

표고버섯으로부터 분리한 렉틴의 생화학적 특성*1

김영신*2 · 조남석*2

Biochemical Characteristics of Lectins Isolated from *Lentinula edodes**1

Young-Sin Kim*2 · Nam-Seok Cho*2

요 약

표고버섯(*Lentinula edodes*)으로부터 0.15 M NaCl 용액에 의하여 crude lectin을 추출하였으며, 황산암모늄에 의한 침전·음이온교환수지 및 hydroxyapatite 컬럼을 이용한 크로마토그래피에 의하여 정제하였다. 버섯균산과 균병으로 나누어 추출된 crude lectin의 양에 있어서는 균산부분이 균병부분에 비하여 2배 이상 높은 lectin을 함유하였으며, 가열한 버섯에서는 lectin의 함량 및 활성은 미처리보다 감소되었다.

건조된 균산 50 g으로부터 얻은 crude lectin은 720 mg으로서 46.03%의 수율로 얻었으며, DEAE Sephadex A-50 column에 의한 분리, 정제 후 정제된 lectin 201 mg을 crude lectin의 28% 수율로 얻을 수 있었다. Crude lectin을 정제함으로써 aspartic acid, serine, alanine 및 histidine 등의 아미노산이 증가되었고, glutamic acid, glycine, leucine, tyrosine 및 methionine 등이 lectin에는 검색되지 않았다. DEAE Sephadex A-50 column의 chromatography를 통해 분리·정제한 활성을 지니는 lectin의 주된 부분은 Agglutinating test 결과, fraction A 및 B는 적혈구응집활성을 나타냈으며, 약 23 kDa의 분자량을 가지고 있었다. 활성을 지니는 부분을 다시 hydroxyapatite column에 의해 정제하여 얻은 LA-a와 LB-b는 각각 24 kDa과 23 kDa의 분자량을 나타냈다.

ABSTRACT

Lectin was isolated from shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) with 0.15 M NaCl solution, and purified by the following procedures: precipitation by ammonium sulfate, anion exchange column chromatography on DEAE Sephadex A-50 and hydroxyapatite column chromatography. The fresh pileus part of the mushroom contained more than two times of lectin compared to the stipe part, and lectins and its activity were reduced by heating. The extraction yield of crude lectin was 46.03%, 28% yield after purification on

* 1 접수 2001년 8월 1일, 채택 2001년 9월 12일

이 연구는 한국학술진흥재단(1996년도 국내 박사후연수과정)의 연수비지원에 의하여 수행되었음.

* 2 충북대학교 산림과학부 School of Forest Resources, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

on DEAE Sephadex A-50 column chromatography. Some amino acids, aspartic acid, serine, alanine and histidine, were increased by purification process. Relatively low molecular weight parts of lectin had the agglutinating activity for rabbit blood, and its molecular weight was about 23 kDa. The molecular weights of purified lectins, LA-a and LB-b, by the hydroxyapatite column chromatography were 24 kDa and 23 kDa, respectively.

Keywords: *Lentinula edodes*, lectin, purification, amino acid, agglutinating activity hydroxyapatite column chromatography

1. 서 론

렉틴은 식물, 동물, 미생물 등 자연계에 널리 분포하고 있으며, 주로 식물을 대상으로 연구되어 왔다. 100여종의 렉틴이 식물에서 분리, 정제되어 그 특성이 밝혀졌는데, 이러한 연구결과, 렉틴은 단백질성 물질이라는 공통점을 제외하고는 생화학적, 면역학적 성질이 매우 다양한 것으로 나타났다(Chang *et al.*, 1988; Chihara *et al.*, 1969; 1970; Fujii *et al.*, 1978; Park *et al.*, 1992; Yun *et al.*, 1995; Sharon, 1977; 1983). 식물체로부터 발견한 적혈구 응집성물질로서 phytohemagglutinin, hemagglutinin, protectin 등으로 불리어져 왔으며(Goldstein *et al.*, 1980), Boyd와 Shapleigh(1954)는 이 물질이 적혈구뿐만 아니라 lymphocyte, fibroblast, spermatozoa, bacteria, fungi 등의 세포도 응집시킬 수 있다는 특이성을 근거로, 라틴어 *legre*(=to pick or choose)로부터 "렉틴(Lectin)"이란 용어를 창안하였다. Aub 등(1963)에 의해 정상세포보다 종양세포를 더 잘 응집시킨다는 사실이 보고(Cho *et al.*, 1988; Han *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1982; 1984)된 이래로 생물학자, 암연구학자, 면역학자 등 생명과학연구 분야의 많은 연구자들의 상당한 관심을 불러 일으키고, 이에 대한 연구(Lee *et al.*, 1981; 1985; 1986; Mizuno, 1989; Lis and Sharon, 1977; Park *et al.*, 1979; 1985)가 급증하고 있다.

