

구름버섯 배양액으로부터 단백질다당류의 추출 및 정제방법

박경숙 · 이재양* · 이상직* · 김선희 · 이재성

영남대학교 식품가공학과, *생화학과

Extraction and Separation of Protein-bound Polysaccharide Produced by *Coriolus versicolor* (Fr) *Quel*.

Kyung-Sook Park, Jae-Yang Lee*, Sang-Jik Lee*, Seon-Hee Kim and Jae-Sung Lee

Department of Food Science and Technology, *Department of Biochemistry,
Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Received

ABSTRACT: The extraction and separation methods of protein-bound polysaccharides from the mycelium and culture broth of *Coriolus versicolor* (Fr) *Quel* were investigated. The use of 2% solution of surface active agent, Triton X-100, was effective for extraction of the protein-bound polysaccharides from the mycelium. For the separation and partial purification of the protein-bound polysaccharides, the column chromatography using DEAE-Cellulose and DEAE-Sephadex proved to be effective.

KEYWORDS: Protein-bound polysaccharide, *Coriolus versicolor*

동물의 결합조직이나 체액에 많이 존재하는 mucopolysaccharide는 생체내에 단백질과 결합된 복합체로서 존재하는 데 이를 proteoglycan 혹은 protein-bound polysaccharide라 한다. mucopolysaccharide 즉, protein-bound polysaccharides (단백다당류)는 생체내 결합조직의 중요한 성분으로 많이 연구되어 왔다. 또한 연구자들에 의해 고등균류 중 버섯류에 존재하는 유용한 생리활성 물질로서 항암작용이 보고된 단백질다당류에 대해서도 활발한 연구가 진행중이다. 특히 Roland(1960) 등이 *Calvatia gigantea*에서 calvacin 분리로 항암성분에 관한 연구가 시작된 이래로 표고버섯(Chihara 등, 1970; Maeda 등, 1971), 팽나무버섯(Yoshioka 등, 1973), 화경버섯(Fukuda 등, 1975)에서 추출된 유효성분의 항암작용과 그것의 항암 mechanism 등에 관해서 보고되어졌고, Tsukagoshi (1974) 등은 구름버섯 *Coriolus versicolor* (Fr) *Quel*에서 추출된 단백질다당류의 sarcoma-180에 대한 항암작용을 보고하였다. 따라서 버섯의 유효성분중 항암효과를 지니는 단백질다당류에 관한 특성을 규명하고자 하는 실험이 최근 활발히 진행되고 있다(Hirase 등, 1976; Cho 등, 1988; Park

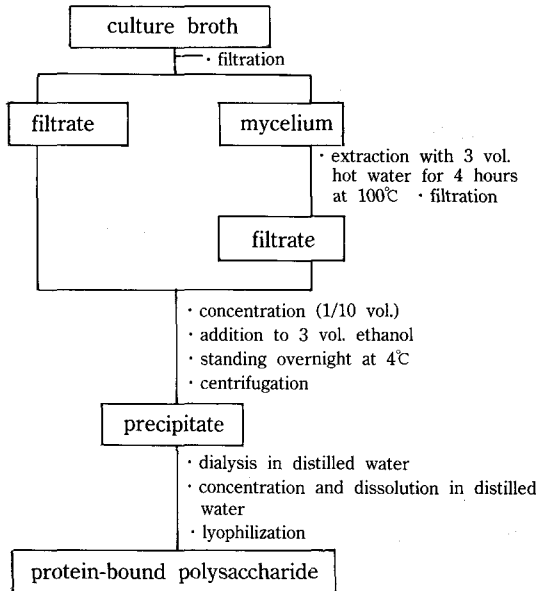
등, 1989).

이 연구를 위해서는 우선 배양 균사체에서 단백질다당류의 분리가 필수적이며, 현재 균사 배양액을 열수로 처리한 다음, ethanol로 침전시키는 방법이 주로 이용되고 있다. 그러므로 이 과정으로 얻어진 단백질다당류에는 비항암적인 단백질 및 당류 성분들도 포함될 것으로 추측된다. 균류 내 항암작용성분인 단백질다당류의 특성과 생리적 활성을 조사하기 위해서는 가능한 순수한 상태로 이 성분이 분리되어야 한다.

