

양송이 버섯의 생물활성 다당류에 관한 연구

권미향* · 임은정¹ · 성하진¹

*고려대학교 생명공학연구소, ¹고려대학교 생명공학원

초 록 : 10종의 식용 버섯 자실체에 대한 항보체 활성 검색에서 가장 높은 활성을 나타낸 양송이버섯 자실체를 대상으로 항보체 활성물질의 추출조건을 조사하였다. 최적조건으로서 5% urea가 함유된 0.1 N NaOH 용액으로 65°C에서 2시간동안 양송이버섯 자실체를 추출한 후 methanol 가용획분이 제거된 조다당 획분 AB-0를 얻었다. AB-0는 1 mg/ml에서 90% 이상의 높은 항보체활성을 나타내었으며 마우스에 이식된 sarcoma-180에 대하여 74%의 저지효과를 보였다. AB-0를 acetone 농도에 따른 침전 분획을 실시하여 AB-20, AB-40, AB-60, AB-80, AB-A의 5개의 획분을 얻었다. 이중 가장 높은 항보체활성과 수율을 나타낸 AB-20 획분은 탄수화물 39%, 단백질 46%를 함유하였으며, 구성당은 glucose, arabinose, xylose, galactose, mannose가 6.49:1.98:1.24:1.00:0.71의 비율로 존재하였고 구성아미노산은 isoleucine(12.60%), glutamic acid+glutamine(12.45%), valine(11.79%), alanine(11.46%), leucine(10.19%)와 aspartic acid, asparagine(10.56%) 등 이었다. Pronase 처리한 AB-20에서는 78.5%의 항보체활성을 나타내고 대조군에 비해 14.5% 감소하였으나, AB-20의 periodate 산화물에서는 활성이 42.6%로 50% 이상 크게 감소하였다. 따라서 양송이 버섯의 알칼리 추출물중 가장 강한 활성을 보인 AB-20의 주요 활성부위는 다당류이며 단백질도 일부 관여하는 것으로 생각되었다.(1997년 11월 17일 접수, 1997년 12월 19일 수리)

서 론

최근 식품 및 약용으로 사용되는 버섯의 건강향진 효능에 관하여 일반인들의 관심이 높아짐에 따라 식생활에 자연식품으로서 소비가 꾸준히 증가하고 있다.¹⁾ 버섯은 당질, 단백질, 비타민, 무기질 등의 일반 영양소들이 풍부할 뿐만 아니라 다양한 생물활성이 보고되고 있는데 특히 항암효과는 일본을 중심으로 활발히 연구되어 왔으며,²⁻⁴⁾ 최근 국내에서도 한국산 버섯류의 항종양 활성에 관한 연구들이 보고되고 있다. 활성성분들은 대부분 버섯 자실체나 액체배양 균사체로부터 추출된 다당류들로서 대표적으로 표고버섯 (*Lentinus edodes*) 자실체에서 분리한 순수 다당체 lentinan이 sarcoma-180에 대하여 강한 항암작용을 나타낸다고 보고되었다.⁵⁾ 구름버섯 (*Coriolus versicolor*)에서 추출한 단백질 다당인 Krestin 또한 sarcoma-180, P-388과 Yoshida sarcoma 등 다양한 암세포에 항암효과를 나타내었으며⁶⁾ 암환자에게 경구 투여시 다른 부작용없이 임상적 효과를 보이고 있다.⁷⁾ Krestin은 12~14%의 단백질을 함유하고 있으며 다당류 부분의 구조는 1→4, 1→3 또는 1→6 branch를 가지는 β-glucan으로서⁸⁾ 단백질 부분이 항암활성의 필수적인 부분이라는 하지만 그 기능은 분명하게 밝혀져 있지 않다.⁹⁾ 버섯 다당류들의 항종양작용은 암세포를 직접적으로 공격하지는 않고 숙주의 면역계에 작용하여 생체방어력 증가에 의한 것으로 알려지고 있다.

