

상황버섯(*Phellinus linteus*) 균사체로부터 항보체 활성 다당류의 정제 및 특성

서호찬*

국제뇌교육종합대학원대학교 뇌교육학과

Purification and Characterization of Anti-complementary Polysaccharide from *Phellinus linteus* Mycelia

Ho-Chan Seo*

Department of Brain Education, University of Brain Education, Cheonan 330-841, Korea

(Received May 10, 2012. Revised May 22, 2012., Accepted June 20, 2012)

ABSTRACT: We have isolated an anti-complementary polysaccharide from the hot water extracts of *Phellinus linteus* mycelia. Anti-complementary polysaccharide, PL-5-IIIa, was purified by ultrafiltration, gel permeation chromatography using Sepharose CL-4B. GPC (Sepharose CL-4B) and its homogeneity was demonstrated by HPLC. Using gel permeation chromatography with standard dextrans, its molecular weight was determined as about 800,000 dalton. The purified PL-5-IIIa was identified as a protein bound polysaccharide comprising of 29.6% protein and 64.2% carbohydrate which was composed of fucose(15.8%), galactose(43.1%) and mannose(40.6%).

KEYWORDS : Anti-complementary, Mycelia, *Phellinus linteus*, Polysaccharide, Purification

서 론

현재 자연계에 존재하는 천연물질 중에서 인체에 대해 각종 생리활성을 나타내는 다당류들이 버섯(Chang and Miles, 1989), 한약재(Yamada *et al.*, 1988), 고등식물(Yamada *et al.*, 1988), 곰팡이(Gao *et al.*, 1989) 등의 다양한 기원으로부터 분리되고 있어 이에 대한 관심이 증가하고 있다. 그 예로서 표고버섯(*Lentinus edodes*), 자실체에서 분리한 β -1,3-glucan인 lentinan(Chihara *et al.*, 1976), 치마버섯(*Schizophyllum commune*)에서 분리한 β -1,3 및 β -1,6-glucan인 schizophyllan(Chihara *et al.*, 1970), 잎새버섯(*Griofola frondosa*)의 β -1,3 및 β -1,6-glucan(Sasaki and Takasuka, 1976)과 구름버섯(*Coriolus versicolor*)의 균사 배양액에서 추출한 β -1,3 1,4 및 β -1,4 1,6-glucan을 함유하는 단백다당인 krestin(Suzuki *et al.*, 1980) 등이 항암 효과를 나타내어 면역증강제로 시판되거나 사용이 검토되고 있다. 이들은 항종양 활성(Ohno *et al.*, 1985), 항바이러스 활성(Song *et al.*, 1995), 항보체 활성(Yoshioka *et al.*, 1972), 항응고 활성(Lee *et al.*, 1997), 혈당 강하작용(Shimizu *et al.*, 1989) 등의 효과가 보고되었으며 이들은 주로 인체 면역기능의 활성화와 밀접한 관계가 있는 것으로 추정되고 있다. 이 중에서 항보체 활성은 보체계를 활성화시키거나 억제시키는 작용에 기인하는 것으로 알려져

있다(Egwang and Befus, 1984). 보체계의 활성화는 고전적 경로(classical pathway)와 선택적 경로(alternative pathway)의 연속적인 메카니즘에 의해 일어난다. 고전적 경로는 IgG와 IgM을 포함한 면역 복합체나 이들의 응집물에 의해 C1부터 활성화가 시작되어 C3b 활성화형을 생성하는 경로이며 항체의 관여없이도 여러 종류의 polyanions, 일부 다당류 등이 고전적 경로를 활성화시킬 수 있는 인자로 알려져 있다. 선택적 경로에 의한 C3 고정에는 면역 복합체를 필요로 하지 않고 혈액 중에 항상 활성화형으로 존재하는 D인자에 의해 C3b와 B인자로부터 활성화가 시작되는 경로로서 zymosan, inulin, pneumococcal polysaccharide 등이 주요한 활성 인자이다(Roit *et al.*, 1993).

최근에는 항암활성과 더불어 다양한 생체조절기능 성분이 보고되고 있는 식용버섯으로부터 항보체 활성물질을 탐색하여 새로운 소재화 연구의 일환으로 버섯균사체 추출물들의 항보체 활성을 검색하였다.

