이 보고되어 있으며, 영지버섯 다당체에 관한 연구로는 Zhu 등(16)이 영지버섯에서 분리된 다당류를 자가면역질환 mouse에 투여하여 면역회복 효과를 보고한 것과 Ji 등(17)이 영지버섯에서 추출한 다당류의 NO 및 사이토카인 생성 등에 관한 면역작용을 보고하였다. 그러나 지금까지 면역활성과 관련된 영지버섯의 연구와 이용은 주로 사실체를 대상으로 진행함으로써(18,19) 배양기간에 따른 산업적 이용성의 제약으로 최근에는 액체배양으로 조제된 균사체 또는 배양액으로부터 생리

*Corresponding author: Kwang-Won Yu, Department of Food and Nutrition, Chungju National University, Jeungpyeong, Chungbuk 368-701, Korea
Tel: 82-43-820-5333
Fax: 82-43-820-5850
E-mail: kwyu@cjnu.ac.kr
Received May 14, 2011; revised June 27, 2011;
accepted June 30, 2011

활성 소재를 탐색하는 연구에 많은 관심이 모아지고 있다(14,15,19). 또한, 본 논문의 주된 연구내용인 균사체의 생리활성을 증진시키기 위한 방법으로 일반배지에 수삼 등의 생약추출물을 첨가한 혼합배지에서 균사체를 배양하거나 배양된 균사체로부터 면역활성에 관여하는 다당류를 분리하는 연구는 거의 보고되지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 기존의 버섯 균사체 액체배양과는 달리, 균사체 일반배지에 수삼추출물을 첨가한 혼합 액체배지에서 영지버섯 균사체(수삼추출물-영지 균사체)를 배양하여 균사체만을 회수한 후 이들의 면역활성을 수삼추출물이 첨가되지 않은 일반배지에서 배양된 영지 균사체(일반-영지 균사체)와 비교하여 면역활성이 증진된 균사체를 제조하고자 하였다. 또한, 수삼추출물-영지 균사체의 면역활성이 일반-영지 균사체보다 증진되는 주요 활성성분으로 다당류에 초점을 맞추어 이를 분획하고 구성당을 밝힘으로써 새로운 기능성소재로서 개발가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

영지버섯 균주 및 수삼추출물 조제

본 연구에 사용한 영지버섯(*Ganoderma lucidum*, GL) 균주는 충청북도 농업기술원(Cheongwon, Korea)으로부터 분양받아, potato dextrose agar(PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)의 사면배지에서 30°C로 10일간 배양한 후 4°C에 보존하면서 4주마다 계대배양하여 사용하였다. 또한 면역활성 증진을 위하여 균사체 일반배지에 첨가한 수삼추출물(ginseng extract, GE)은 2008년도에 충청북도 증평군 일원에서 수확한 5년근 파삼을 증평군인삼연구회(Jeungpyeong, Korea)에서 구입하여 열수추출한 후 65°Bx로 농축하여 본 연구에 사용하였다.

수삼추출물 첨가 혼합 액체배지에서 배양된 영지버섯 균사체

10여종의 다양한 일반배지를 이용하여 영지버섯 균사체의 생육을 검토하여, 가장 왕성한 균사체 생육을 나타낸 mushroom complete medium(MCM)을 기본배지로 선정하였으며, 그 조성은 액체배지 1 L에 glucose(20 g), peptone(2 g), yeast extract(2 g), K_2HPO_4 (1 g), KH_2PO_4 (0.4 g)와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5 g)이었다. 한편, 이와 같이 선정된 MCM 일반배지의 배양조건을 검토하여, 초기 pH 5.5와 30°C에서 10일간 배양으로 균사체 생육의 최적조건을 확립하고 이 조건에서 종균을 배양하였다. 다음으로 GE가 첨가된 수삼추출물-영지 균사체를 조제하기 위하여 50-L jar fermenter system(Fermenter Co., Ltd., Cheongwon, Korea)에서 MCM 일반배지에 65°Bx GE를 각각 5, 10 및 15%(v/v, 5, 10 및 15% GE) 첨가하여 혼합배지를 만들고 균사체 종균을 10%(v/v) 접종한 후 pH 5.5, 온도 30°C, 교반속도 120 rpm과 통기속도 0.4 vvm으로 배양하였다. 5일 후 균사체를 원심분리(7,600×g, 30 min, 4°C)에 의해 배양액과 분리하고 회수한 균사체를 동결건조하여 GE 첨가농도에 따른 수삼추출물-영지 균사체(GL-GE-5, 10과 15)로 조제하였다.

수삼추출물-영지버섯 균사체로부터 면역활성 조다당의 조제

MCM 일반배지에 GE를 5, 10 및 15% 첨가한 혼합 액체배지에서 영지버섯 균사체를 배양한 후 균사체만을 동결건조하여 조제한 수삼추출물-영지 균사체(GL-GE-5, 10과 15)에 소량의 증류수를 첨가하여 homogenizer로 5,000 rpm에서 10분간 균질화한 후 20배의 증류수를 가하여 열수추출하고 여과지(No. 2, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 잔사를 분리하였다. 여과

액은 원심분리(7,600×g, 30분, 4°C)를 통해 불용성 침전물을 제거하고 농축, 투석(Spectra/Por 4, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) 및 동결건조하여 열수추출물(GL-GE-5, 10과 15-HW)로 조제하였다. 열수추출물을 다시 증류수에 용해시키고 5배의 에탄올을 첨가하여 교반한 후 원심분리하여 침전물을 회수하고 이를 소량의 증류수에 재용해하여 투석, 원심분리, 농축 및 동결건조를 거쳐 GE 첨가농도에 따른 수삼추출물-영지 균사체의 조다당획분으로 조제하였다(5% GE 첨가; GL-GE-5-CP, 10% GE 첨가; GL-GE-10-CP, 15% GE 첨가; GL-GE-15-CP). 한편, 면역활성 및 성분분석 시료대조군으로서 GE를 첨가하지 않은 MCM 일반배지로만 배양한 일반-영지 균사체도 상기와 동일한 방법으로 처리하여 열수추출물(GL-HW) 및 조다당획분(GL-CP)으로 조제하였다.