보체계는 고등동물의 면역계 중 항체와 함께 외부의 비

자기물질을 신속히 제거하고 면역세포들을 자극하여 강력한 생체방어작용을 발휘하는 하는데 이를 위하여 보체계의 활성화과정이 수반되어야 한다.¹²⁾ 최근 보체계를 활성화 하는 물질(항보체 활성물질)들이 생체의 면역 부전상태를 개선 혹은 치료하는 면역요법제로 개발되어 질병의 예방과 치료에 효과적으로 사용될 수 있는 가능성이 제시되고 있으며,¹³⁾ 식용식물중의 보체계 활성화 물질들이 일본 Kitasato(北里) 연구소의 Yamada 그룹과 국내에서는 본 연구실을 중심으로 분리되어 왔으며 대부분 다당류로 밝혀져 주목을 받았다. 당귀(*Angelica acutiloba*)¹⁴⁾의 pectic arabinogalactan, 시호(*Bupleurum falcatum*)¹⁵⁾의 arabinan, arabinoglucan, glucan, 인삼(*Panax ginseng*)¹⁶⁾의 acidic heteroglucan과 고사리¹⁷⁾의 α-(1→2)-glucuronomannan backbone 등이 그 예라 하겠다. Okuda 등¹⁸⁾은 polysaccharide가 생체내의 보체계 (complement system)에 관여하여 macrophage의 활성화, target cell에 대한 cytolysis와 opsonization 기능을 향진시킴으로써 항종양 효과를 나타낸다고 하였으며, polysaccharide에 의한 보체계(complement system)의 활성화와 항종양 효과의 상관관계를 밝히기도 하였다.

본연구에서는 국내산 식용버섯 자실체 추출물들의 항보체 활성 검색에서 높은 항보체활성과 항종양활성을 나타낸 양송이 버섯에 대하여 활성 물질의 추출조건을 조사하였으며 주요 항보체활성 단백질다당획분을 분리하고 활성부위와 화학적 특성을 조사하였다.

찾는말 : 양송이, 항보체활성, 항종양활성, 단백질다당류

*연락처

재료 및 방법

실험재료

항보체활성 검색에 사용된 버섯사실체들은 서울 경동시장에서, 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)은 충남 부여소재의 농협에서 구입하여 동결건조 후 추출에 사용하였다.

버섯 추출물들의 제조

열수추출은 동결건조하여 마쇄한 버섯시료 5 g에 증류수 100 ml을 가하여 2시간 환류 추출하였고, 냉수추출은 시료 5 g에 증류수 100 ml을 가하여 4°C에서 24시간 교반하였으며, 알칼리추출은 시료 5 g에 0.1 N NaOH, 1 N NaOH, 또는 5% urea를 함유한 1 N NaOH용액 100 ml을 가하여 온도 및 시간 등을 달리하여 환류와 교반을 이용하여 추출하였으며, 추출 후 HCl 용액으로 중화하였다. 각 추출물을 원심분리(4500×g, 20분)하여 상등액을 투석, 농축, 동결건조하고 탈이온수에 용해하여 항보체 활성을 측정하였다. 양송이버섯의 유기용매추출도 시료와 용매를 동일비율로 하여 환류추출하고 감압건조하여 유기용매를 제거 한 후 동결건조하였으며, 5%의 DMSO에 용해하여 항보체 활성을 측정하였다.

항보체활성의 측정

시료에 의한 보체 소비(complement consumption)후 남은 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test¹⁸⁾로 측정하였다. 즉, 여러 농도(100, 500, 1000 µg/ml)의 시료를 탈이온수 또는 5% DMSO에 용해시킨 후 정상인의 혈청과 2% gelatin, 3 mM Ca²⁺, 10 mM Mg²⁺이 함유된 GVB²²⁾(gelatin veronal buffered saline, pH 7.4) 완충액을 각각 50 µl씩 혼합하여 37°C에서 20분간 1차 반응시키고 GVB²²⁾를 350 µl 가한 후 이를 10~160배로 연속 희석하였다. 여기에 다시 750 µl의 GVB²²⁾를 가한 다음 양의 감각 적혈구를 250 µl 가해 37°C에서 60분간 2차 반응시킨 후 PBS(phosphated buffered saline, pH 7.4) 2.5 ml을 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액을 2800 rpm에서 약 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액의 흡광도를 412 nm에서 측정하였다. 항보체 활성은 NHS와 buffer, 탈이온수만을 반응시킨 대조군의 총보체 용혈(50% total complement hemolysis, TCH₅₀%)에 대한 저지율(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH₅₀%)로서 나타내었다.

항종양활성 측정

Sarcoma-180 세포(10⁶ cells/0.1 ml)를 ICR계 mouse(우, 20 g 내외) 오른쪽 서혜부에 피하 이식하고 72시간후 부터 20 mg/kg 농도의 시료를 1일 1회씩 10일간 복강 투여하였다. 대조군은 시료액 대신에 saline을 사용하여 같은 방법으로 주사하여 대조군으로 하였다. 암세포 이식 4주째 되는 날 mouse를 치사시키고 고형암을 적출 하여 중량을 평량하였다. 증식 저지율은 생리 식염수를 투여한 대조군과 비교하여 고형암 증식 저지 백분율(percent inhibition ratio : I.