국내의 경우 한국산 천연자원 중 50여종의 종자류와 생약 등을 대상으로 렉틴의 함유여부와 그 역가를 알아내고자 screening test한 결과, 사람의 혈액 A, AB, O형과 토끼의 혈액에 대하여 응집현상을 나타

내는 성분을 함유하는 식물이 상당히 있음이 밝혀졌다(Chung 등, 1980). 그 후, 콩과식물의 렉틴(Chung 등, 1981), 버섯류 렉틴(Jeune-Chung 등, 1987), 산유수의 렉틴(Chung 등, 1993), 팔루근의 렉틴(권 등, 1993), 겨우사리중의 렉틴(Park and Kim, 1994), 해양동물의 렉틴(Chung 등, 1994) 등 다수의 연구 결과가 발표되었다.

버섯류의 경우, *Agaricus campestris*(Sage, 1967), *Agaricus bisporus*(Presant and Kornfeld, 1972), *Flammulia velutipes*(Tusda, 1979), 그리고 *Laccaria amethystina*(Sueyoshi *et al.*, 1984)의 렉틴 등이 연구, 보고되었으며, *Lactarius subzonarius*(당귀젓버섯)와 *Russula cutefracta*(청버섯)의 렉틴이 비교적 강한 림프구 자극효과를 나타내었다는 보고가 있다(Jeune-Chung 등, 1987).

렉틴은 버섯의 생장단계별, 부위별로 상이한 변화를 지니는 것으로 알려져 있지만 표고버섯에 관해서는 연구, 보고된 바 없다. 따라서, 본 연구는 표고버섯을 부위별로 구분하여 신선 및 건조한 시료로부터 추출한 렉틴을 분리·정제하여 그 특성을 알기 위하여 수행되었다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시 재료의 준비

잣버섯속(*Lentinula*)에 속하는 표고버섯(*Lentinula edodes*)을 청원버섯농장(충북 청원군 가덕면 한계리 산33번지)에서 구입, 실험재료로 사용하였다. 표고버섯은 구입 즉시 균산과 균병으로 나누어

일부는 냉동보존하여 신선도를 유지하여 시료로 사용하였고, 그 나머지는 음건하였다. 건조된 시료는 250~425 μm 의 크기로 마쇄하여 화학적 조성 분석 및 lectin 분리를 위한 시료로 사용하였다.

2.2 화학적 조성 분석

추출물은 온수·유기용매를 사용, 지방은 에테르를 이용한 추출법, 회분 등은 K.S. 표준법(박상진 외 3인, 1989)으로 정량하였고, 홀로셀룰로오스는 아염소산염법(Wise법)을 개량한 방법을 사용하여 분석하였다.

2.3 Crude lectin의 추출, 분리 및 정제

2.3.1 Crude lectin의 추출 및 분리

균산, 균병으로 나뉘어진 생표고 약 100 g, 건표고 약 50 g에 대하여 EDTA를 포함한 250 ml의 phosphate-buffered saline(PBSE : 8 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM EDTA, pH 7.4)을 첨가하여 4°C에서 mixer로 5분 분쇄한 후 5000 rpm(20 min, 4°C)으로 원심분리하여 상등액을 분리하는 작업을 2회 반복하였으며, 그 상등액을 모아 crude lectin(lectin 1)을 추출하기 위한 시료로 하였다(Chang *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1994; Chung 등, 1981; Park and Kim, 1995). 한편 위의 상등액을 다시 56°C에서 30분간 처리하여 5000 rpm에서 20분간 원심분리하여 crude lectin (lectin 2)의 시료로 하였다.

위에서 얻은 lectin 1 및 lectin 2에 80% 포화도의 ammonium sulfate를 첨가하여 4°C에서 1시간 반응 후 원심분리(12000 rpm, 20 min)하여 침전을 모은 다음, 소량의 PBSE로 재용해시켜 400배의 20 mM Tris-HCl buffer(2 mM EDTA함유, pH 7.4)로 4 hrs, 3회 반복하여 dialysis를 실시했다. 원심분리하여 상등액을 동결 건조하여 crude lectin 시료로 하였다.

2.3.2 Crude lectin의 정제

동결 건조된 crude lectin 약 150 mg을 20 mM

Tris-HCl buffer (pH 7.4) 500 μL 에 녹이고, 0.45 μm 의 syringe filter를 통과시켜, column 주입용 sample로 하였다. DEAE Sephadex A-50 컬럼(2.5 \times 7.2 cm)에 넣고, pH 7.4의 20 mM Tris-HCl buffer를 사용, 49 mL/hr(3 mL/tube)의 유속으로, 0~0.3M NaCl의 농도에서 gradient elution을 실시하였다. DEAE Sephadex A-50 column을 통과한 fraction 중 활성이 있는 부분을 cut-off 10 kD으로 한외여과(Amicon Pressure Ultrafilter)하여 농축 후, 각각 5 mM phosphate buffer(pH 6.8)로 평형시킨 hydroxyapatite column(2.5 \times 0.6 cm)에 주입하고, 0~0.15 M NaCl 농도로 29 mL/1 hr(1 mL/tube)로 gradient elution을 실시하였다(Jeune-Chang *et al.*, 1983; Yoshida *et al.*, 1994; Chung 등, 1981). 분리된 fraction 중의 단백질은 Pharmacia LKB Optical Unit UV-1을 이용, 280 nm에서의 흡광도를 측정, 확인하였다.