수삼추출물-영지버섯 균사체 조다당으로부터 면역활성 다당류의 분획

수삼추출물-영지 균사체 조다당획분(GL-GE-5-, 10-과 15-CP) 중 가장 높은 마크로파지 및 Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성을 나타낸 15% GE 첨가 수삼추출물-영지 균사체 조다당획분(GL-GE-15-CP)을 물에 용해한 후 증류수로 평형화시킨 DEAE-Sephacrose CL-6B(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)가 충전된 column(Cl⁻ form, 4.0×30.0 cm)에 loading하였다. 증류수로 비흡착 획분(GL-GE-15-CP-I)을 먼저 용출시킨 후 0.1, 0.2, 0.3과 0.4 M NaCl 용액으로 흡착획분을 용출시키고 투석, 농축 및 동결건조하여 GL-GE-15-CP-II, III, IV와 V의 획분으로 분획하였다. 시료대조군으로서 일반-영지 균사체의 조다당획분(GL-CP)도 동일 column에서 분획하여 증류수 용출획분(GL-CP-I)과 0.1~1.0 M NaCl 농도별 용출획분으로(GL-CP-II~VII) 분획하였다.

조다당으로부터 분획된 면역활성 다당획분의 구성분 및 구성당 분석

DEAE-Sephacrose CL-6B로 분획된 면역활성 다당획분의 구성분은 중성당, 산성당 및 단백질 함량을 표준물질인 glucose, galacturonic acid와 bovine serum albumin(BSA)을 사용하여 phenol-sulfuric acid법(20), *m*-hydroxybiphenyl법(21)과 Bio-Rad dye(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용한 Bradford법(22)으로 분석하였다. 한편, 활성 다당획분의 구성당은 Jones와 Albersheim(23)의 방법으로 분석하였는데, 먼저 시료를 2.0 M TFA(trifluoroacetic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 121°C에서 1.5시간 가열하여 가수분해시킨 후 $NaBH_4$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 각 구성당을 alditol로 환원시키고 acetic anhydride(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 alditol acetate 유도체로 전환시켰다. 합성된 유도체는 SP-2380 column(0.2 μm film thickness, 0.25 mm i.d×30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 gas chromatograph(Young Lin Co., Ltd., Anyang, Korea)를 이용하여 분석하였는데, 시료 구성당은 표준당의 retention time과 비교하여 분석하였고 구성당 mole %는 각 peak의 면적비와 alditol acetate 유도체 분자량으로 계산한 후 정량화하고 그 비율을 molar ratio로 표시하였다(24).

실험동물과 시약

Female 6주령의 ICR, C3H/He 및 BALB/c 마우스는 (주)샘타코(Osan, Korea)에서 구입한 후 사육조에 넣고 정수된 물과 실험동물용 펠릿사료(Samyang Co., Incheon, Korea)를 자유공급하였다. 면역활성 측정을 위한 동물세포 배양의 RPMI 1640 배지와 Hank's

balanced salt solution(HBSS)은 Gibco-BRL Co.(Grand Island, NY, USA)로부터, fetal bovine serum(FBS)은 Cell Culture Laboratories(Cleveland, OH, USA)에서, penicillin, streptomycin 및 amphotericin B는 Flow Laboratories(Irvine, Scotland)에서 구입하였다. 한편, Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성화에서의 골수세포 증식을 측정하기 위한 Cell Counting Kit(CCK)-8은 Dojindo Laboratories(Kumamoto, Japan)에서 입수하였다.

마크로파지 활성화 및 IL-12 생산능

마크로파지 활성화는 ICR 마우스를 이용하여 복강 내 마크로파지의 lysosomal phosphatase 활성화로 측정하였다. 먼저, ICR 마우스 복강에 2 mL의 thioglycollate 배지를 주입하고 72시간 경과 후 복강으로 유도된 마크로파지를 RPMI 1640 배지를 이용하여 회수하였다. 마크로파지는 동일 배지로 3회 세척한 후 1×10^6 cell/mL이 되도록 배지에 분산시키고 96-well plate에 200 μ L씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양함으로써 well plate 기벽에 macrophage monolayer를 형성시켰다(25). 부착되지 않은 세포들은 배지로 3번 세척하여 제거하고 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지를 각 well에 180 μ L씩 분주한 후 적당히 희석한 시료 20 μ L을 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 마크로파지를 자극하였다. 24시간 배양 후 상등액을 제거하고 시료로 자극받은 마크로파지에 0.1% Triton X-100(Sigma-Aldrich, St. Louis, AL, USA) 25 μ L을 가하여 마크로파지 세포막을 용해시키고 분비된 lysosomal phosphatase의 기질로 100 mM *p*-nitrophenyl phosphate(150 μ L)와 0.1 M citrate buffer(50 μ L)를 첨가한 후 산성상태에서 반응시켰다. 1시간 후 0.2 M borate buffer를 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA reader(Sunrise, TECAN, Grödingen, Austria)로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 saline 대조군에 대한 relative activity(%)로 시료의 마크로파지 활성을 나타내었다(26). 한편, 활성화된 마크로파지는 Th₀ 세포를 자극하여 Th₁ 세포로의 분화를 촉진하거나 자연살해세포(natural killer cell)의 활성화에 관여하는 interleukin(IL)-12의 사이토카인 생산을 촉진하는 것으로 알려져 있기 때문에(27) 시료의 마크로파지 활성화에 대한 영향을 cytokine level에서 확인하기 위하여 시료와 마크로파지 배양액을 회수하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 이용한 kit(Pharmingen, San Diego, CA, USA)로 IL-12 생산능을 측정하였다.

Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성화

C3H/He 마우스 복부를 절개하여 소장벽 위에 존재하는 Peyer's patch를 조심스럽게 적출한 후 HBSS 용액이 담겨진 petridish에 옮겨 마쇄하고 0.2% NaCl과 금속망을 이용하여 적혈구와 이물질을 제거한 후 Peyer's patch 세포현탁액을 조제하였다. 세포현탁액은 5% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지로 세척하여 2×10^6 cell/mL의 세포농도로 조정된 후 96 well plate에 180 μ L씩 분주하고 적당한 농도로 희석한 시료를 20 μ L씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 골수세포 증식활성에 사용하였다. 골수세포는 동일종 마우스의 대퇴부 뼈로부터 회수하여 여과, 세척하고 2.5×10^5 cell/mL의 세포농도로 조정된 후 96 well plate에 100 μ L씩 분주하였다. 분주된 골수세포에 위에서 언급한 Peyer's patch 세포와 시료의 배양상등액과 5% FBS 함유 RPMI 1640 배지를 각각 50 μ L씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일간 배양하였다(28). 시료의 Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성화는 6일간 배양된 배양액에 CCK-8 용액(29) 20 μ L를 첨가하고 4시간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를

측정하여 saline 대조군의 골수세포 증식도에 대한 relative activity(%)로 나타내었다.