R,%)로 계산하였다.¹⁹⁾ 실험 결과는 mouse standard deviation로 나타내었고 one way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 통계 처리하여 P < 0.05 혹은 P < 0.01 수준에서 검정하였다.

양송이버섯 추출물의 고분자획분 분획

동결건조후 마쇄한 양송이버섯 650 g을 5% urea를 함유한 0.1 N NaOH 용액으로 65°C에서 2시간 추출하고 중화, 투석 후 얻은 AB-0(73.8 g)를 methanol 환류를 실시하였다. Methanol 가용 성분인 AB-M (10.07 g)을 제거한 methanol 비가용 획분 AB-1(61.35 g)을 acetone 농도에 따라 5개의 획분으로 침전분리하였다 (Fig. 1).

양송이버섯 단백질의 항보체활성 본체의 확인

양송이버섯 알칼리 추출물의 acetone 침전분획물 중에서 가장 높은 항보체 활성을 나타낸 단백다당획분 AB-20 (30 mg)을 10 mM CaCl₂가 함유된 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.9) 50 ml에 용해시킨 후 10 mg의 pronase를 가하여 37°C에서 48시간 동안 반응시켜 pronase 소화물을 얻었으며, AB-20(30 mg)획분을 50 mM acetate buffer(pH 4.5) 50 ml에 녹여 50 mM sodium periodate(NaIO₄)를 가하여 4°C 암소에서 3일간 반응시켜 periodate산화물을 조제하였다.²⁰⁾ 각각의 반응생성물을 대조군과 함께 항보체 활성을 조사하였다.

다당류의 구성당 분석

2 M trifluoroacetic acid(TFA)로 121°C에서 1.5시간동안 가수분해 한 시료를 TLC cellulose coated plastic sheet(Merck, 5577)에 점정한 후 ethylacetate : pyridine : water : acetic acid = 5 : 5 : 1 : 3을 전개 용매로 하여 전체 구성당을 확인 하였으며, 각 구성당의 정량분석은 alditol acetate 유도체로 전환²¹⁾시킨 후 GLC를 통하여 분석하였다. GLC의 분석은 3% OV-225 chromosorb WHP 100/120의 packed column이 장착된 Shimadzu GC-14A/FID/Shimadzu C-R6A chromatopac (column temp. 225°C, inject temp. 250°C, detect temp. 250°C)에서 실시하였다.

구성아미노산분석

단백다당류 2 mg을 6 N HCl 2 ml에 용해시킨 후 질소 가스로 충전하고 밀봉하여 105°C에서 24시간 가수분해시킨 후 HCl을 제거한 다음 부피를 2 ml로 조정하여 0.4 µm microfiltration filter paper로 여과하여 시료로 사용하였다. 시료 20 µl를 ortho-phthaldehyde(OPA)-mercaptoethanol reagent 40 µl, iodoacetic acid 40 µl와 혼합한 후 2분간 반응시켜 OPA 유도체로 전환 후 HPLC를 이용하여 구성아미노산을 분석하였다. HPLC 분석은 Gilson HPLC/Waters Nova-pak C₁₈ (4 µm particle size, 3.9×150 nm)/Fluorescence detector(E_x/E_m=338 nm/455 nm)을 이용하였다.

일반성분분석

총당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric

활성을 나타내는 경우가 많았으며 냉수추출물들은 비교적 낮은 활성을 나타내는 경향을 나타내었다. 식품재료로 이용되는 양송이와 팽이버섯은 알칼리 추출물에서 각각 92%와 88%의 높은 항보체활성을 나타내었으나 냉수추출물에서는 각각 60%와 50%의 항보체활성을 나타내었다. 약재로 사용되는 황지, 적지, 운지의 경우에도 냉수추출물의 경우 각각 17%, 56%, 33%로 낮은 활성을 보인 반면 알칼리 추출에서는 모두 70% 이상의 활성을 나타내었다. 이 결과에서 버섯 자실체들의 항보체활성 성분은 기존의 알려진 수종의 버섯 유래 다당류와 단백다당류들과 같이 냉수에는 추출되기 어려우면서 알칼리수에 추출이 용이한 물질들로서 특히 버섯 세포벽중의 고분자획분들일 것으로 추정되었다.