2.4 Lectin 활성의 측정

Lectin의 활성을 검정하기 위하여 erythrocytes를 이용한 Agglutination test(Sueyoshi *et al.*, 1984; Tsuda, 1979; Yoshida *et al.*, 1994)를 실시하였다. Erythrocytes의 준비는 녹십자 EDTA-K2의 채혈병에 담겨져 있는 rabbit erythrocyte를 PBS로 세척, 4%의 용액으로 조제하였다. 50 μL 의 lectin을 96 well Falcon U-plate에 넣고, PBS 용액으로 희석한 다음, 4%의 적혈구 희석액을 50 μL 를 가하였다. Titer plate shaker로 1시간 shaking 하여 응집여부를 확인하는 방법으로 lectin 활성을 측정하였다.

2.5 Polyacrylamide Gel 전기영동 및 분자량 측정

SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)을 이용, 12.5%와 15%의 polyacrylamide gel을 사용하여 100 v에서 전기영동을 실시하였다(Ravindranath *et al.*, 1985). 전기영동시 pH 8.3 Tris-glycine(25 mM Tris, 250 mM

glycine, 0.1% SDS) buffer를 사용하였다. 단백질변성은 SDS gel-loading buffer(50 mM Tris : pH 6.8, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)를 sample에 첨가한 후, 5분간 boiling하여 loading 하였다. 단백질 부위는 0.25%의 Coomassie brilliant blue R250 용액(10% acetic acid in methanol : H₂O=1 : 1, v/v)으로 염색시키고, methanol: acetic acid:distilled water (5 : 1 : 5)용액으로 반복 세척하여 탈색하였다.

2.6 Protein 정량 및 아미노산 조성분석

분리된 protein의 양은 BCA Protein Assay(Lowry *et al.*, 1951)로 정량하였다. 시료 10 µL, BCA protein assay reagent A 200 µL, reagent B 4 µL을 순서대로 주입하고, 37°C에서 30분 반응 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표품으로서 bovine serum albumin(Pierce사제)을 사용하였다. 아미노산 조성은 시료 2 mg을 질소가스를 충전시킨 밀봉관에 넣고 6N-HCl 1.5 mL를 가한 다음 115°C에서 24 hrs 가수분해시킨 다음, 3N-NaOH 1 mL로 중화시킨 후, 증류수로 세척, 진공건조시켰으며, 이 건조시료를 0.2 M sodium acetate buffer(pH 2.2) 1 mL에 녹이고, Milipore를 통과시킨 후, Amino acid analyzer로 아미노산 조성을 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 화학적 조성 분석

실험 재료로 구입한 신선한 생표고버섯의 전체 무게의 약 81%가 균산부분이, 약 19%는 균병부분이 차지하고 있었다. 이들의 함유율은 균산의 경우 86.5%, 균병인 경우에는 79.6%로서 그 차이가 6.87%로 균산이 좀더 많은 수분을 함유하고 있는 것으로 나타났으며, 표고버섯 무게의 대부분은 수분으로 이루어져 있음을 알 수 있었다.

화학적 조성 분석용 시료의 함유율은 각각 균산부분이 10.72%, 균병부분이 12.91%였다. 화학 성분

Table 1. Chemical components of *Lentinula edodes*.

Components, %	Pileus	Stipe
Hot-water extracts	38.7	27.0
Alcohol-benzene extracts	7.18	5.16
Fats	3.79	3.53
Ash	5.22	2.81
Holocellulose	47.6	62.5

조성분석 결과는 Table 1에 나타낸 바와 같은 바, 추출물에서 온수, 유기용매 추출물 모두가 균산이 균병에 비해 1.4배 정도 높게 함유되어 있음을 알 수 있었다. 지방 성분에 있어서는 균산, 균병에 거의 같은 양이 존재하였고, 회분은 균산이 5.22%, 균병이 2.81%로서 2배 정도 균산에 회분함량이 높았다. Cellulose와 hemicellulose를 포함하는 holocellulose 함량은 균산의 경우 47.6%, 균병에는 62.5%로 균병 쪽이 더 높게 나타났다.