이에 본 연구에서는 보관균주와 임업협동조합에서 분양 받은 버섯 균사체 중, 우수한 활성을 나타낸 상황버섯(*Phellinus linteus*) 균사체로부터 항보체 활성 물질을 분리, 정제를 하였으며 화학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

접종원 배양

접종원 배양을 위한 배지는 PDA (potato dextrose agar,

*Corresponding author <E-mail : hcseobravo@ube.ac.kr>

Difco, Sparks, MD)를 사용하였으며 배양접시 중심부에 버섯균주를 접종하여 30°C, 7일간 배양한 후, 콜크보오러(지름 8 mm)로 배지상의 균사를 punching하여 제조된 disk 5개를 접종원으로 사용하였다.

사용배지 및 배양조건

항보체 활성의 최적 배양조건을 검토하기 위한 배지는 PDB를 기본배지로 사용하였으며 200 ml를 500 ml baffle flask에 넣고 초기 pH 7.0, 30°C, 120 rpm에서 7일간 배양하였다. Fermentor(주) 이노바이오, 금산군, 충남) 배양은 5 L 배양조에 working volume을 2 L로 하여 상기와 동일한 환경조건에서 배양하였다.

항보체 활성 다당의 추출 및 정제

상황버섯 균사체 550 g을 분쇄하여 95~97°C에서 4시간 동안 열수추출한 후 Fig. 1과 같은 단계로 분리하고 정제를 실시하였다. 열수추출물 PL-0 (3 g)을 한외여과(Millipore Co.)하여 분자량별로 5개의 획분(PL-1 → PL-5)으로 분획하였다. 이 중에서 활성이 가장 높았던 PL-5를 DEAE-Sephrose FF(3.5 × 44 cm)에 흡착시킨 후, 증류수로 세척하고 NaCl 농도를 증가시키면서 5개의 흡착획분(PL-5-I → PL-5-V)을 얻었다. 이 중 0.3M NaCl에서 용출된 PL-5-III을 0.2 M NaCl용액으로 평형화된 Sepharose CL-4B(2.6 × 94 cm)을 이용하여 0.17 ml/min의 유속으로 겔 여과 크로마토그래피를 행하여 항보체 활성 정제다당 PL-5-IIIa를 분리하였다. 모든 정제과정은 4°C에서 실시하였다.

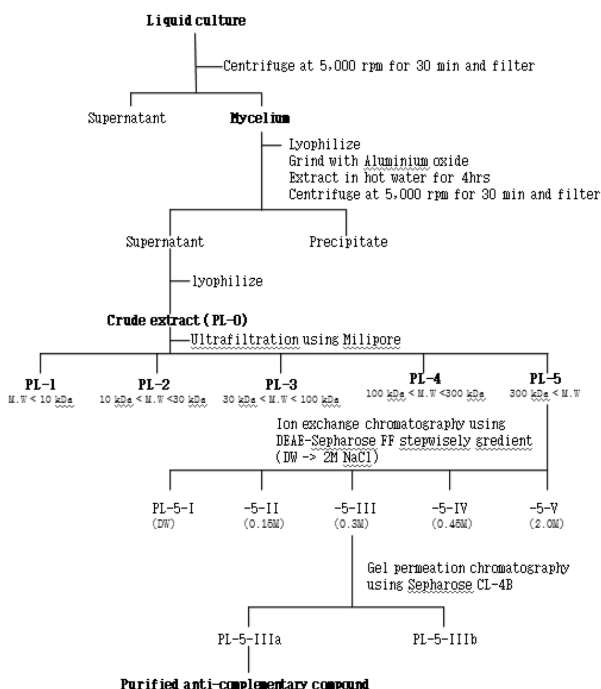


Fig. 1. Isolation and purification procedure of crude extract from *Phellinus linteus* mycelia.

정제다당의 순도 및 분자량 측정

Sephrose CL-4B column에 의해서 단일 peak로 분리된 PL-5-IIIa 획분의 순도를 확인하기 위하여 HPLC (SAMSUNG SLC-2000/RI/Shodex ionpack S-804)를 1 ml/min의 유속으로 실시하였으며 정제다당의 분자량은 Dextran T-2000(M.W. 2×10^6), T-500(M.W. 5×10^5), T-70 (M.W. 7×10^4), T-10(M.W. 1×10^4) 그리고 glucose를 표준물질로 사용하여 Sepharose CL-4B(2.6 × 94 cm)에서 구한 표준곡선과 K_{av} 값을 비교하여 측정하였다.