양송이 항보체활성 물질의 추출

가장 높은 항보체 활성을 나타낸 양송이버섯에 대하여 추출 용매별 항보체 활성과 총당함량, 수율을 검토하였다. 각 추출물의 항보체활성을 0.5 mg/ml의 농도에서 측정하여 ITCH₅₀(%)으로 표시하였을 때(Fig. 2) 수추출물에 비하여 유기용매 추출물들의 활성이 낮아 대부분 30% 이하의 활성을 나타내었고 그 중 acetone 추출물이 가장 낮은 13%의 ITCH₅₀ 값을 보였다. 수추출물들에서는 일반적으로 활성이 높았으며, 0.1 N NaOH를 이용한 알칼리수 추출물에서 78%의 가장 높은 항보체활성을 보였다. 따라서 양송이 항보체활성 물질은 저분자 소수성 물질이 아닌 주로 수용성 고분자물질들로 추정되었으며 이것은 현재까지 보고된 버섯 기원의 면역 활성 물질이 주로 고분자 중성다당 및 단백다당들인 사실과⁵⁻⁹⁾ 일치하였다. 추출물들의 추출수율과 총당함량을 비교해보면 냉수 < 열수 < 알칼리 추출물의 순서로 나타나 양송이 버섯 중의 항보체활성 물질의 분리

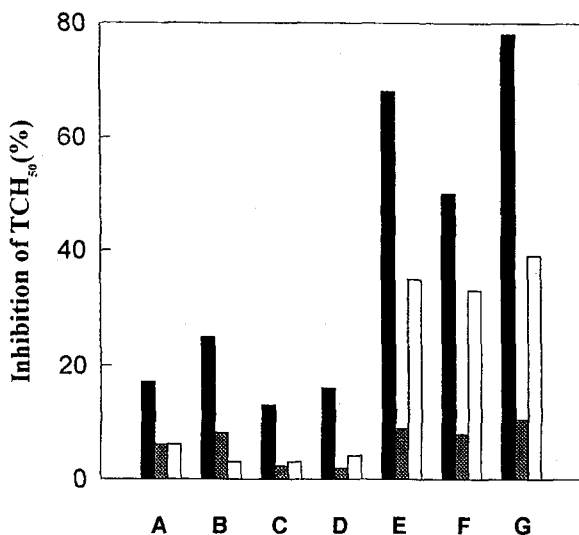


Fig. 2. Comparison of ITCH₅₀, yields and total sugar in the water and organic solvent extracts from *Agaricus bisporus*. A: EtOH, B: MeOH, C: Acetone, D: Hexane, E: Hot water, F: Cold water, G: 0.1 N NaOH, ■: ITCH₅₀(%), ▨: Yield(%), □: Total sugar(%). The concentration of each extract for anti-complementary activity was 0.5 mg/ml.

Table 2. Anti-complementary activity and chemical composition of alkali extracts obtained from fruit body of *Agaricus bisporus*

	Temp. (°C)	Time (hr)	ITCH ₅₀	Yield	Total Uronic	Protein	
			(%)	(%)	sugar	acid	(%)
0.1 N NaOH	97	2	92	10.41	39	2.8	43
	97	4	92	12.91	30	2.5	45
	97	6	90	9.85	25	1.8	50
	97	8	70	7.48	23	2.2	58
1 N NaOH	65	2	92	7.59	47	3.2	39
	4	24	85	11.87	39	3.2	50
0.1 N NaOH + 5% urea	97	2	91	6.51	23	4.0	58
	65	2	95	11.75	50	4.2	38
	4	24	84	7.94	37	3.0	40
	97	2	74	4.62	29	2.6	52

*ITCH₅₀(%): Inhibition of 50% total complement hemolysis
The concentration of each extract was 1,000 µg/ml

는 알칼리 추출을 이용하는 것이 보다 효과적이라고 판단되었다.