3.2 렉틴의 추출 및 crude lectin분리

분리된 lectin 1 및 lectin 2로부터 분리된 fraction의 단백질을 BCA protein 법으로 정량한 결과를 Table 2에 나타내었다. 56°C에서 30분 heating 처리한 lectin(No. 5-8)의 protein량이 다소 적으나, marker protein을 기준으로 추측된, 약 21.5 kDa에서 31 kDa 사이의 분자량을 지니는 부분이 열처리하지 않은 lectin보다 비교적 높은 것을 알 수 있다. 그 부분은 활성을 지니는(Fig. 3) 부분으로, heating 처리에 의해서 활성이 있는 부분을 좀더 얻을 수 있음을 알 수 있다. 그러나, Yoshida 등(1994)에 의하면 heating 처리하게 되면 활성이 감소된다고 보고하고 있다. 이는 Yoshida 등의 열처리조건이 본 연구에서 보다도 더 강하여 단백질의 변성이 일어났기 때문인 것으로 생각된다. 균산과 균병으로 나누어 추출된 crude lectin 단백질을 정량하여 비교한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 균산부분이 균병부분에 비하여 2배 이상 높은 단백질을 함유하였다.

Protein의 분리 및 정제에 있어 protease의 영향을 최소화하기 위하여 일반적으로 protease의 inhibitor

Table 2. BCA protein analysis of crude lectin from *Lentinula edodes*.

Lectin 1	Protein, mg	Lectin 2	Protein, mg
fresh pileus (F1)	538	fresh pileus (HF1)	382
fresh stipe (F2)	209	fresh stipe (HF2)	317
dry pileus (D1)	1140	dry pileus (HD1)	859
dry stipe (D2)	490	dry stipe (HD2)	445

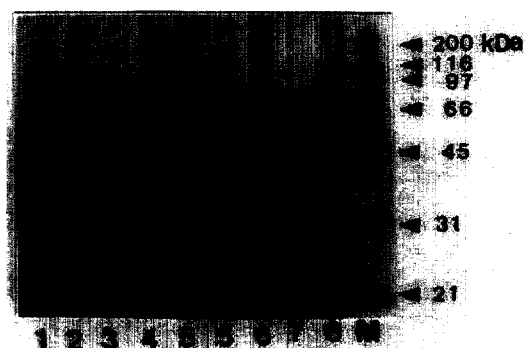


Fig. 1. SDS-Polyacrylamide electrophoresis (12.5% polyacrylamide gel) of crude lectin from *Lentinula edodes*.

1=F1, 2=F2, 3=D1, 4=D2, 5=HF1, 6=HF2, 7=HD1, 8=HD2
 M : MW (kDa) marker protein
 F1 : Fresh pileus, F2 : Fresh stipe;
 D1 : Dry pileus, D2 : Dry stipe
 H : Heat treatment (56°C, 30 min)

를 사용하는데, 본 실험에서 렉틴추출시 protease의 inhibitor로서 2 mM의 EDTA를 첨가하였다. crude lectin의 분리 후 전기 영동을 실시한 결과는 Fig. 1에 나타났다. No. 1-4는 위의 실험방법에서 설명한 바와 마찬가지로 lectin 1의 결과이고, No. 5-8는 56°C에서 30분 처리한 lectin 2의 결과인 바, 분리한 lectin이 균산 혹은 균병부분에 따라 다소 상이한 밴드를 보여주고 있다. 버섯을 건조함에 따라 균산의 경우 특히 31 kDa 부분의 밴드가 달라짐을 알 수 있었다.

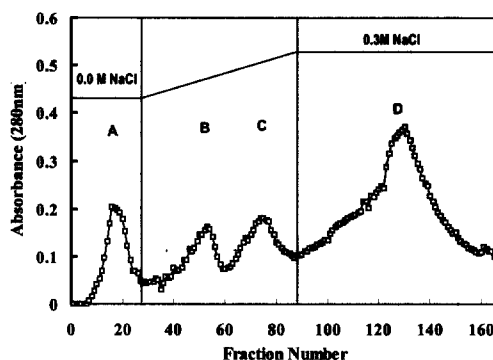


Fig. 2. Elution profiles (DEAE- Sephadex A-50 column) of crude lectin from *Lentinula edodes*.

A : Fraction No. 1-27; B : Fraction No. 28-59; C : Fraction No. 60-87; D : Fraction No. 88-166

3.3 렉틴의 정제

DEAE Sephadex A-50을 이용, 1차 정제를 한 결과는 Fig. 2와 같다. NaCl을 첨가하지 않은 부분을 A(Fraction No. 0-27), 0~0.3M NaCl의 농도로 gradient elution을 하여 두 개의 peak를 얻었으며 각각 B(Fraction No. 28-59), C(Fraction No. 60-87)로 했다. 나머지는 0.3 M NaCl 농도 만으로 elution 한 부분을 D(Fraction No. 88-166)로 하였다. 흡수를 나타내는 fraction A, B, C, D의 활성을 알아보기 위해 agglutination test를 실시하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다. Hemagglutinating activity을 통한 lectin의 활성은 적혈구의 응집여부에 따라 판단하는 것으로서, 응집이 일어난 well은 적혈구의 응집 덩어리가 분산되어 육안으로 희미하게 나타나며, 응집이 일어나지 않을 경우에는 적혈구들이 U-plate의 가운데로 모여 하나의 선명한 점으로 보여진다.