종양전이 억제활성

시료의 종양전이 억제효과는 colon 26-M3.1 lung carcinoma를 이용한 BALB/c 마우스 종양전이 모델에서 측정하였다(30). 즉, 영지 균사체 시료로부터 조제된 다당획분 시료를 마우스에 정맥 주사하고(50, 200 μ g/mouse) 2일 후에 colon 26-M3.1 lung carcinoma 세포(3×10^4 cell/mouse)를 정맥주사한 다음, 14일이 경과되면 마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 시료의 종양전이에 대한 예방효과를 측정하였다. 적출된 폐는 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정시킨 후 군집 수를 측정하여 시료의 투여 없이 종양만 접종한 대조군(tumor control)과 비교함으로써 종양전이 억제효과를 조사하였다.

통계처리

실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 실험결과와 평균과 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하여 평균치 \pm SD로 나타내었으며 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 각 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

수삼추출물-영지버섯 균사체의 열수추출물 및 조다당획분의 면역활성

50 L jar fermenter에서 mushroom complete medium(MCM)만으로 5일간 배양한 후 균사체를 회수하고 동결건조하여 시료대조군인 일반-영지 균사체(GL)를 조제하였다. 또한, GL보다 면역활성이 증진된 균사체를 조제하기 위하여 MCM 기본배지에 65°Bx 수삼추출물(GE)을 5, 10 및 15% 첨가한 혼합 액체배지에서 배양한 수삼추출물-영지 균사체(GL-GE-5, 10, 15)도 동결건조하였다. GE 첨가농도에 따른 면역활성 증진효과를 측정하고 활성 다당류를 분리하기 위하여 각 균사체를 열수추출 및 에탄올 침전처리하여 시료대조군인 일반-영지 균사체의 열수추출물(GL-HW)과 조다당획분(GL-CP, 수율 0.74%) 및 수삼추출물-영지 균사체의 열수추출물(GL-GE-5-, 10-, 15-HW)과 조다당획분(5% GE; GL-GE-5-CP 원료대비 수율 1.42%, 10% GE; GL-GE-10-CP, 수율 1.96%; 15% GE; GL-GE-15-CP, 수율 2.94%)으로 분획하였다. 먼저, ICR 마우스의 복강으로부터 회수한 마크로파지 활성을 비교한 결과, 수삼추출물-영지 균사체의 열수추출물(GL-GE-5, 10-, 15-HW)에서는 시료대조군인 GL-HW와 유의적인 활성의 차이를 보이지 않았으나, 조다당획분에서는 GL-GE-15-CP(saline 대조군의 1.56배)가 시료농도 100 μ g/mL에서 GL-CP(1.40배)보다 유의적으로 활성이 증가되었음을 알 수 있었다(Table 1A). 이러한 경향은 소장 내 Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성화에서도 유사하게 나타나 열수추출물의 경우에는 시료대조군인 GL-HW와 유의적인 활성의 차이를 보이지 않았으나, GL-GE-15-CP의 경우(1.44배)에 GL-CP(1.32배)보다 유의성은 없었으나 활성이 증가됨을 확인할 수 있었다(Table 1B). 면역활성 결과로부터 MCM 배지에 GE가 15% 첨가된 혼합 액체배지에서의 영지버섯 균사체 배양은 면역활성 증진에 영향을 주고 있음을 확인할 수 있었으며, 고분자물질이 주성분인 조다당획분으로 분획되었을 때 활성차이가 커짐으로써 다당류 또는 단백다당 등의 고분자 물질이 활성증진에 관여하고

Table 1. Immunomodulating activity of fraction from *Ganoderma lucidum* mycelium cultured in mushroom complete medium (MCM) supplemented with ginseng extract (GE)

(A) Macrophage stimulating activity		
Fraction (100 µg/mL) ¹⁾	Relative activity (%)	
Control (saline without sample)	100.00±10.36 ^{aA2)}	
GL	122.29±4.04 ^b	
Hot-water extract (HW)	GL-GE-5	114.56±4.04 ^b
	GL-GE-10	124.23±8.72 ^b
	GL-GE-15	123.23±7.49 ^b
Crude polysaccharide (CP)	GL	139.97±4.44 ^{BC}
	GL-GE-5	134.32±4.03 ^B
	GL-GE-10	149.30±8.26 ^{CD}
GL-GE-15	156.43±5.03 ^D	
(B) Intestinal immune system modulating activity through Peyer's patch		
Fraction (100 µg/mL)	Relative activity (%)	
Control (saline without sample)	100.00±2.77 ^{aA}	
GL	119.44±4.10 ^{bc}	
Hot-water extract (HW)	GL-GE-5	111.12±6.49 ^b
	GL-GE-10	121.33±8.94 ^c
	GL-GE-15	122.11±9.53 ^c
Crude polysaccharide (CP)	GL	131.96±9.46 ^B
	GL-GE-5	132.37±7.56 ^B
	GL-GE-10	142.29±9.72 ^B
GL-GE-15	144.40±15.5 ^B	

¹⁾GL; *G. lucidum* mycelium cultured in only MCM without GE, GL-GE-5/10/15; *G. lucidum* mycelium cultured in MCM supplemented with 5, 10, or 15% GE.

²⁾Results expressed are mean±SD of quadruplicate samples, and means with different superscript letters are significantly different in HW^(a-c) or CP^(A-D).

있음을 알 수 있었다.

한편, 열수추출물로부터 에탄올 침전에 의해 분획된 조다당획분은 주로 다당류 또는 단백다당의 고분자물질로 구성되어 있으므로(31), 수삼추출물-영지 균사체 조다당획분(GL-GE-15-CP)의 면역활성 증진에 관여하는 조다당획분의 특성을 검토하기 위하여 일반-영지 균사체 조다당획분(GL-CP)과 주요 구성분으로서 중성당, 산성당과 단백질을 비교하였다. GL-GE-15-CP는 73.13%의 중성당과 20.04%의 산성당 및 6.83%의 단백질로 구성되어 있는 반면, 시료대조군인 GL-CP는 87.62% 중성당과 산성당(7.03%) 및 단백질(5.35%)을 소량 함유하고 있음을 확인할 수 있었다(Table 2). 즉, GL-GE-15-CP는 GL-CP보다 중성당은 감소하면서 상대적으로 산성당이 증가되어 다당류 주성분인 중성당과 산성당 함량에서 GL-CP와 유의적인 차이를 나타냄으로써 면역활성 증진에 주로 다당류가 관여할 가능성을 제시해 주었다. 따라서 GL-GE-15-CP와 시료대조군인 GL-CP를 음이온교환수지로 분획하여 활성을 비교하고 활성 다당획분에 대한 구성분 및 구성당을 검토함으로써 수삼추출물-영지 균사체로부터 분리된 활성 다당획분의 구조적 특성을 제시하고자 하였다.