Table 2는 양송이의 알칼리 추출조건을 최적화하기 위하여 NaOH 농도, 추출온도, 추출시간, urea 첨가효과 등을 변화시켜 활성, 추출수율, 당, 단백질 함량 등을 조사한 결과이다. 0.1 N NaOH를 이용하여 97°C에서 추출하였을 때 2시간에서 6시간 사이에는 항보체활성이 90% 이상으로 높게 유지되었으며 4시간 추출시 가장 높은 추출 수율(12.91%)을 보였다. 그러나 8시간 추출시에는 70%로 항보체활성이 다소 감소되었고 추출수율도 뚜렷이 감소하였다(7.48%). 1 N NaOH를 이용하여 65°C와 97°C에서 각각 2시간 추출시 항보체활성은 92%, 91%로 비슷하였으나 추출수율은 상당히 감소되어 97°C 추출시 6.51%를 나타내었다. 4°C에서 24시간 추출의 경우, 추출수율은 0.1 N NaOH 추출시와 비슷하였고 활성은 85%로 약간 낮아졌다. 따라서 저온(4°C)추출은 효율적이지 못하였으며 대체적으로 알칼리의 농도가 높고, 추출시간이 길수록 활성물질이 어느정도 자가분해되는 것으로 사료되었다. 버섯류에 존재하는 다당류 및 단백다당류들은 일반적으로 세포벽 성분들이거나 단단하게 세포벽에 결합되어 있는 형태로서 알칼리 추출이 유리하고 추출제에 urea를 첨가할 때 활성성분의 효과적인 분리가 가능했다는 보고²⁹⁾에 따라 0.1 N NaOH에 5%의 urea를 첨가하여 65°C에서 2시간 추출한 경우가 가장 높은 항보체활성(95%)을 나타내었으며 추출수율도 11.75%로 비교적 높았다. 4°C에서는 뚜렷한 urea 첨가효과를 관찰할 수 없었고 97°C의 경우는 활성과 수율이 급격히 감소하였다(Table 2). 추출물중의 산성당 함량은 2~4%로서 큰 변화가 없었고 총 당의 경우 23~53%의 범위로 항보체 활성이 높은 획분에서 비교적 많이 함유되었으며 단백질은 40~58%의 범위에서 총당과는 상반되게 함유되어 있었다.

양송이 항보체활성 획분의 특성

건조된 양송이버섯 650 g을 5% urea를 함유한 0.1 N

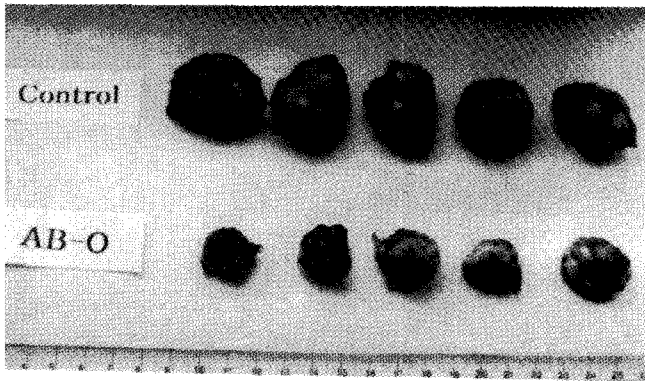


Fig. 3. Anti-tumor effect of *Agaricus bisporus* polysaccharide. Control : Saline administration group, AB-O : The crude polysaccharide fraction of *Agaricus bisporus*. Sarcoma-180 ascites cells (1×10^6 cells) were transplanted subcutaneously into the groin of ICR mice. After 72hr. transplantation, the sample was injected intraperitoneally at 20 mg/kg daily for 10 days. The mouse was sacrificed and the tumors was excised, after 28 day.

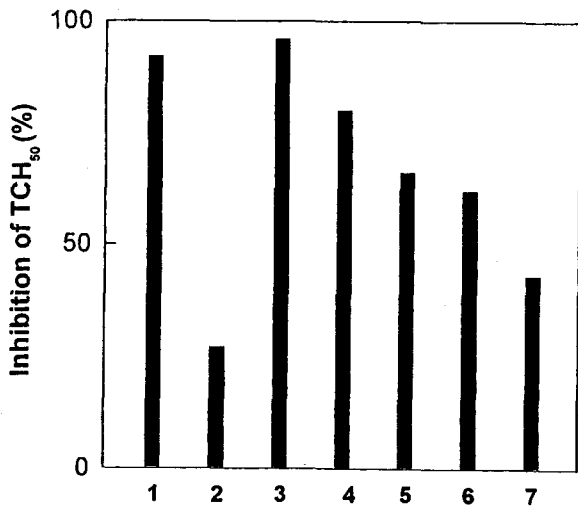


Fig. 4. Anti-complementary activity of several isolates from *Agaricus bisporus*. 1) AB-O : Alkali extracts of *Agaricus bisporus*, 2) AB-M : Methanol soluble Fr., 3) AB-20 : 20% Acetone precipitate Fr., 4) AB-40 : 40% Acetone precipitate Fr., 5) AB-60 : 60% Acetone precipitate Fr., 6) AB-80 : 80% Acetone precipitate Fr., 7) AB-A : Acetone soluble Fr. The concentration of each extracts was 1 mg/ml.