본 연구의 목적은 구름버섯 균사 배양체로부터 항암성분인 단백질다당류를 보다 순수하게 분리정제하는 방법을 개발하는 것과, 지금까지 사용된 열수를 이용한 추출방법 외에 제면활성제용액에 의한 추출방법을 서로 비교하고, 당분석에 의한 정량방법을 확립하는 데 있다.

材料 및 方法

균주: 본 실험에 사용한 균주는 구름버섯인 *Coriolus versicolor* (L. ex Fr) *Quel* 16002이며 본



Scheme 1. Extraction and fractionation of the protein-bound polysaccharide from the cultured broth of *Coriolus versicolor*.

연구실에서 보관중인 균주를 사용하였다.

배지: 균의 보존용 배지는 조성이 malt extract 1.0%, yeast extract 0.4%, glucose 0.4%, agar 1.5%인 MYG배지 (Yanagi 등, 1984)를 사용하였고, 액체진탕배양용 배지는 구름버섯이 가장 잘 자라는 것으로 보고된 CVM배지(Park 등, 1991)를 사용하였다.

균배양 방법: CVM액체배지에 7일간 배양된 균사체를 Homogenizer(NISSEI AN-11)로 1분간 (3,000 rpm) 균질화하고, 이를 200 ml 액체 배지를 넣은 500 ml 삼각플라스크에 15 ml씩 접종하여 26±1°C에서 80 strokes/min로 7일간 진탕 배양하였다.

균사체로부터 단백질다당류 시료조제: 배양액을 여과하여 여과액과 균사체를 분리한 다음 일정량의 균사체에 3배량의 뜨거운 물을 가하여 100°C에서 4시간 동안 추출한 후 다시 여과하였다. 잔사를 제거한 여과액과 배양액의 여과액을 모아 감압농축기로 1/10량으로 농축한 후 3배량의 ethanol을 가하여 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 생성된 침전물을 15,000 rpm에서 30분 간 원심분리로 수거한 뒤 이를 소량의 증류수에 녹이고 24시간 동안 증류수로 투석한 다음 동결건조하여 단백질다당류를 얻었으며 이를 co-

lumn chromatography에 의하여 정제 하였다 (Scheme 1).

계면활성제 용액에 의한 단백질다당류 추출: 균사 배양액의 여과로 얻어진 균사체의 일정량에 대해서 2%(w/v) Triton X-100 용액 또는 4 N NaCl이 포함된 2%(w/v) Triton X-100 용액을 3배량씩 가한 다음 실온에서 4시간 동안 교반시키면서 추출하였다. 추출액으로부터 동결건조된 단백질다당류 시료를 얻기까지는 열수 추출액으로부터 동결건조된 단백질다당류를 얻는 과정과 동일한 방법으로 실시하였다.

Chromatography: Chromatography를 이용한 단백질다당류의 정제는 alumina, DEAE-Cellulose, 및 DEAE-Sephadex를 충전제로 하여 실시하였다. 먼저 chromatography용 alumina를 증류수에 반죽하여 2×60 cm 인 column에 충전시키고 준비된 시료를 주입하였다. 증류수를 전개용매로 시료를 전개시켰고 용출액을 10 ml씩 시험관에 분취하였다.

DETE-Cellulose와 DEAE-Sephadex는 Cooper (1977)의 방법으로 처리하였다. 즉 0.2 N HCl로 처리 후 0.2 N NaOH로 처리하고 증류수로 중성이 되게 반복해서 세척하였다. 이어서 수지의 기포를 제거한 다음 DETE-Cellulose는 2×50 cm인 column에, DETE-Sephadex는 2×45 cm인 column에 충전시키고 준비된 시료를 주입시켰다. 시료의 전개는 증류수로 하였으며 전개된 용출액을 10 ml씩 분취하였다. 280 nm에서의 흡광도 측정으로 단백질의 용출을 확인한 다음 이들 단백질 peak에 대하여 anthrone test를 실시한 후 625 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 단백질다당류를 확인하였다.

당분석: 다당류의 정량분석은 Cho(1988) 등과 Carney(1986)의 방법에 준해 실시하였다. anthrone 시약 200 mg을 absolute ethyl alcohol 5 ml에 용해한 후 75% H₂SO₄를 가해 100 ml로 한 다음 glucose 표준용액에 대한 정색반응을 하였다. 반응 후 625 nm에서 흡광도를 측정하여 glucose 농도에 따른 표준곡선을 만들었으며, 이를 기준으로 시료 중 당의 함량을 정량하였다.