조다당획분의 DEAE-Sepharose CL-6B 분획 및 면역활성

일반-영지 균사체 조다당획분보다 면역활성이 증진된 15% GE 첨가 혼합 액체배지에서 배양된 수삼추출물-영지 균사체 조다당획분(GL-GE-15-CP)으로부터 면역활성 다당획분을 분리하기 위하

Table 2. Chemical content and component sugar analysis of the active fraction from GL-CP or GL-GE-15-CP on DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography

Fraction ¹⁾	GL-CP	GL-CP-II	GL-GE-15-CP	GL-GE-15-CP-II
Yield (%) ²⁾	0.74	0.13	2.94	0.16
Chemical content (%) ³⁾				
Neutral Sugar	87.62±3.74 ^{bc}	89.53±2.21 ^c	73.13±3.86 ^a	83.00±3.68 ^b
Uronic acid	7.03±0.81 ^{ab}	5.82±0.62 ^a	20.04±2.65 ^c	9.11±1.56 ^b
Protein	5.35±0.65 ^{ab}	4.65±1.08 ^a	6.83±1.48 ^{bc}	7.89±1.64 ^c
Component sugar (mole%)				
Arabinose		0.77		12.67
Xylose		6.53		1.72
Rhamnose		0.25		0.97
Fucose		10.11		3.15
Mannose	ND	28.32	ND	16.02
Galactose		31.77		24.09
Glucose		16.43		32.27
Uronic acid		5.82		9.11

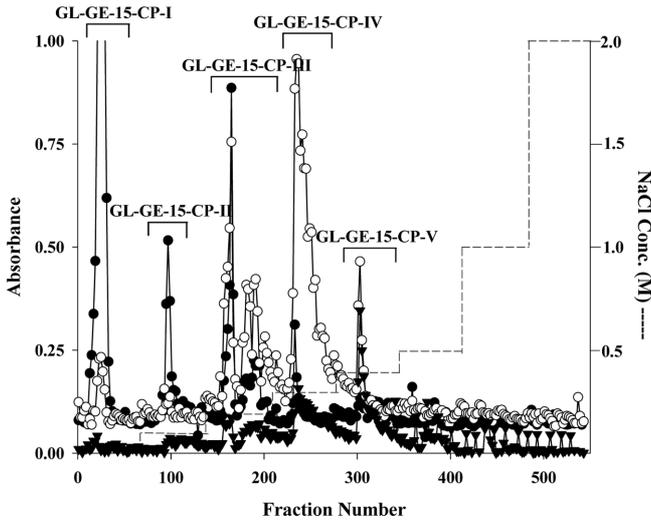
¹⁾GL-CP or GL-GE-15-CP; crude polysaccharide from *Ganoderma lucidum* mycelium cultured in MCM without GE or supplemented with 15% GE, GL-CP-II or GL-GE-15-CP-II; the active fraction eluted by 0.1 M NaCl.

²⁾Yield; percentage (%) against of the raw material weight.

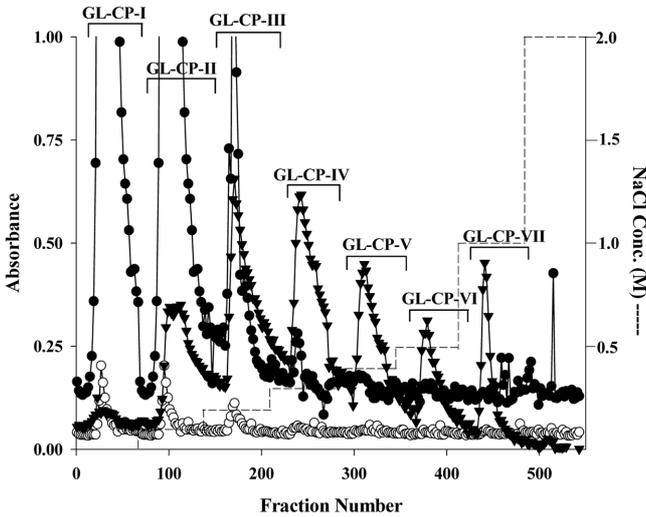
³⁾Results expressed are mean±SD of quadruplicate samples, and means with different superscript letters^(a-c) were significantly different in each nutrient. ND; not determined.

여 DEAE-Sepharose CL-6B(Cl⁻ form)의 음이온교환수지를 이용한 크로마토그래피를 실시하였다. GL-GE-15-CP는 증류수로 용출된 1개의 비흡착 획분(GL-GE-15-CP-I, DEAE loading 양 대비 수율 12.20%)과 NaCl 0.1-0.4 M에서 용출된 4개의 흡착획분(0.1 M; GL-GE-15-CP-II 수율 5.33%, 0.2 M; GL-GE-15-CP-III 수율 16.47%, 0.3 M; GL-GE-15-CP-IV 수율 16.20%, 0.4 M; GL-GE-15-CP-V 수율 1.80%)으로 분획되었다(Fig. 1A). 한편, 시료대조군인 GL-CP도 동일 컬럼에서 분획하여 GL-CP-I(DIW 용출획분, 수율 8.26%), GL-CP-II(0.1 M, 수율 17.12%), GL-CP-III(0.2 M, 수율 12.46%), GL-CP-IV(0.3 M, 수율 3.36%)와 GL-CP-V(0.4 M, 수율 2.44%) 및 GL-CP-VI(0.5 M)와 1.0 M 용출획분(GL-CP-VII)을 얻을 수 있었다(Fig. 1B). 그러나 GL-GE-15-CP에서 NaCl 0.5 M 이상 농도에서 용출되는 획분이 검출되지 않았고, GL-CP의 NaCl 0.5와 1.0 M 농도에서 용출된 획분은 중성당 및 산성당 함량이 극히 적었기 때문에 GL-CP-VI와 VII은 시료대조군에서 제외시켰다. 조다당획분의 DEAE profile를 비교한 결과, GL-GE-15-CP로부터 0.1 M NaCl에서 용출된 획분(GL-GE-15-CP-II)은 시료대조군인 GL-CP-II보다 중성당과 단백질이 현저히 감소되는 profile을, 0.2 M과 0.3 M NaCl에서 용출된 획분인 GL-GE-15-CP-III와 IV에서는 시료대조군보다 산성당이 현저히 증가되면서 단백질이 감소된 profile을 나타내었다. 또한, GL-GE-15-CP 분획에서는 NaCl 0.5 M 이상의 농도에서 GL-CP 분획과는 다르게 획분으로 인정될 만한 profile이 검출되지 않아 수삼추출물-영지 균사체 조다당획분은 시료대조군인 GL-CP와는 다른 다당류의 구성 및 분포를 나타내고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