NaOH 용액으로 65°C에서 2시간 환류 추출하고 중화, 투석하여 고분자획분 AB-O(73.80 g)를 얻었다. 1 mg/ml의 농도에서 90% 이상의 높은 항보체활성을 나타내는 AB-O는 종양세포가 이식된 마우스에 10 mg/ml/kg 농도로 투여되었을 때 마우스 sarcoma-180에 대하여 약 74%의 종양저지효과를 나타내어(Fig. 3) 양송이 항보체활성 물질이 항종양활성을 나타낼 가능성이 크다고 판단되었다. AB-O 획분을 methanol 환류하여 methanol 가용성분을 제거하고 그 잔사를 Fig. 1의 방법에 따라 아세톤 분획한 후 각 획분의 항보체활성(Fig. 4)을 조사하였다. 5개의 아세톤 침전분획물중 40%의 아세톤에서 침전된 AB-20 획분이 AB-O 획분보다 증가되어 1 mg/ml의 농도에서 97%로 가장 높았으며 AB-

Table 3. Chemical composition and yield of alkali extract and acetone precipitates from *Agaricus bisporus*

	AB-0 ¹⁾	AB-20 ²⁾	AB-40 ²⁾	AB-60 ²⁾	AB-80 ²⁾	AB-A ²⁾
						(%)
Yield	11.35	42.3	20.4	11.5	8.1	4.4
Total sugar	49.0	39.0	51.0	37.0	16.0	6.0
Uronic acid	5.0	5.0	6.0	4.5	3.5	3.5
Protein	39.0	46.0	21.0	43.0	61.0	83.0

¹⁾From the freeze-dried fruit bodies of *Agaricus bisporus*

²⁾From the fraction AB-0

Table 4. Sugar composition of alkali extract and acetone precipitates from *Agaricus bisporus*

	AB-0	AB-20	AB-40	AB-60	AB-80
					(molar ratio)
Fucose	0.23	0.74	<0.10	1.75	<0.10
Arabinose	0.52	0.58	trace	1.00	0.47
Xylose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mannose	0.71	1.24	0.40	0.71	1.45
Galactose	1.08	0.53	3.80	1.47	2.47
Glucose	9.72	6.49	7.20	17.44	5.17

40(83%) > AB-60(72%) > AB-80(68%) > AB-A(23%) 순이었으며 추출물의 메탄올 가용획분(AB-M)에서는 가장 낮은 활성(41%)을 나타내었다. 각 획분들의 화학적 조성도와 수율을 비교한 결과(Table 3) 총당 함량은 AB-40(51%), AB-20(39%), AB-60(17%), AB-80(16%), AB-A(6%)의 순서로 함유되었으며 산성당 함량은 모두 5% 내외로 비교적 적어서 활성에 산성당부위가 크게 관여하지 않는 것으로 추정되었다. 활성이 가장 높은 AB-20 획분에서 AB-O에 비하여 총당은 감소되고 단백질이 46%로 증가되는 결과에서 알칼리 추출시(Table 2)의 활성과 다당, 단백질 함량과의 상관성은 뚜렷하지 않은 것으로 확인되었다.

AB-O의 아세톤 분획물들과 AB-O의 구성당을 분석한 Table 4의 결과에서 deoxysugar인 fucose, 오탄당인 arabinose, xylose, 육탄당인 mannose, galactose, glucose들이 관찰되었다. 모든 획분에서 glucose가 가장 많이 함유되어 있어서 β-glucan의 존재 가능성이 시사되었고 활성이 높은 AB-20 획분은 glucose, arabinose, mannose, xylose, fucose들이 6.49:1.98:1.24:1.00:0.71의 비율로 구성되어 있었다. 또한 각 획분중 단백질의 구성 아미노산을 분석한 결과는 Table 5와 같다. 주요 활성획분 AB-20은 타 획분과 마찬가지로 alanine(20.59%), isoleucine(16.85%), glutamine, glutamic acid(14.12%)과 leucine(13.83%)과 10여종의 아미노산을 함유하고 있었다. 그리고 염기성 아미노산인 lysine의 함량은 타획분에 비해 높았으나(0.29%) 방향족 아미노산인 phenylalanine은 타 획분에 비해 상대적으로 적은 경향(2.35%)을 보였다. 그러나 현재까지 아미노산 조성이 항보체활성에 결정적인 영향을 미친다는 보고는 없으며 항종양성 단백당류인 구름버섯 PSK⁶⁷⁾와 영지버섯에서 분리한 항종양성 단백당류⁶⁸⁾의 아미노산 조성과도 뚜렷한 공통점은 찾아볼 수 없었다.