Fig. 3의 No. 8, 14, 16, 24는 각각 fraction A로 분류된 부분에, No. 36, 48는 fraction B부분에 속하는 fraction으로서 활성을 나타내고 있다. 또한, No. 64, 77, 84는 fraction C에 속하는 것으로 No. 64, 77은 fraction A 나 B에 비해 약하나마 활성을 나타

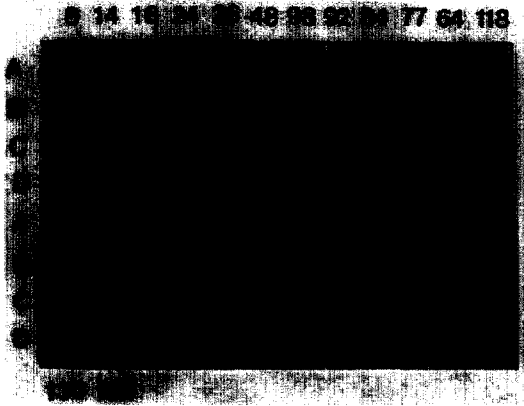


Fig. 3. Hemagglutinating activity of each elution fractions from DEAE Sephadex A-50 column for animal erythrocytes (Rabbit). A-D : Two-fold serial dilution of elution fraction.

Table 3. BCA protein analysis of purified crude lectin by DEAE Sephadex A-50 column.

Samples	Protein, μ g
A	1,880
B	1,330
C	4,326
D	11,944

내고 있으나, No. 84는 전혀 활성을 보이지 않는다. 그리고 fraction D에 속하는 나머지 No. 92, 98, 118, 130, 166는 전혀 활성을 나타내지 않았다. 이것으로 활성을 지니는 lectin의 주된 부분은 fraction A와 B임을 알 수 있었다. 또한, 이들의 protein함량은 Table 3와 같다. Crude lectin을 정제한 결과, Fraction A가 9.65%, B가 6.83%를, C가 22.2%를 차지하며, fraction D는 61.3%를 차지하였다. 따라서 활성을 나타내는 부분은 A 및 B 합쳐서 16.5%를 점유하였다.

이들을 각각 fraction별로 Amicon pressure ultrafilter(cut-off 10 kDa)로 농축하여 전기 영동을 실시하였으며, 그 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. 일반적으로 잘 알려진 콩으로부터 분리된 lectin



Fig. 4. SDS-polyacrylamide electrophoresis (12.5% polyacrylamide gel) of purified crude lectin by DEAE Sephadex A-50 column.

1=Con A, 2=A, 3=B, 4=C, 5=D, 6=D1, 7=HD1, 8=F1, 9=HF1
M : Molecular mass (in kDa) marker proteins, Con A : Concanavalin A (lectin from jack bean).

인 Con A의 분자량이 31 kDa 부근인 것에 비해 fraction A, B는 31 kDa과 21.5 kDa사이에 속하는 Con A보다 낮은 분자량을 나타내었으며, 분자량을 더 자세히 알기 위해 15% polyacrylamide gel을 이용, 전기영동을 실시한 결과, Con A의 경우 28 kDa으로 나타났으며, fraction A, B는 약 23 kDa 부근으로 추정할 수 있었다. 활성이 미미한 fraction C는 Fig. 4에 나타난 것처럼 분자량을 달리하는 단백질이 섞여있으며 활성을 가지는 23 kDa부근의 band 전후에 또 2개의 band를 가지고 있었는데, 이러한 상이한 전기영동 패턴이 agglutination test(Fig. 3)에서 fraction A와 B의 활성에 비해 약한 활성을 결과한 것이 아닌가 생각된다. 이와 마찬가지로 fraction D의 경우, 23 kDa부근의 band가 전혀 없으며, 따라서 agglutination test(Fig. 3)에서 활성을 나타내지 않았음을 알 수 있다. 이것으로서 표고버섯의 lectin 활성은 fraction A와 B로부터 유래됨을 알 수 있었다.

균산으로부터 추출한 crude lectin 및 음이온교환 수지 DEAE Sephadex A-50로 정제한 lectin에 대하

Table 4. Amino acid composition of *Lentinula edodes* lectins.

Amino acid, %	Crude lectin	Purified lectin
Aspartic acid	6.20	10.4
Serine	6.11	9.09
Proline	17.1	13.2
Alanine	13.0	16.4
Cystine	9.85	9.01
Valine	18.2	16.3
Isoleucine	8.33	9.22
Leucine	0	0
Tyrosine	0	0
Phenylalanine	4.05	2.77
Histidine	6.33	10.3
Lysine	4.89	0
Arginine	6.62	4.66
Total amino acid, nmol	47.1	48.0

여 아미노산조성을 분석한 결과는 Table 4와 같다. Crude lectin을 정제함으로써 aspartic acid, serine, alanine 및 histidine이 증가되었는데, 특히 histidine은 효소활성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, lectin이 정제되어감에 따라 그 활성도 증가되는 사실과 상관이 있을 것으로 생각된다. 그리고 표고버섯 lectin에서는 glutamic acid, glycine, leucine, tyrosine 및 methionine 등이 없었다.