항보체 활성의 측정

항보체 활성은 Mayer의 방법(1961)에 따라 측정하였다. 정상인의 혈청 (NHS, normal human serum)과 2% gelatin, 3 mM Ca^{++} , 10 mM Mg^{++} 가 함유된 GVB⁺⁺(gelatin veronal buffered saline, pH 7.2)과 시료를 각각 50 ml씩 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 이 반응액에 GVB⁺⁺를 350 ml씩 가하고 이것을 10~100배로 연속 희석하였다. 여기에 750 ml의 GVB⁺⁺와 양의 감작 적혈구(IgM haemolysin sensitized sheep erythrocyte)를 250 ml씩 가하고 37°C, 1시간 동안 반응시킨 후, PBS (phosphate buffered saline pH 7.4)를 2.5 ml를 가하고 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻어진 상등액을 412 nm에서 측정하였다.

항보체 활성은 $ITCH_{50}$ 즉 총보체 용혈 저지율(Inhibition of 50% Total Complement Hemolysis)로 나타내었다.

$$TCH_{50} \text{ of control} - TCH_{50} \text{ of sample}$$

$$ITCH_{50} (\%) = \frac{\text{---}}{\text{TCH}_{50} \text{ of control}} \times 100$$

일반 성분 분석

총당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법(Lin and Pomeranz, 1968)으로 uronic acid 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 사용하여 m-hydroxydiphenyl 방법으로 하였으며 단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry 법(Lowry *et al.*, 1951)으로 측정하였다.

결과 및 고찰

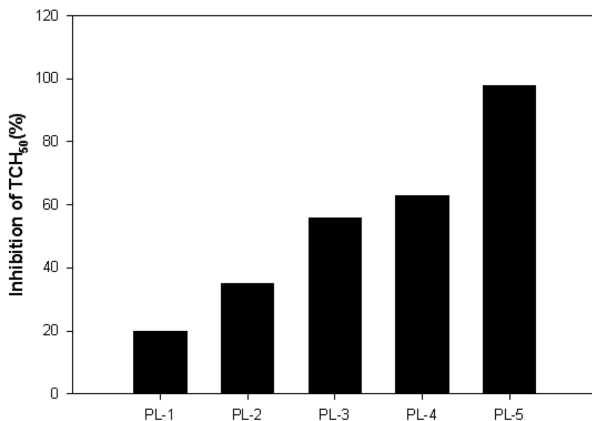
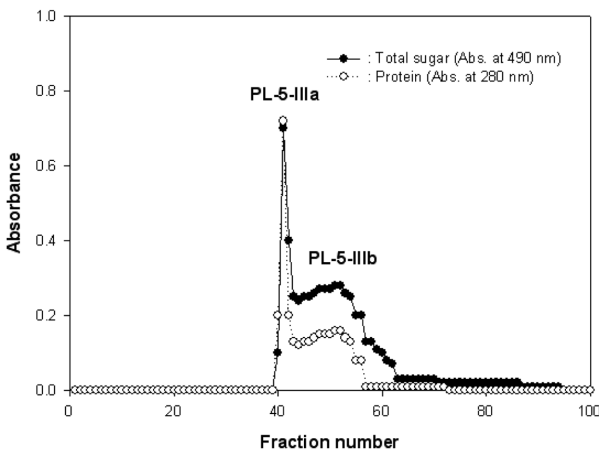
상황버섯으로부터 항보체 활성 물질 추출

상황버섯(*P. linteus*) 균사체로부터의 추출 용매에 따른 항보체 활성과 수율을 검토하였다(Table 1). 추출물의 항보체 활성과 수율은 열수 > 냉수 > 1N NaOH > 0.1N HCl의 순으로 열수 추출에서 높게 나타났으며 일반적으로 산, 알칼리 추출물이 물추출물보다 낮게 나타났다. 또한 열수로 4시간 추출시 81.2%의 항보체 활성과 0.06%의 수율을 보였다. 이의 조건으로 상황버섯(*P. linteus*) 균사체 550 g을 열수에서 4시간동안 환류추출하였으며 추출액을 증화, 투석 및 동결건조하여 추출획분 PL-0(3 g)을 얻었다(Fig. 1).