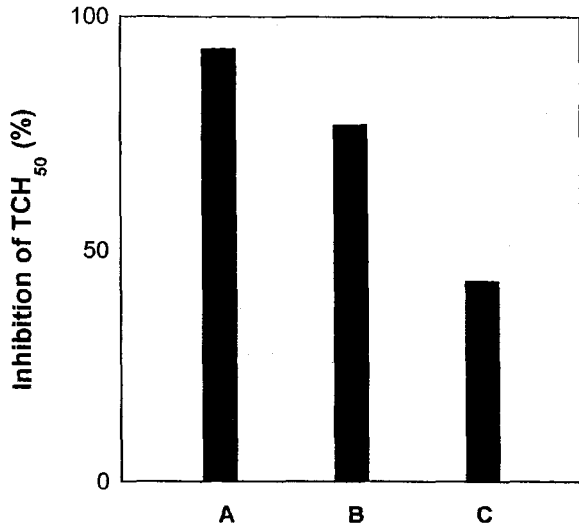


Fig. 5. Anti-complementary activity of AB-20 by pronase or periodate treatment. A : Native AB-20, B : Pronase digested AB-20, C : Periodate oxidized AB-20.

보체계 활성화 본체

항보체 활성이 가장 높은 AB-20 획분은 39%의 당과 46%의 단백질로 구성된 고분자 단백다당획분으로 추정되므로 AB-20의 보체계 활성화 본체를 파악하기 위하여 AB-20을 pronase 처리에 의한 단백질 분해 및 periodate를 이용한 다당부위를 선택적으로 산화시킨 후, 각각의 활성을 대조군인 AB-20과 함께 조사하였다(Fig. 5). Pronase 처리한 AB-20에서는 약 15%의 활성이 감소하였으며 AB-20의 periodate 산화물에서는 활성이 50% 정도 크게 감소되었다. 따라서 양송이버섯 알칼리추출물로부터 분리한 항보체 활성을 나타내는 단백다당획분 AB-20에서 활성의 주요 본체는 다당이나 단백질도 일부 관여하는 것으로 판단되었다. 이것은 고등식물의 보체계 활성화 다당류들이 주로 단백질이 결합되지 않은 순수다당류들인 것¹⁴⁻¹⁷⁾과는 다른 결과를 보였으므로 AB-20으로부터 순수 단백다당류를 정제하여 구조분석을 통한 메카니즘 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 박사후 연수과정 연수비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Yang, H. C., C. H. Song and M. H. Kweon (1996) Mycelial new material, Food functional technology. 187-189, Han-Lim Press, Seoul, Korea.
2. Jung, K. H., W. B. Park, H. W. Kim, O. C. Choi and B. K. Kim (1992) Studies on anti-tumor components from *Ganoderma lucidum*, *Kor. J. Mycol.*, **20**, 324-336.
3. Kim, B. K., J. Y. Kwun, Y. I. Park and E. C. Choi (1992) Anti-tumor components of the cultured mycelia of *Calvatia*

- craniformis*. *J. Kor. Cancer Assoc.* **24**, 57-63.
4. Kim, S. H., H. W. Kim, O. C. Choi and B. K. Kim (1993) Immunological studies on Colluban isolated from *Collubia confluens*, *J. Kor. Cancer Assoc.*, **25**, 288-298
5. Goro C., H. Junji, Y. Yukiko, A. Yoshiko and F. Fumoko (1970) Fractionation and purification of the polysaccharides with masked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*(Berk.) Sing.(an edible mushroom). *Cancer research* **30**, 2776-2781.
6. Hiroshi F., O. Katsui, I. Masanori, M., M. Mikio, N. Shinji, S. Michie, T. Masanori, C. Yoshikumi and K. Yoshio (1988) Effect of PSK, A protein bound polysaccharide from *Coriolus versicolor*, on drug-metabolizing enzyme in sarcoma-180 bearing and normal mice. *Int. J. Immunopharmac.* **10**, 445-451.
7. Youlchi M. and Y. Osamu (1991) Activation by protein bound polysaccharide PSK (Krestin) cytotoxic lymphocytes that act on fresh autologous tumor cells and T24 human urinary bladder transitional carcinoma celline in patients with urinary bladder cancer. *The Journal of urology* **145**, 1082-1088.
8. Tsukagoshi, S. O. (1974) Protein bound polysaccharide preparation, PSK, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma by oral use. *Gann* **65**, 557-562.
9. Hirose, K., M. J. Hakozaiki, K. Kaduchi and N. Yamamoto (1987) A biological response modifier, PSK, inhibits reverse transcriptase *in vitro*. *Biochem Biophysic. Res. Commun.* **149**, 562-588.
10. Okuda, T., Y. Ikekawa, G. Chihara and K. Nishioka (1972) Anti-complementary activity of anti-tumor polysaccharides *Nature. New. Biol.* **238**, 59-64.
11. Low, S. K. A. and K. B. M. Reid (1988) Complement. In complement. IRL Press, Oxford. p. 1.
12. Schumaker, V. N., P. Zavodsky and P. Poon (1987) Activation of the first component of complement. *Annu. Rev. Immunol.* **5**, 21-28.
13. Kweon, M. H. and H. C. Sung (1997) Immuno-modulatory function by anti-complementary polysacchrides, *Food and Industry(Kor.)* **30**, 30-43
14. Yamada, H., H. Kiyohar, J. C. Cyong and Y. Otsuka (1985) Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*-IV Characterization of an anti-complementary arabinogalactar from the roots of *Angelica acutiloba* KITAGWA. *Molecular Immunology* **22**, 295-302.
15. Yamada, H., K. S. Ra, H. Kiyohara, J. C. Cyong, H. C. Yang and Y. Otsuka (1988) Characterization of anti-complementary neutral polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum*. *Phytochemistry* **27**, 3163-3168.
16. Gao, Q. P., H. Kiyohara, Cyong, J. C. and Yamada, H. (1991) Chemical properties and anti-complementary activities of heteroglycans from the leaves of *Panax ginseng* C.A. METER. *Planta Med.* **57**, 132-137.
17. Kweon, M. H., H. I. Kim, H. C. Sung and H. C. Yang (1994) Core structure of the anti-complementary acidic polysaccharide (PA-IIa-1) from water extract of *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. *Foods and Biotechnology* **3**, 137-143.
18. Kabat, E. A. and M. M. Mayer (1964) Complement and com-