Fraction A와 B를 다시 hydroxyapatite column을 이용하여 정제를 한번 더 실시하였다. Fig. 5는 fraction A를, Fig. 6는 fraction B를 각각 0~0.15 M NaCl gradient elution을 실시한 결과이다. Fig. 5과 6에 나타난 바와 마찬가지로 각각 두 개의 peak를 나타내었다.

Lectin 추출 및 정제수율과 관련하여, 건조된 균산 시료 50 g으로부터 crude lectin 720 mg(균산시료의 40.0% 수율)을 얻었으며, 이 crude lectin을 DEAE Sephadex A-50 chromatography에 의한 정제로 201 mg(crude lectin의 28% 수율)을 얻었으며, 다시 이로부터 분리한 lectin 활성이 있는 protein은 33 mg으로서 crude lectin의 4.6% 수율에 해당하였다.

이들을 LA-a, LA-b, LB-a, LB-b로 구분하여 전기영동한 결과를 Fig. 7에 나타냈다. 이들은 두 개의

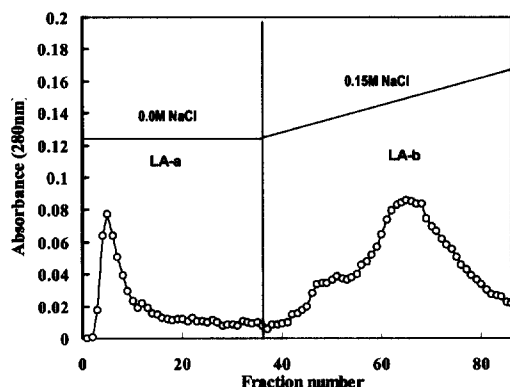


Fig. 5. Elution profiles of A fraction from DEAE Sephadex A-50 column (hydroxyapatite, 2.5×0.6 cm) chromatography. LA-a : Fraction No. 1-36; LA-b : Fraction No. 37-86.

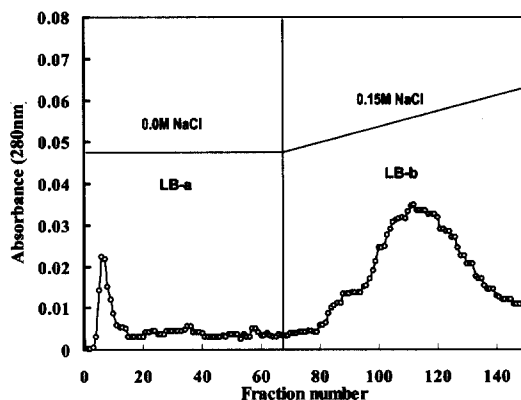


Fig. 6. Elution profiles of B fraction from DEAE Sephadex A-50 column (hydroxyapatite, 2.5×0.6 cm) chromatography. LB-a : Fraction No. 1-66; LB-b : Fraction No. 67-150.

band가 근접하게 붙어 있어 분리가 상당히 어려웠으며, LA-a와 LB-b는 SDS-PAGE에서 약 24 kDa과 23 kDa의 분자량을 나타냈다.

4. 결 론

표고버섯(*Lentinula edodes*)의 화학 성분을 분석

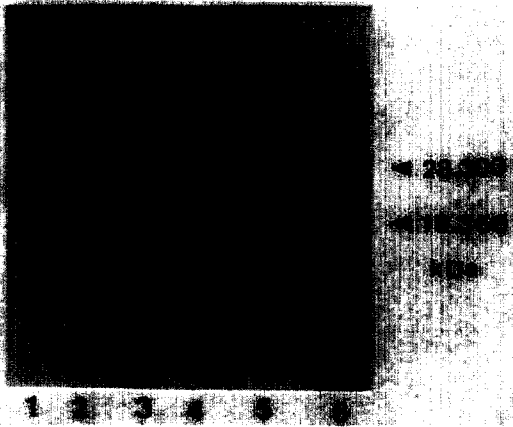


Fig. 7. SDS-Polyacrylamide electrophoresis (15% polyacrylamide gel) of eluted fractions by hydroxyapatite column. 1=LA-a, 2=LA-b, 3=LB-b, 4=LC-a, 5=HM, 6=LM
 HM : High molecular mass (kDa) proteins, LM : Low molecular mass (kDa) proteins.

한 결과, 온수·유기용매 추출물 모두가 균산이 균병에 비해 1.4배 높았으며, 지방성분은 균산 및 균병에 거의 같은 양이 존재하는 것으로 나타났다. 회분에 있어서는 균산이 5.22%, 균병이 2.81%로서 2배 정도 균산의 회분함량이 높았다. Holocellulose의 경우 균산의 경우 47.6%, 균병에는 62.5%로서 균병쪽이 더 높게 나타났다.