結果 및 考察

버섯류에 존재하는 유효성분인 단백질다당류의 분리하는 먼저 배양된 균사체에 대한 추출로 시작된다.

Table 1. Comparison of protein-bound polysaccharide contents obtained from cultured broth according to extraction conditions.

Extraction condition	Yield of protein-bound polysaccharide(%)
hot water	5.50 ^a
2% Triton X-100	7.36 ^a
2% Triton X-100 containing 4N NaCl	not obtained

^a The shown values were calculated on the basis of amount of 100 g mycelium.

이 과정은 지금까지는 주로 100°C에서 뜨거운 물을 이용한 열 추출로 실시되었다. 그러나 생체의 결합조직 및 cartilage 조직으로부터 단백다당류의 추출에는 여러가지 용매와 계면활성제들이 사용되어 왔다(Faltz 등, 1979; Kjellen 등, 1980). 본 연구에서는 지금까지의 열수에 의한 단백다당류의 추출 정도와 생체조직을 대상으로 단백다당류를 추출할 때 많이 사용되는 계면활성제 중 비이온성 계열에 속하는 계면활성제인 Triton X-100을 담자균류 균사체에 처리했을 때의 효과를 비교하였다(Table 1). 열수추출 후 ethanol 침전으로 얻어진 단백다당류의 수율과 2% Triton X-100 추출 후 ethanol 침전으로 얻어진 단백다당류의 함량을 비교한 결과, 열수추출보다 Triton X-100에 의한 추출이 더 효과적인 것으로 나타났다. 그러나 전해질을 포함한 계면활성제 용액이 효율적이라는 보고(Oldberg 등, 1979)와는 달리 Triton X-100에 NaCl을 4 N 농도되게 첨가한 용액으로 추출하였을 경우에는 ethanol에 의하여 거의 침전이 일어나지 않았다. 4N NaCl용액이 단백질의 추출과정에 용해를 감소시킨 것으로 생각된다.

이처럼 계면활성제만으로 혹은 전해질과 조합해서 담자균류의 균사체에 처리했을 때의 효과는 이미 보고된 생체조직의 단백다당류 추출 효과와는 차이가 있음을 알 수 있었고 다른 종류의 계면활성제 및 전해질이 추출에 미치는 영향을 확인해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

균사배양액에 대한 추출과정에 이어서 ethanol침가로 얻어진 침전물이 항암효과를 지니는 단백다당류로 일반적으로 인정하고 있으나(Park 등, 1989)

Table 2. Yield of protein-bound polysaccharide from column chromatography.

Packing material	Yield of protein-bound polysaccharide(mg/ml)
Alumina	0.12
DEAE-Cellulose	0.17
DEAE-Sephadex	0.34

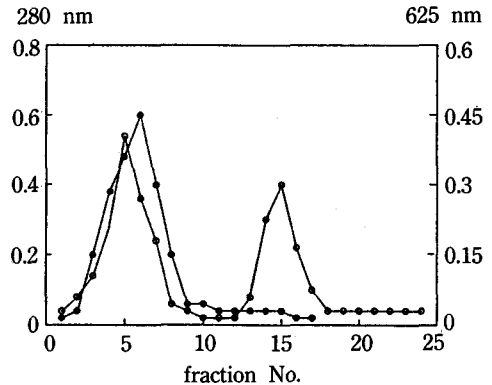


Fig. 1. Column chromatogram of ethanol precipitate on alumina.

○—○:O.D at 280 nm for protein elution
●—●:O.D at 625 nm for glucan elution

ethanol 침전물에는 일반 단백질의 함유 가능성을 배제할 수 없으므로 chromatography에 의한 정제 과정이 필요하다고 생각된다.