- plement fixation, In *Experimental Immunology*, Charles Thomas Publisher, Illinois, p. 133.
19. Hirase, S. (1976) Structural studies on the anti-tumor active polysaccharide from *Coriilus versicolor*(Basidiomycetes) II. Structures of β -D-glucan moieties of fractionated polysaccharides. *Yakugaku-zasshi* **96**, 419-425.
 20. Gao, Q. P., H. Kiyohara, J. C. Cyong and H. Yamada (1989) Chemical properties and anti-complementary activities of polysaccharides fractions from roots and leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Planta Med.* **55**, 9-16.
 21. Kweon, M. H., H. C. Sung and H. C. Yang (1994) Acidic heteroglycans with anti-complementary activity from the water extract of *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. *Foods and Biotechnology* **3**, 83-89.
 22. Dubios, M. K. A., T. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Sonisth (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-355.
 23. Blumenkronz, N. and G. Asboe-Hansen (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **54**, 484-489.
 24. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, L. Farr and R. J. Rindall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-260.
 25. Yamada, H., T. Nagai, J. C. Cyong and Y. Otsuka (1991) Mode of complement activation by acidic heteroglycans from the leaves of *Artemisia princeps* PAMP. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 2077-2082.

Studies on Bioactive Polysaccharide Isolated from *Agaricus bisporus*

Mee-Hyang Kweon*, En-Jung Lim¹ and Ha-Chin Sung¹ (**Institute of Biotechnology, Korea University 136-701*, ¹*Graduate School of Biotechnology, Korea University 136-701*)

Abstract : During the screening for anti-complementary activity from 10 kinds of edible mushrooms, an alkali extract of *Agaricus bisporus* showed the highest activity through the complement fixation test. The crude anti-complementary material(AB-0) from *Agaricus bisporus* was obtained by the alkali extraction using 1 N NaOH containing 5% urea(65°C), followed by methanol reflux, dialysis and lyophilization. The fraction AB-O showed potent anti-complementary and anti-tumor activity against sarcoma-180 injected mice. The fraction AB-O was divided into 5 fractions(AB-20, AB-40, AB-60, AB-80, AB-A) by gradual acetone precipitation. Among them fraction AB-20 having the highest activity and yield was found to contain 39% carbohydrate and 46% protein. The anti-complementary protein-bound polysaccharide AB-20 consisted of glucose, arabinose, xylose, galactose and mannose in a molar ratio of 6.49 : 1.98 : 1.24 : 1.00 : 0.71, respectively and its main component amino acids were alanine(20.59%), isoleucine(16.85%), glutamine+glutamic acid(14.12%) and leucine (13.83%). The anti-complementary activity of AB-20 was decreased greatly by periodate oxidation, but decreased slightly by pronase digestion. This indicates that polysaccharide moiety is correlated with the anti-complementary activity and that protein is also involved in the activity.

Key words : *Agaricus bisporus*, anti-complementary, anti-tumor, polysaccharide

*Corresponding author