버섯균산과 균병으로 나누어 추출된 crude lectin 단백질을 정량하여 비교한 결과, 균산부분이 균병부분에 비하여 2배 이상 높은 단백질을 함유하였으며, 가열하여 얻은 lectin 2의 단백질 함량 및 활성은 미처리보다 감소되었다.

건조된 균산 50 g으로부터 얻은 crude lectin은 46.03% 수율인 720 mg이고, 다시 이로부터 DEAE Sephadex A-50 column에 의한 분리·정제 후 crude lectin 의 28%인 201 mg의 정제 lectin을 얻을 수 있었으며, 이 가운데 활성이 있는 부분은 33 mg으로서 crude lectin의 4.6%이었다. Crude lectin을 정제함으로써 aspartic acid, serine, alanine 및 histidine이 증가되었고, glutamic acid, glycine,

leucine, tyrosine 및 methionine 등이 lectin에는 검출되지 않았다. DEAE Sephadex A-50 column의 chromatography를 통해 분리·정제한 lectin의 활성을 나타내는 주된 부분은 fraction A 및 B로서 약 23 kDa의 분자량을 가지고 있었으며, agglutination test 결과 적혈구응집활성을 나타냈고, 그 이외의 fraction들은 활성이 나타나지 않았다. 활성을 지니는 부분을 다시 hydroxyapatite column을 사용, 한번 더 정제하여 얻은 LA-a와 LB-b는 각각 24 kDa 과 23 kDa의 분자량을 나타냈다.

참 고 문 헌

- 1 권달호, 류병호, 김희숙, 김명순, 이세윤, 박종옥, 1993, 팔루근 렉틴의 세포응집과 면역활성에 대한 영향, Kor. Biochem. 26(6): 503.
- 2 박상진, 이종윤, 조남석, 조병목. 1993. 목재과학실험서. 도서출판 광일문화사 pp. 473-534.
- 3 Aub, T. C., C. Tieslau, and A. Lankester. 1963. Reaction of normal and tumor cell surfaces to enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 50: 613-619.
- 4 Boyd, W. C. and E. Shapleigh, 1954. Specific precipitating activity of plant agglutinins(Lectins), Science 119: 419-428.
- 5 Chang, J. B., W. H. Park, E. C. Choi, and B. K. Kim, 1988. Studies on Constituents of the Higher fungi of Korea(LIV), Arch. Pharm. Res. 11: 203-210.
- 6 Chihara, G., J. Hamuro, Y. Y. Maeda, Y. Arai, and F. Fukuoka. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity especially Lectinan from *Lentinus edodes*, Cancer Res. 30: 2776-2785.
- 7 Chihara, G., Y. Maed, J. Humuro, T. Sasaki, and F. Fukuoka, 1969. Inhibition of Mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*, Nature, 222: 687-695.
- 8 Cho, H. J., M. J. Shim, E. C. Choi, and B. K. Kim, 1988. Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea (LVII) - Comparison of Various Antitumor Constituents of *Coriolus versicolor* -, Kor. J. Mycol. 16(3): 162-171.
- 9 Chung, S. R. and K. H. Jeune-Chung, 1981. Isolation, Purification and Partial Characterization of New