한편, DEAE-Sepharose CL-6B의 음이온교환수지를 통하여 분획된 획분들의 면역활성을 검토한 결과, Fig. 2에서 나타난 바와 같이 마이크로파지 활성에서는 GL-GE-15-CP로부터 분획된 GL-GE-



(A) Fractionation of GL-GE-15-CP



(B) Fractionation of GL-CP

Fig. 1. Elution profile of GL-GE-15-CP or GL-CP on DEAE-Sephrose CL-6B column chromatography (Cl⁻ form). GL-GE-15-CP; crude polysaccharide from *Ganoderma lucidum* mycelium cultured in mushroom complete medium (MCM) supplemented with 15% ginseng extract (GE), GL-CP; crude polysaccharide from *G. lucidum* mycelium cultured in only MCM without GE. Column size; 4.0×30 cm. ●; carbohydrate (490 nm), ○; uronic acid (520 nm), ▼; protein (280 nm).

15-CP-II와 III이 시료농도 100 µg/mL에서 조다당(saline 대조군의 1.46배) 및 다른획분들(1.29-1.57배)보다 유의적으로 높은 매크로파지 활성(1.75, 1.80배)을 나타내었다. 또한, 시료대조군과의 활성비교에서도 동일 NaCl 농도에서 용출된 GL-CP-II와 III(1.48, 1.64배)보다도 유의적으로 매크로파지 활성이 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 2). 한편, 매크로파지 활성을 갖는 주요 획분들을 대상으로 활성화된 매크로파지로부터 분리되어 자연살해세포 또는 T 세포 분화 및 활성화에 관여하는 cytokine으로 알려진 IL-12 생산능을 비교한 결과, 100 µg/mL의 시료농도에서 수삼추출물-영지 균사체의 GL-GE-15-CP(4.29배)와 GL-GE-15-CP-II(5.68배)는 시료대조군인 GL-CP(3.26배) 또는 GL-CP-II(4.46배)보다 유의적으로

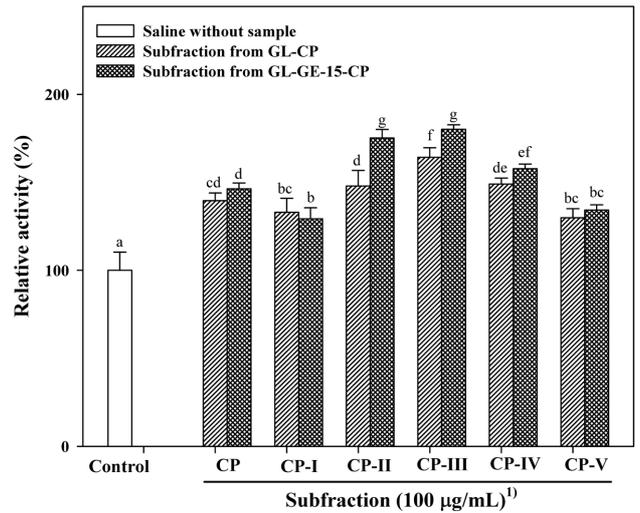


Fig. 2. Macrophage stimulating activity of subfraction from CL-CP or GL-GE-15-CP on DEAE-Sephrose CL-6B column chromatography. ¹CP; crude polysaccharide from *Ganoderma lucidum* mycelium cultured in MCM without GE (GL) or supplemented with 15% GE (GL-GE-15), CP-I; subfraction eluted by DIW, CP-II~V; subfraction eluted by 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 M NaCl. Results expressed are mean±SD of quadruplicate samples, and means with different superscript letters were significantly different.

IL-12 생산능이 증진되었음을 나타내었다(Fig. 3). 따라서 수삼추출물-영지 균사체 조다당획분으로부터 분획된 GL-GE-15-CP-II는 일반-영지 균사체 조다당획분에서 분획된 동일획분보다 매크로파지의 자극이 증진되었을 뿐만 아니라 이러한 자극이 선천면역계(NK cell) 및 획득면역계(T cell)의 활성증진에도 중요하게 영향을 미칠 수 있음을 확인할 수 있었다. Peyer's patch를 매개로 장관면역 활성을 측정된 결과에서도 GL-GE-15-CP-II가 시료대조군을 포함한 모든 획분 중에서 saline 대조군의 1.76배로 유의적으로 가장 높은 활성을 나타내었고, 특히 동일 NaCl 농도에서 용출된 시료대조군의 GL-CP-II(1.36배) 또는 가장 높은 활성을 갖는 GL-CP-III(1.42배)보다 유의적으로 증가된 활성을 나타내었다(Fig. 4).