먼저 alumina를 충전제로 한 chromatography를 실시하였을 때(Fig. 1) 6번째 분획에서 용출된 단백질 peak는 anthrone 반응에 의하여 단백질 함유 다당류임을 확인할 수 있었다. 또한 ion exchange resin인 DEAE-Cellulose를 충전제로 한 chromatography에서는 11-12번째 분획에서, DEAE-sephadex판에서는 12번째 분획에서 각각 최고의 anthrone 정색반응을 나타내는 단백질 함유 다당류의 용출을 확인하였다(Fig. 2, 3)

이들 세 종류의 고정상, 즉 alumina를 충전제로 했을 때와 DEAE-Cellulose와 DEAE-Sephadex를 충전제로 했을 때 각각의 시료의 전개양상에는 약간의 차이가 있음을 알 수 있었다. 즉 280 nm의 흡광도로 확인된 시료단백질 성분의 용출현상을 볼 때 alumina 상에서는 두 개의, DEAE-Cellulose와 DEAE-Sephadex에서는 세개의 peak가 얻어졌다.

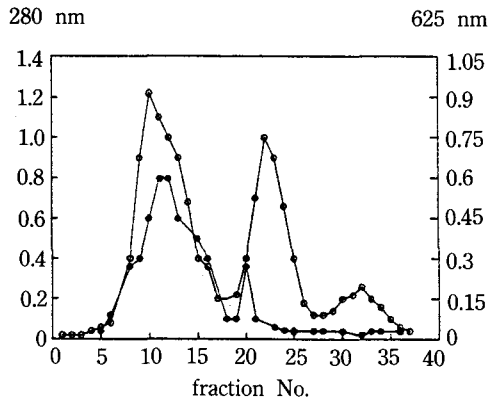


Fig. 2. Column chromatogram of ethanol precipitate on DEAE-cellulose.

○—○:O.D at 280 nm for protein elution
●—●:O.D at 625 nm for glucan elution

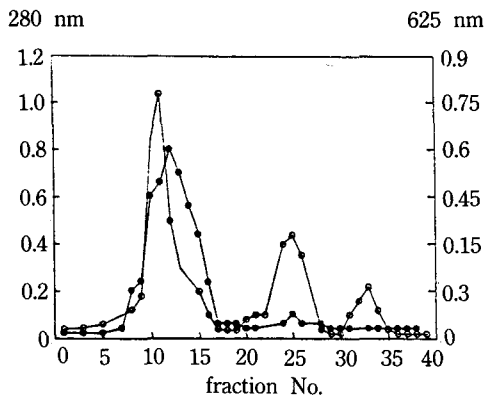


Fig. 3. Column chromatogram of ethanol precipitate on DEAE-sephadex.

○—○:O.D at 280 nm for protein elution
●—●:O.D at 625 nm for glucan elution

그리고 anthrone정색반응과 625 nm에서 측정된 흡광도로 확인된 단백질의 전개현상도 alumina상에서와 DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex상에서 차이를 확인하였다.

각각의 전개과정에서 가장 높은 anthrone 정색 반응을 보인 각 분획에 대한 당함량을 glucose를 표준당으로 하여 작성된 검량선을 기준으로 확인하였는데 alumina인 경우에는 0.12 mg/ml이고 DEAE-Cellulose와 DEAE-Sephadex에서는 각각 0.17 mg/ml, 0.34 mg/ml이었다. 그러므로 이 두 경우에서 alumina를 통해 전개했을 경우보다 더 많은 단백질이 용출되었음을 알았다. 따라서 담자균 배양액

및 균사체 추출액을 ethanol로 침전시킨 후 단백질의 chromatography를 통한정제에는 alumina를 이용한 흡착 chromatography 방법보다 DEAE-Cellulose나 DEAE-Sephadex를 이용하는 것이 정제도와 수득률에 있어서 더 효율적이라고 하겠다.

摘 要

고등균류의 배양액 및 균사체로부터 항암작용이 있는 단백질의 추출 및 정제방법에 관한 실험을 구름버섯 균사배양체를 이용하고 실시하였다. 실온에서 비이온성 계면활성제인 2% Triton X-100과 함께 교반시키면서 추출했을 때 얻어진 단백질의 함량이 이미 사용되어 온 100°C 열수에 의한 추출방법을 통해 얻을 수 있는 것보다 더 좋았다. 그러나 4 N NaCl을 포함한 2% Triton-X-100 용액으로 처리했을 때는 추출 후 ethanol 침전과정에서 단백질의 침전물을 얻을 수 없었다.