Table 1. Comparison of anti-complementary activities of different solvent extracts from *Phellinus linteus* mycelia

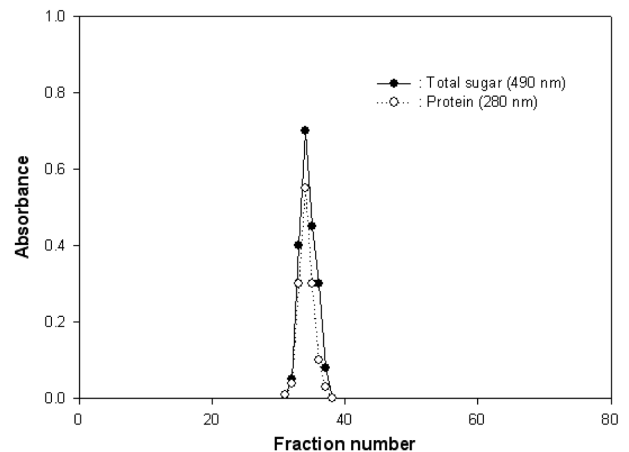
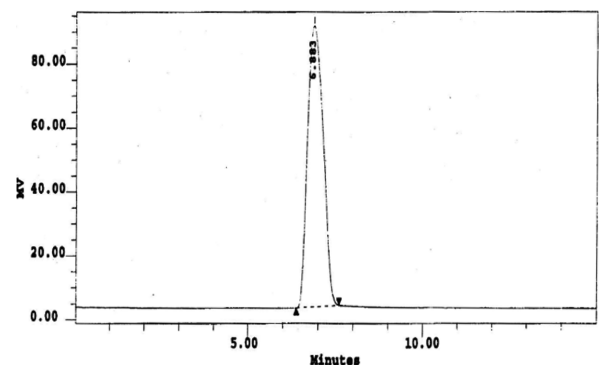
Solvent	Extraction time (hrs)	Yield (mg/ml)	ITCH ₅₀ (%)
1N NaOH	2	0.02	49.6
0.1N HCl	2	0.01	32.0
Hot water	4	0.06	81.2
Cold water	24	0.05	76.5

*The anti-complementary activity was assayed at concentration of 1,000 mg/ml.

**Fig. 2.** Anti-complementary activity of each fraction separated by molecular ultrafiltration. PL-1 : MW <10kDa, PL-2 : 10 kDa < MW < 30 kDa, PL-3 : 30 kDa < MW < 100 kDa, PL-4 : 100 kDa < MW < 300 kDa, PL-5 : 300 kDa < MW.**Fig. 3.** Gel permeation chromatography of PL-5-III using Sepharose CL-4B. The column (2.6 × 95 cm) of Sepharose CL-4B was eluted with 0.2M NaCl at flow rate of 0.17 ml/min.

항보체 활성 다당류의 정제

상황버섯 균사체 열수 추출물인 PL-0을 한외여과를 이용하여 분자량에 따라 PL-1, -2, -3, -4, -5의 5개획으로 분획하였다(Fig. 2). 이들 획분을 1,000 mg/ml의 농도에서 항보체 활성을 측정할 결과, 분자량이 증가할수록 활성이 증가하다가 300 kDa 이상 획분(PL-5)에서 현저하

**Fig. 4.** Gel permeation chromatography using Sepharose CL-4B with PL-5-IIIa.**Fig. 5.** HPLC profile of PL-5-IIIa.

게 증가되었다. 이는 항보체 활성 물질이 고분자 물질임을 알 수 있으며 각 획분에서 대부분의 저분자 물질이 제거된 것으로 나타났다. 한외여과에서 가장 높은 활성을 나타낸 PL-5 획분을 음이온 교환수지인 DEAE-Sepharose FF를 이용하여 이온강도에 따라 PL-5-I, II, III, IV, V의 5개의 분획을 얻었으며 그 중, PL-5-III가 84.5%의 가장 높은 항보체 활성을 나타냈다(data not shown). PL-5-III은 분자량이 300 kDa 이상의 고분자 물질이므로 분획 가능한 분자량 범위를 가진 Sepharose CL-4B를 이용하여 PL-5-IIIa와 PL-5-IIIb의 2개의 획분으로 분리하였다(Fig. 3). 이 중 단백질이 함유되지 않은 PL-5-IIIa에서 항보체 활성이 97%로 높았으며 이 획분을 Sepharose CL-4B에 재획분한 결과 좌우가 대칭인 단일 피크로 확인되었다(Fig. 4).