- Lectins from Korean Plant Resources(I), Kor. Biochem. 14(3): 199-208.
10. Chung, S. R., I. S. Choi, and K. H. Jeune-Chung, 1994. Studies on Lectins from Marine Animal *Chlorostoma argyrostoma turbinatum*, Kor. Pharm. 25(2): 121-130.
 11. Chung, S.R., K.H. Jeune-Chung, S.Y. Park, and S.T. Jang, 1993. Toxicity and Lectins Constituents from the Seed of *Cornus officinalis*, Kor. Pharm. 24(2): 177-184.
 12. Chung, S. R., K. H. Jeune-Chung, and K. A. Kim, 1980. Arch. Pharm. Res. 3: 31-36.
 13. Fujii, T., H. Maeda, F. Suzuki, and N. Ishida, 1978. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture media of *Lentinus edodes*, J. Antibiot. 31: 1079-1088.
 14. Goldstein, I. J., R.C. Hugas, M. Monsigny, T. Osawa, and N. Sharon, 1980. What should be called a lectin ?, Nature 285: 66-72.
 15. Han, M. D., J. W. Lee, S. K. Chung, S. Y. Lee, and K. H. Yoon 1995. The effects of carbon sources on antitumor and anticomplementary activities of Ganoderan extracted from the mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009, Korean J. Mycology 23(3): 209-215.
 16. Jeune-Chung, K. H. and M. K. Kim, and S. R. Chung, 1987. Studies on Lectins from Mushrooms(II), Yakhak Hoeji, 31(4): 213-218.
 17. Jeune-Chung, K. H., Y. H. Chae, Y. A. Suh, and S. R. Chung, 1983. Biophysicochemical Studies on Lectins Isolated and Purified from Leguminosae (E-PHA Lectin), Korean Biochem. J. 16(1): 51-60.
 18. Kim, B. K., J. E. Robbers, K. S. Chung, H. S. Chung, and E. C. Choi, 1982. Antitumor Components of *Cryptoporus volvatus*, Kor. J. Mycol. 10(3): 111-119.
 19. Kim, Y. J., C. O. Lee, M. J. Shim, S. W. Kim, E. C. Choi, and B. K. Kim, 1984. Studies on Antitumor Components of Cultured Basidiomycetes, Kor. J. Mycol. 12(1): 35-42.
 20. Lee, C. O., H. S. Kim, E. C. Choi, and B. K. Kim, 1986. Studies on Constituents of the Higher Fungi of Korea(IV), Kor. J. Pharm. 17(1): 23-30.
 21. Lee, K. L., C. O. Lee, H. W. Kim, J. W. Kim, S. W. Kim, E. C. Choi, and B. K. Kim, 1985. Studies on Constituents of the Higher Fungi of Korea (XXXVIII), Kor. J. Mycol. 13(1): 11-20.
 22. Lee, S. A. K. S. Chung, M. J. Shim, E. C. Choi, and B. K. Kim, 1981. Studies on the antitumor components of Korean basidiomycetes(II) : Antitumor components of *Schizophyllum commune* and *Auricularia auricula - Judae*, Kor. J. Mycol. 9(1): 25-33.
 23. Lis, H. and N. Sharon, 1977. Lectins : Their chemistry and application to immunology, in the Antigens, (Ed. Sela, M.). Academic Press, New York, pp. 429-529.
 24. Lowry, O. H., N. J. Resebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagents, J. Bio. Chem. 193: 265-275.
 25. Mizuno, T., 1989, Development and Utilization of bioactive substances from medicinal and edible mushroom fungi(1), The Chemical Times 1: 12-20.
 26. Park, E. K., E. C. Choi, and B. K. Kim, 1979. Studies on the constituents of higher fungi of Korea (XXIV), Chemical analysis of antineoplastic components of *Coriolus versicolor*(L. ex Fr.) Quel., *Pleuroteus ostreatus*(Fr.) Kummer, and *Lentinus edodes*(Berk) Sing. Arch. Pharm. Res. 2: 153-160.
 27. Park, H. J., H. W. Kim, M. S. Woo, M. J. Shim, W. H. Park, E. C. Choi, and B. K. Kim, 1985. Studies on Constituents of the Higher Fungi of Korea (XLVII), Kor. J. Mycol. 13(3): 131-138.
 28. Park, K. S., J. Y. Lee, S. J. Lee, S. H. Kim, and J. S. Lee, 1992. Extraction and separation of proteinbound polysaccharide produced by *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., Kor. J. Mycol. 20(1): 72-81.
 29. Park, W. B. and H. S. Kim, 1995. Isolation and Characterization of Lectin from *Viscum coloratum*, Yakhak Hoeji 38(4): 418-426.
 30. Presant, C. A. and S. Kornfeld. 1972. Characterization of the cell surface receptor for the *Agaricus bisporus*. J. Biol. Chem. 247: 6937-6945.
 31. Ravindranath, M. H., H. H. Higa, E. L. Cooper, and J. C. Paulson, 1985, Purification and characterization of an O-acetylsialic acid specific lectin from marine crab. *Cancer antennarius*. J. Biol. Chem. 260: 8850-8856.
 32. Sage, H. J. and S. L. Connet. 1969. Studies on a hemagglutinin from the from the meadow

- mushroom. - Purification, composition and structure of *Agaricus campestris* hemagglutinin. J. Biol. Chem. 63: 563-568.
33. Sharon, N. 1977. Lectins. Sci. Am. 6: 108-119.
34. Sharon, N. 1983. Lectin receptors as lymphocyte surface markers. Adv. Immunol. 34: 213-218.
35. Sueyoshi, S., T. Tsuji, and T. Osawa. 1984. Purification and characterization of four isolectin of mushroom (*Agaricus bisporus*). Biol. Chem. 306: 213-217.
36. Tusda, M., 1979. Purification and characterization of a lectin from mushroom, *Flammulina velutipes*. J. Biochem. 86: 1463-1468.
37. Yoshida, M., S-I. Kato, S. Oguri, and Y. Nagata, 1994. Purification and properties of lectins from a mushroom, *Pleurotus cornucopiae*. Biosci. Biotech. Biochem. 58(3): 498-501.
38. Yun, D. H., E. J. Park, J. O. Park, Y. H. Lee, J. K. Seo, and S. H. Ryu, 1995. Purification and characterization of a new galactoside specific lectin from *Trichosanthes kirilowii* root, J. Biochem. Mol. Biol. 28(1): 6-11.