한편, 지금까지 보고된 BRM(biological response modifier) 활성을 가지는 다양한 종류의 물질은 항암제의 종양치료에서 면역자극 활성에 기인되는 상승활성을 유도한다는 것이 잘 알려져 있다(32). 특히 colon 26-M3.1 carcinoma 모델에서 면역자극 물질의 전신투여에 의한 암전이 억제활성은 주로 비특이적인 면역자극 활성에 의하여 유도된다는 것이 보고되고 있기 때문에(7,33), 본 연구에서는 지금까지의 면역활성 결과를 토대로 colon 26-M3.12 carcinoma 모델을 이용하여 수삼추출물-영지 균사체로부터 분리된 활성 다당획분의 암전이 억제활성을 검토하였다. 식품소재로서의 항종양전이 활성을 검색하기 때문에 경구투여에 의한 실험방법이 적당하지만 경구투여 기간에 따른 시료가 충분히 확보되지 않았고 정제되지 않은 시료에 대한 활성의 유무를 신속히 측정하기 위한 방법으로서 정맥주사를 통한 실험들이 보고되고 있기 때문에(7,32), 본 논문에서도 정맥주사로 시료를 주입하여 항종양전이가 활성을 검토하였다. 종양 접종 2일전에 200 µg/mouse의 GL-GE-15-CP-II와 시료대조군인 GL-CP-II를 각각 1회 정맥투여한 결과, 72.8과 55.4%의 통계적으로 유의한 예방적 전이억제 활성을 나타내었고(Table 3), 암전이를 억제하는 항종양 결과로부터

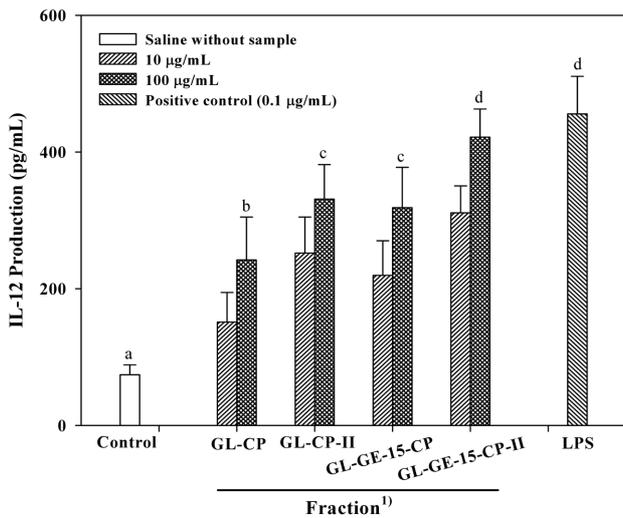


Fig. 3. Interleukin-12 production of the active subfraction from GL-CP or GL-GE-15-CP on DEAE-Sephacrose CL-6B column chromatography. ¹⁾GL-CP or GL-GE-15-CP; crude polysaccharide from *Ganoderma lucidum* mycelium cultured in MCM without GE or supplemented with 15% GE, GL-CP-II or GL-GE-15-CP-II; the active fraction eluted by 0.1 M NaCl. Results expressed are mean±SD of quadruplicate samples, and means with different superscript letters were significantly different in 100 µg/mL^(a-d).

GL-GE-15-CP-II의 투여는 일반-영지 균사체의 GL-CP-II보다 증진되었음을 알 수 있었다. 따라서 이러한 다양한 면역활성의 결과로부터 수삼추출물-영지 균사체 조다당으로부터 DEAE-Sephacrose CL-6B 분획으로 분리된 활성 다당획분은 시료대조군인 일반-영지 균사체 조다당으로부터 분획된 동일농도의 NaCl 용출획분 또는 다른 획분들보다도 활성이 증가되었음을 알 수 있었으며 이러한 사실로부터 영지 균사체 액체배양에서 수삼추출물 첨가는 면역활성 증진에 중요한 영향을 미치고 있는 것으로 확인되었다.

수삼추출물-영지버섯 균사체로부터 분리된 면역활성 다당획분의 특성

수삼추출물-영지 균사체 조다당획분으로부터 분리된 면역활성 다당획분인 GL-GE-15-CP-II는 시료대조군인 GL-CP-II보다 증진된 면역활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 수삼추출물-영지 균사체의 활성 다당획분은 일반-영지 균사체 다당류와는 다른 종류일 것으로 사료되어 활성획분의 구성분 및 구성당을 시료대조군과 비교함으로써 활성 다당류의 구조적인 특성을 밝히고자 하였다. 먼저 GL-GE-15-CP-II는 중성당이 83.00% 함유되어 있고, 산성당(9.11%) 및 단백질(7.89%)로 구성되어 있어 중성당이 주성분임을 확인하였고, 동일 NaCl 농도에서 분획된 시료대조군인 GL-CP-II도 중성당(89.53%)과 소량의 산성당(5.82%) 및 단백질(4.65%)을 포함하는 획분임을 알 수 있었다(Table 1). 따라서 유의성은 있었으나 구성분 함량에서 큰 차이를 나타내지 않았으므로 다당류의 구성당 분포를 확인하기 위하여 alditol acetate 유도체로 조제한 후 GC분석을 실시하였다. 일반적으로 조다당획분의 경우에는 분획되지 않은 다양한 종류의 다당류가 함유되어 있어 구성당을 분석하여도 주요한 다당류를 판단하는 것이 어려우므로 GL-CP와 GL-GE-15-CP의 구성당은 분석하지 않았다(Table 1의 ND). 구성당 분석결과 (Table 1), 시료대조군 획분보다 면역활성이 증진된 GL-GE-15-CP-II는 GalA와 GlcA 등이 포함된 산성당(uronic acid)과 Ara, Man, Gal와 Glc의 중성당이 함유되어 있

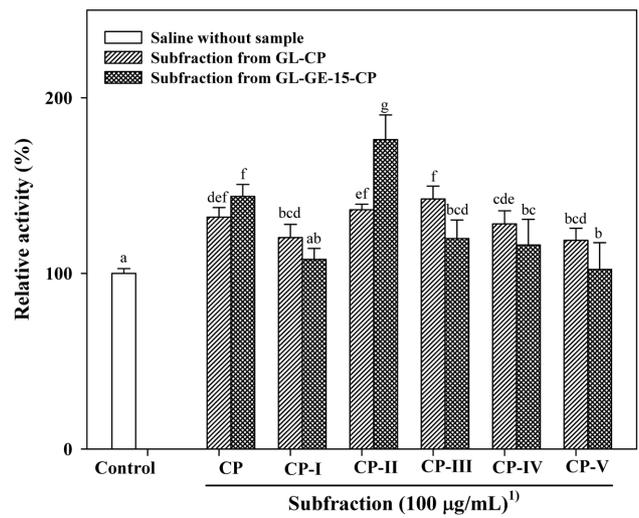


Fig. 4. Intestinal immune system modulating activity through Peyer's patch of subfraction from GL-CP or GL-GE-15-CP on DEAE-Sephacrose CL-6B column chromatography. ¹⁾CP; crude polysaccharide from *Ganoderma lucidum* mycelium cultured in MCM without GE (GL) or supplemented with 15% GE (GL-GE-15), CP-I; subfraction eluted by DIW, CP-II~V; subfraction eluted by 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 M NaCl. Results expressed are mean±SD of quadruplicate samples, and means with different superscript letters were significantly different.