순도와 분자량

PL-5-IIIa 획분을 겔여과 컬럼을 사용한 HPLC를 행한 결과 단일 피크로 나타나 거의 순수하게 정제되었음을 확인하였으며(Fig. 5) Sepharose CL-4B column을 이용하여 분자량을 표준 dextran과 비교한 결과 분자량은 약 800,000Da 정도를 나타내었다(Fig. 6). Chihara *et al.*(1970)은 *Lentinus edodes*에서 얻은 다당류의 분자량은 1,730,000Da 이라고

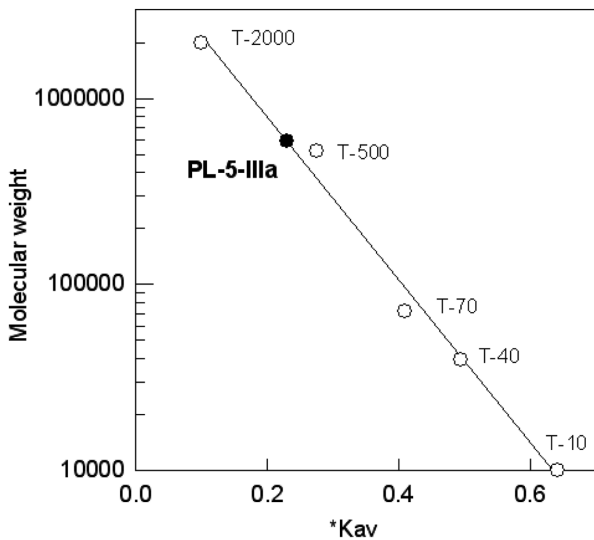


Fig. 6. Gel permeation chromatography profile of molecular weight of PL-5-IIIa. $*K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ (V_o : Void volume, V_t : Total volume, V_e : Elution volume).

Table 2. Chemical composition of purified PL-5-IIIa

PL-5-IIIa	Amount
ITCH ₅₀ (%)	98.0
Yield (%)	47.6
Total sugar (%)	64.2
Protein (%)	29.6
Sugar composition	Molar ratio
Fucose	15.8
Mannose	40.6
Galactose	43.1

보고하였으며 Lee *et al.* (1997)은 *Coriolus versicolor*가 생산하는 다당체의 경우 1,300,000Da, Ohno *et al.* (1984)는 *Grifola frondosa*의 다당류는 2,000,000Da이라고 보고하였다.

정제 다당의 구성당 분석

상황버섯 균사체로부터 최종 정제된 항보체 활성 정제 다당(PL-5-IIIa)의 수율은 47.6%였으며 항보체 활성은 500 mg/ml에서 98%로 높게 나타났다(Table 2). PL-5-IIIa는 단백질 함량이 29.6%, 총당 함량이 64.2%를 함유하였으며 구성당으로서 galactose가 43.1%, mannose가 40.6%, fucose가 15.8%로 나타났다.

한편 구름버섯에서 분리, 정제한 항응고성 다당은 함황성 다당으로 fucose:mannose:glucose:galactose 1.00:0.22:0.20:0.11의 몰 비율을 나타내었다(Lee *et al.*, 1997).

적 요

식용버섯으로부터 항보체 활성물질을 탐색하여 새로운

소재화 연구의 일환으로 상황버섯(*Phellinus linteus*) 균사체로부터 항보체 활성 물질을 분리, 정제를 하였으며 화학적 특성을 검토하였다. 정제는 상황버섯의 열수추출한 후, 열수추출물(PL-0)을 한외여과하여 분자량별로 5개의획분을 얻었다. 이 중, 300kDa 이상의 획분(PL-5)을 DEAE-Sepharose FF 이온교환 크로마토그래피, Sepharose CL-4B 겔여과 크로마토그래피를 실시하여 PL-5-IIIa 획분을 얻었다. PL-5-IIIa 획분을 HPLC를 행한 결과 단일 피크로 나타났으며 정제다당 PL-5-IIIa의 분자량은 800,000Da으로 측정되었다. 정제다당 PL-5-IIIa는 64.2%의 당과 29.6%의 단백질로 구성되었으며 구성당은 galactose가 43.1%, mannose가 40.6%, fucose가 15.8%로 나타났다.