열수추출과 ethanol 침전과정에서 얻어진 단백질의 순도를 높이기 위해 chromatography를 이용한 정제실험을 하였다. alumina와 DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex를 각각 충전제로 하여 시료를 전개시키고 280 nm에서의 흡광도를 기준으로 단백질 성분의 용출을 확인하고 이들 분획에 대하여 anthrone정색반응과 625 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 단백질의 분리, 정제하였다. 단백질의 정제는 alumina를 충전제로 사용하는 것보다 DEAE-Cellulose와, DEAE-Sephadex를 충전제로 한 chromatography에 의하여 더 효율적으로 정제되었다.

감사의 글

본 연구는 한국 학술진흥재단 연구비지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

參考文獻

- Carney, S. L. 1986. in M. F. Chaplin and J. F. Kennedy eds. *Carbohydrate analysis, a practical approach*. IRL Press. Oxford and Washington DC. p. 135.

- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* **30**: 2776-2781.
- Cho, H. J., Shim, M. J., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1988. Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea(L VII). Comparison of Various Antitumor Constituents of *Coriolus versicolor*. *Korean J. Mycol.* **16**: 1622-174.
- Cooper, T. G. 1977. In *The Tools of Biochemistry*. A Wiley Interscience Publication N. Y. and London. p. 136-168.
- Faltz, L. L., Reddi, A. H., Hascall, G. K., Martin, D., Pita, J. C. and Hascall, V. C. 1979. Characteristics of Proteoglycans Extracted from the Swarm Rat Chondrosarcoma with Associative Solvents, *J. Biol. Chem.*, **254**: 1375-1380.
- Fukuda, K., Uematsu, T., Hamada, A., Akiya, S., Komatsu, N. Okubo, S. 1975. The polysaccharide from *Lampteromyces japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.* **23**: 1955-1959.
- Hirase, S., Nakai, S., Akatsu, T., Kobayashi, A., Oohara, M., Matsunaga, K., Fujii, M., Kodaira, S., Fujii, T., Furusho, T., Ohmura, Y., Wada, T., Yoshikumi, C., Ueno, S. and Ohtsuka, S. 1976a. Structural studies on the antitumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes). I. Fractionation with barium hydroxide. *Yakugaku Zasshi* **96**: 413-418.
- Hirase, S., Nakai, S., Akatsu, T., Kobayashi, A., Oohara, M., Matsunaga, K., Fujii, M., Kodaira, S., Fujii, T., Furusho, T., Ohmura, Y., Wada, T., Yoshikumi, C., Ueno, S. and Ohtsuka, S. 1976b. Structural studies on the antitumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes). II. Structures of β -D-glucan moieties of fractionated polysaccharides. *Yakugaku Zasshi*, **96**: 419-424.
- Kjellen, L., Oldberg, A. and Høök, M. 1980. Cell-surface Heparan Sulfate: Mechanisms of proteoglycan-cell association. *J. Biol. Chem.*, **255**, 10407-10413.
- Maeda, Y. and Chihara, G. 1971. Lentinan, a new immunoaccelerator of cell-mediated responses. *Nature* **229**: 634.
- Oldberg, A., Kjellen, L. and Høök, M. 1979. Cell-Surface Heparan Sulfate: Isolation and Characterization of A proteoglycan from rat liver membranes. *J. Biol. Chem.* **254**, 8505-8510.
- Park, K. S. and Lee, J. S. 1991. Optimization of Media Composition and Culture Conditions for the Mycelial of *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **6**: 91-98.
- Park, Y. D., Hong, Y. K., Whang, W. K., Huh, J. D. and Park, S. 1989. Comparisons of Protein-bound Polysaccharide Contents Obtained from Mycelial Cultured Broth and Fruit body of *Coriolus versicolor*. *Korean J. Mycol.* **17**: 223-228.
- Roland, J. F., Chmielewicz, Z. F., Weiner, B. A., Gross, A. M., Boening, O. P., Luok, J. V., Bardos, T. J., Reilly, H. C., Sugiura, K., Stock, C. C., Lucas, E. H., Byerrum, R. U. and Stevens, J. A. 1960. Calvacin, a new antitumor agent. *Science* **23**: 1897.
- Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann*, **65**: 557-558.
- Yanagi, S. O. and Takebe, I. 1984. An efficient method for the isolation of mycelial protoplasts from *Coprinus macrorrhizus* other basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 58-60.
- Yoshioka, Y., Sano, T. and Ikekawa, T. 1973. Studies on antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr) sing. I. *Chem. Pharm. Bull.* **21**: 1772-1776.

Accepted for Publication on April 2, 1992