Table 3. Anti-metastatic activity of the active subfraction from GL-GE-15-CP on DEAE-Sephacrose CL-6B column chromatography

Fraction ¹⁾	Number of lung metastasis (Inhibition %) ²⁾		
	0 µg/mouse	50 µg/mouse	200 µg/mouse
Tumor control ³⁾	124.0±7.9 (0.0) ^d	-	-
GL-CP	-	84.0±5.2 (32.3)	68.0±7.7 (45.2) ^c
GL-CP-II	-	80.2±5.4 (35.3)	55.3±5.9 (55.4) ^b
GL-GE-15-CP	-	69.5±4.1 (43.9)	54.2±9.9 (56.2) ^b
GL-GE-15-CP-II	-	58.8±6.3 (52.6)	33.8±6.1 (72.8) ^a

¹⁾GL-CP or GL-GE-15-CP; crude polysaccharide from *Ganoderma lucidum* mycelium cultured in MCM without GE or supplemented with 15% GE, GL-CP-II or GL-GE-15-CP-II; the active fraction eluted by 0.1 M NaCl.

²⁾Four BALB/c mice per group were administered *i.v.* with each active fraction 2 days before *i.v.* inoculation of colon 26-M3.1 carcinoma cells (3×10⁴ cell/mouse). Mice were killed 14 days after tumor inoculation for evaluation.

³⁾For lung metastasis inhibition, control is tumor-bearred one without any active fraction administration. Results expressed are mean±SD of quadruplicate samples, and means with different superscripts were significantly different in 200 µg/mouse dose.

었다(molar ratio; uronic acid : Ara : Man : Gal : Glc=0.28 : 0.39 : 0.50 : 0.75 : 1.00). 그러나 시료대조군인 GL-CP-II는 구성분 함량에서는 GL-GE-15-CP-II와 유사하였으나 구성당 분포에서는 Man와 Glc의 주 구성당 및 Ara와 Fuc의 비율에서 상당한 변화를 보이고 있음을 확인할 수 있었다(molar ratio; uronic acid : Fuc : Man : Gal : Glc=0.18 : 0.32 : 0.89 : 1.00 : 0.52). 일반적으로 인삼의 다당류에는 GalA, Gal와 Ara를 주 구성당으로 하는 ginseng pectic polysaccharide가 많이 보고되고 있다(34,35). 따라서 시료대조군인 GL-CP-II와의 구성당 비교결과, GL-GE-15-CP-II의 산성당 및 Ara 증가는 단순히 수삼추출물이 첨가된 것에 기인한다고 생각할 수

있으나 Man와 Fuc가 감소되면서 Glc가 현저히 증가된 결과는 균사체가 배양되는 과정에서 생물학적인 전환과정도 유도되고 있을 가능성을 보여주는 것으로 추정할 수 있다. 특히, 균사체에 다량 함유되어 있는 것으로 보고되고 있는 mannan 또는 heteroglucan으로부터 유래된 Man, Xyl, Fuc와 Glc 구성당 비율에서 현저하게 변화를 보이고 있는 것이 이런 가능성을 높여주고 있는데, 향후 이를 보다 명백히 밝히기 위하여 활성 다당획분의 완전정제 및 결합양식 등의 구조적 규명과정이 반드시 연구되어야 할 것으로 보인다.

요 약

영지버섯 균사체(*Ganoderma lucidum*, GL)의 면역활성을 증진시키기 위하여 기본배지인 mushroom complete medium(MCM)에 수삼추출물(GE, 65°Bx)을 농도별로 첨가한 혼합 액체배지에서 균사체를 배양한 후 원심분리로 균사체를 회수하여 동결건조하고 열수추출과 에탄올 침전처리를 이용하여 조다당획분(CP)을 분획하였다. MCM 부피의 15% GE가 첨가된 혼합배지에서 배양된 수삼추출물-영지 균사체의 GL-GE-15-CP는 100 µg/mL의 농도에서 5%와 10% GE가 첨가된 GL-GE-5-, 10-CP 및 GE가 첨가되지 않은 일반-영지 균사체의 GL-CP보다 유의적으로 높은 마크로파지 활성을 나타내었으며, Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성도 증진되었음을 확인할 수 있었다. 활성획분인 GL-GE-15-CP는 DEAE-Sepharose CL-6B의 분획을 통하여 GL-GE-15-CP의 다른 획분 또는 시료대조군인 GL-CP로부터 분획된 모든 획분보다 유의적으로 높은 마크로파지 활성, IL-12 생산능 및 장관면역 활성(각각 1.75, 5.68, 1.76배)을 갖는 다당획분인 GL-GE-15-CP-II을 분리하였다. 또한, GL-GE-15-CP-II는 동일 NaCl 농도에서 분획된 시료대조군인 GL-CP-II보다 200 µg/마우스의 농도에서 colon 26-M3.1 carcinoma cell에 대하여 유의적으로 높은 암전이 억제활성도 보여주었다(tumor control의 72.8% 억제활성). 한편, 활성 다당획분인 GL-GE-15-CP-II는 주로 중성당(83.00%)과 산성당(9.11%)으로 구성되어 있었으며, 구성당 분석결과에서 Ara, Man, Gal와 Glc의 중성당으로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다(molar ratio; 0.28 : 0.39 : 0.50 : 0.75 : 1.00). 따라서 영지버섯 균사체 배양에 있어서 MCM 기본배지에 수삼추출물의 첨가는 균사체의 면역활성 증진에 중요하게 작용하는 것으로 보이며, 활성 다당획분의 구성당 분포를 비교할 때 중성 다당류가 면역활성 증진에 관여하고 있는 것으로 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 충주대학교 교내학술연구비의 지원을 받아 수행한 연구로서 이에 감사드립니다.