참고문헌

- Chang, S. T. and Miles, P. G. 1989. Overview of biology of fungi in edible mushroom and their cultivation. CRC press: 41-52.
- Chihara, G., Hamuro, H., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, K. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially schizophyllan from *Schizophyllum commune*. *Cancer Res* 30: 2776-2781.
- Chihara, G., Mamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. 1976. Fractionation and purification of the polysaccharide with marked anti-tumor activity especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res* 30(11): 2776-2780.
- Egwang, T. G. and Befus, A. D. 1984. The role of complement in the induction and regulation of immune responses. *Immunology* 15: 207-211.
- Gao, Q. P., Kiyohara, H., Cyong, J. C. and Yamada, H. 1989. Chemical properties and anti-complementary activities of polysaccharide fractions from roots and leaves of *Panax ginseng*. *Planta Med* 55: 9-17.
- Immunochemistry, Thomas Publisher (2nd ed.), pp. 459-461.
- Lee, H. S., Kweon, M. H., Lim, W. J., Sung, H. C. and Yang, H. C. 1997. An anticoagulant polysaccharide isolated from the alkali extracts of *Coriolus versicolor*. *Korean J Food Sci Technol* 29: 369-375.
- Lin F. M., Pomeranz, Y. 1968. Effect of borate on colorimetric determinations of carbohydrates by the phenol-sulfuric acid. *Anal Biochem* 24(1):128-131.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Rindall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 256-260.
- Mayer, M. M. 1961. On the destruction of erythrocytes and other cells by antibody and complement. *Cancer Res* 21: 1262-1269.
- Ohno, N., Iino, K., Suzuki, I., Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T. and Yadomae, T. 1985. Neutral and acidic antitumor polysaccharides extracted from cultured fruit bodies of *Griofora frondosa*. *Chem Pharm Bull* 33(3): 1181-1192.
- Ohno, N., Suzuki, I., Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T. and Yadomae, T. 1984. Antitumor activity and structure characterization of glucan, extracted from cultured fruit bodies of *Griofola frondosa*. *Chem Pharm Bull* 32: 1142-1151.
- Roit, I., Brostoff, I., Male, D. 1993. Immunology, Mosby.
- Sasaki, T. and Takasuka, N. 1976. Further study of the structure of lentinan an anti-tumor polysaccharide from *Griofola frondosa*. *Carbohydr Res* 47: 99-109.

- Shimizu, N., Gonda, R., Neiko, K., Kanari, H. and Tomoda, M. 1989. The major pectic arabinogalactan having activity on the reticuloendothelial system from the roots and rhizomes of *Saposhnikovia divaricata*. *Chem Pharm Bull* 37(5): 1329-1333.
- Song, K. S., Cho, S. M., Lee, J. H., Kim, H. M., Han, S. B., Ko, K. S. and Yoo, I. D. 1995. B-Lymphocyte stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem Pharm Bull* 43(12): 2105- 2114.
- Suzuki, I., Hashimoto, K., Oikawa, S. and Sato, K. 1980. Antitumor and immunomodulating activities of a β -D-glucan obtained from liquid cultured *Coriolus versicolor*. *Chem Pharm Bull* 37: 410-420.
- Yamada, H. 1984. Structure and antitumor activity of alkali-soluble polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides*. *Carbohydrate Research* 125: 107-112.
- Yamada, H., Ra, K. S., Kiyohara, H. Cyong, J. C. and Otsuka, Y. 1988. Characterization of anti-complementary neutral polysaccharide from the root of *Bupleurum falcatum*. *Phytochem* 29: 3163-3170.
- Yoshioka, P., Ikekawa, T., Noda, M. and Fukuoka, F. 1972. Studies on antitumor activity of some fractions from basidiomycetes. An antitumor acidic polysaccharide fraction from *P. ostreatus*. *Chem Pharm Bull* 20: 1233-1242.