문 헌

- Chang ST. Mushrooms and mushroom biology. pp. 1-13. In: Genetics and Breeding of Edible Mushrooms. Chang ST, Buswell JA, Miles PG (eds). CRC Press, Boca Raton, FL, USA (1993)
- Soccol CR, Dalla Santa HS, Rubel R, Vitola FM, Leifa F, Pandey A. Mushrooms-A promising source to produce nutraceuticals and pharmaceutical byproducts. pp. 439-448. In: Current Topics on Bioprocesses in Food Industry. Koutinas A, Pandey A, Larroche CA (eds). Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India (2007)
- Kidd PM. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer mushroom. *Altern. Med. Rev.* 5: 4-27 (2000)
- Yu HE, Cho SM, Seo GS, Lee BS, Lee DH, Lee JS. Screening of bioactive compounds from mushroom *Pholiota* sp. *Korean J. Mycol.* 34: 15-21 (2006)
- Percario S, Odorizzi VF, Souza DRS, Pinhel MAS, Gennari JL, Gennari MS, Godoy MF. Edible mushroom *Agaricus sylvaticus* can prevent the onset of atheroma plaques in hypercholesterolemic rabbits. *Cell Mol. Biol.* 54 Suppl: OL1055-OL1061 (2008)
- Lee JS, Park BC, Ko YJ, Choi MK, Choi HG, Yong CS, Lee JS, Kim JA. *Grifola frondosa* (maitake mushroom) water extract inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis through inhibition of reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *J. Med. Food* 11: 643-651 (2008)
- Yoon TJ, Yu KW, Shin KS, Suh HJ. Innate immunity stimulation of exo-polymers prepared from *Cordyceps sinensis* by submerged culture. *Appl. Microbiol. Biot.* 80: 1087-1093 (2008)
- Sullivan R, Smith JE, Rowan NJ. Medicinal mushrooms and cancer therapy: Translating a traditional practice into Western medicine. *Perspect. Biol. Med.* 49: 159-170 (2006)
- Zhu T, Kim SH, Chen CY. A medicinal mushrooms: *Phellinus linteus*. *Curr. Med. Chem.* 15: 1330-1335 (2008)
- Mahajna J, Dotan N, Zaidman BZ, Petrova RD, Wasser SP. Pharmacological values of medicinal mushrooms for prostate cancer therapy: The case of *Ganoderma lucidum*. *Nutr. Cancer* 61: 16-26 (2009)
- Shiao MS. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *Chem. Rec.* 3: 172-180 (2003)
- Lu QY, Jin YS, Zhang Q, Zhang Z, Heber D, Go VL, Li FP, Rao JY. *Ganoderma lucidum* extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells *in vitro*. *Cancer Lett.* 216: 9-20 (2004)
- Oh SI, Lee MS. Antioxidative and antimutagenic effects of *Ganoderma lucidum* krast extracts. *Korean J. Food Nutr.* 18:54-62 (2005)
- Lakshmi B, Ajith TA, Sheena N. Antiperoxidative, anti-inflammatory, and antimutagenic activities of ethanol extract of the mycelium of *Ganoderma lucidum* occurring in south India. *Teratogen. Carcin. Mut.* 11: 85-97 (2003)
- Lee SY, Rhee HM. Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum*; inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its hypotensive action. *Chem. Pharm. Bull.* 38: 1359-1364 (1990)
- Zhu XL, Chen AF, Lin ZB. *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. *J. Ethnopharmacol.* 111: 219-226 (2007)
- Ji Z, Tang Q, Zhang J, Yang Y, Jia W, Pan Y. Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from *Ganoderma lucidum*. *J. Ethnopharmacol.* 112: 445-450 (2007)
- Yue GG, Fung KP, Leung PC, Lau CB. Comparative studies on the immunomodulatory and antitumor activities of the different parts of fruiting body of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma* spores. *Phytother. Res.* 22: 1282-1291 (2008)
- Sone Y, Okuda R, Wada N, Kishida E, Misaki A. Structure and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agr. Biol. Chem. Tokyo* 49: 2641-2653 (1985)
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356 (1956)
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.* 54: 484-489 (1973)
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
- Jones TM, Albersheim P. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 49: 926-936 (1972)
- Zhao JF, Kiyohara H, Yamada H, Takemoto N, Kawamura H.

- Heterogeneity and characterization of mitogenic and anti-complementary pectic polysaccharides from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch et DC. Carbohyd. Res. 219: 149-172 (1991)
25. Conrad RE. Induction and collection of peritoneal exudates macrophages. pp. 5-11. In: Manual of Macrophage Methodology. Herscowitz BH, Holden HT, Bellanti JA, Ghaffar A (eds). Marcel Dekker Incorporation, New York, NY, USA (1981)
 26. Suzuki I, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M, Yadomae T. Effect of orally administered-glucan on macrophage function in mice. Int. J. Immunopharmacol. 12: 675-684 (1990)
 27. Matsunaga K, Yamaguchi H, Klein TW, Friedman H, Yamamoto Y. *Legionella pneumophila* suppresses macrophage interleukin-12 production by activating the p42/44 mitogen-activated protein kinase cascade. Infect. Immun. 71: 6672-6675 (2003)
 28. Yu KW, Kiyohara H, Matsumoto T, Yang HC, Yamada H. Intestinal immune system modulating polysaccharides from rhizomes of *Atractylodes lancea* DC. Planta Med. 64: 714-719 (1998)
 29. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. Biol. Pharm. Bull. 19: 1518-1520 (1996)
 30. Sung JY, Yoon TJ, Yu KW, Lee KH, Lee H. Enhancement of immunological activities in mice by oral administration of pectic polysaccharides from *Eleutherococcus senticosus*. Food Sci. Biotechnol. 15: 117-121 (2006)
 31. Yu KW, Kim YS, Shin KS, Kim HM, Suh HJ. Macrophage-stimulating activity of exo-biopolymer from cultured rice bran with *Monascus pilosus*. Appl. Biochem. Biotech. 126: 35-48 (2005)
 32. Kadhim S, Penney C, Lagraoui M, Heibein J, Attardo G, Zacharie B, Connolly T, Gagnon L. Synergistic anti-tumor activity of a novel immunomodulator, BCH-1393, in combination with cyclophosphamide. Int. J. Immunopharmacol. 22: 659-671 (2000)
 33. Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YU, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I, Kim JB. Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. Int. J. Immunopharmacol. 20: 163-172 (1998)
 34. Zhang X, Yu L, Bi H, Li X, Ni W, Han H, Li N, Wang B, Zhou Y, Tai G. Total fractionation and characterization of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C.A. Meyer. Carbohyd. Polym. 77: 544-552 (2009)
 35. Fan Y, Cheng H, Li S, Wang J, Liu D, Hao M, Gao X, Fan E, Tai G, Zhou Y. Relationship of the inhibition of cell migration with the structure of ginseng pectic polysaccharides. Carbohyd. Polym. 81: 4-19 (2010)