

버섯균사체 배양액에 함유된 Glucan의 정량 및 항생제 내성억제 효과

김정희·나승영·오서진·정승일·주영승¹·정영두²·김홍준³

¹ 우석대학교 한의과대학 본초학교실

² 신농생명공학

³ 한국한의학연구원

Determination of Glucan from *Mycellium* and Its Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*

Jeong-Hi Kim · Seung-Young Na · Seo-Jin Oh · Seung-Il Jeong
Young-Sung Ju¹ · Young-Doo Jung² · Hong-Jun Kim³

Objectives : This experimental study was performed to investigate the contents of glucan from *mycellium* and its activity against methicillin-resistant *Staphylococcus*(MRSA).

Methods : A gel permeation chromatography method was developed for the determination and isolation of glucan in *mycellium*. Their structures were elucidated using ¹H-NMR, ¹³C-NMR. Also, The antibacterial activity of the glucan against MRSA was estimated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC).

Results : The contents of glucan in *mycellium* was 766±0.19 mg/g. Glucan exhibited activity against MRSA, with an MIC values of 4 to 9 mg/mL.

Conclusions : These findings suggested that glucan might be useful in controlling MRSA infections.

Key words : glucan, *mycellium*, methicillin-resistant

緒 論

생활수준의 향상과 더불어 건강한 삶을 누리기

위한 노력이 증가하면서 질병의 치료뿐만 아니라 약해진 체력의 회복을 위해서 건강식품을 통해 건강을 유지하려는 경향이 많아지고 있다. 최근에 β -1,3/1,6-glucan이 항암, 항콜레스테롤, 항산화, 면역증강 및 피부재생 효과 등 생리활성 증진효과가 밝혀지고 있어서 건강식품소재 및 식품첨가물로 이

교신저자: 김정희, 전북 완주군 삼례읍 우석대학교 한의과대학 본초학교실

(Tel : 063-290-1561, E mail : du0029@hanmail.net)

• 접수 2006/10/31 • 수정 2006/11/17 • 채택 2006/12/07

용이 증가되고 있다. 또한 인간의 정상적인 세포 조직의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 방지하고 면역세포의 기능을 활발하게 하는 인터페론과 인터루킨의 생성을 촉진시켜 간접적으로 암세포의 증식을 억제할 수 있다고 보고되었다^{1,3)}.

β -Glucan은 크게 식물성 유래, 효모 및 곰팡이 유래 그리고 버섯 유래의 것으로 포도당이 β -1,3 화학 결합을 중심으로 중합된 다당류를 총칭하며 버섯, 효모 등 미생물의 세포벽의 구성성분으로 세포외로 분비되는 미생물의 β -glucan과 보리, 귀리와 같은 맥아류의 식이 섬유에서 추출되는 식물성 β -glucan이 있다. 이처럼 밝혀진 결과로부터 β -glucan은 버섯, 보리, 귀리 및 효모에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다³⁾.

최근에는 β -1,3/1,6-glucan을 생산 방법을 특정 버섯에서 추출하여 정제하거나 효모의 세포벽에서 분리하여 정제하고 있으나 낮은 함량의 유효 성분 및 정제의 난이도 등의 이유로 가격이 상당히 고가이다. 또한 서 등⁴⁾은 *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023에 자외선을 처리하여 변이주를 얻은 후 변이주들을 배양하여 배양액 중에 생산한 고분자 중합체를 생산하는 방법을 발표하였다.

일본의 한 회사는 β -1,3/1,6-glucan을 생산하는 흑효모를 개발하여 비교적 싼 가격에 대량 생산하고 있으며, 기능성 음료의 첨가제 등으로 사용하고 있다^{4,5)}.

본 연구에서도 버섯균사체배양액으로부터 분리 정제한 고분자 중합체를 화학적으로 처리하여 크로마토그래피 (Gel permeation chromatography)로 정량분석을 하였고, 핵자기공명(NMR) 분석기를 사용하여 화학구조를 확인하였으며 정성분석을 하였다. 또한 버섯균사체에서 분리된 β -glucan로 항생제 내성균주에 대한 억제 효과가 조사하였기에 보고하고자 한다.

材料 및 方法

1. 재료 및 β -glucan의 추출조건

버섯균사체로 배양한 시료에서 수용성 β -glucan을 분리 및 정량하기 위하여 사용한 균사체 시료는 신농 (SHIN NONG)으로부터 공급받아 사용하였다. 버섯균사체로 배양한 시료로부터 수용성 β -glucan의 추출 조건은 강⁶⁾ 정 등⁷⁾를 참고하였으며, 본 연구에서도 수용성 β -glucan 추출 조건에서 가장 중요한 3가지 요인인 추출온도, 추출액의 농도(C_2H_5OH) 및 산도(pH)를 각각의 독립변수로 하여 추출하여 최적조건을 찾았다. 이때 균사체 50g을 pH 5에서 에탄올 600mL을 가하고 1시간 동안 환류추출 한 다음, 원심 분리하여 상등액을 회수하고, 회수액의 1.5배(v/v) 용량의 95%의 에탄올을 가하여 교반한 후 4℃에서 하루 동안 방치하였다. 그 후 침전물을 회수하여 95%에탄올로 2회 반복하여 세척하고 난 다음, 동결 건조하여 균사체로부터 수용성 β -glucan을 얻어 정량, 정성 및 임상실험용 시료로 사용하였다.

2. 핵자기공명 분석

버섯균사체로 배양한 시료로부터 분리·정제한 고분자중합체를 15mg을 NMR 측정용 DMSO-d₆에 용해시켜 핵자기공명 스펙트럼은 Bruker DRX-500MHz spectrometer(Germany)로 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 스펙트럼을 통해 분석하였다.

3. 버섯균사체로 배양한 시료에 함유된 β -glucan의 정량

버섯균사체로 배양한 시료에 β -glucan의 함량을 정량하기 위하여 gel permeation chromatography (Shimadzu, VP seies, Japan)를 사용하였으며, 시료는 1.0g을 정확히 달아서 위의 방법 처럼을 추출하여 0.45 μ m membrain filter로 여과한 후 1mL로 정확히 만든 후 이중에 100 μ L를 inject하여 분석하였다. 이동

Table 1. Correlation of carriage of the *mecA* gene and MICs of the ampicillin and methicilline against 12 MRSA, standard MSSA and MRSA strains,

Strains	<i>mecA</i>	MIC($\mu\text{g/mL}$)	
		Ampicillin	Methicillin
<i>S. aureus</i> ATCC25923	-	0,125	0,031
<i>S. aureus</i> ATCC33591	+	32	8
78	+	256	128
M11	+	256	256
21-8	+	256	64
6-2	+	256	128
7-3	+	256	64
8-4	+	256	256
9-5	+	256	64
13-7	+	128	64
27-9	+	128	32
47-10	+	512	16
105-13	+	256	64
106-14	+	128	64

상은 HPLC용 증류수를 사용하였으며, 유속은 0.8 mL/min으로 조절하였다. Refractive index detector (Shimadzu, VP seies, Japan)시료를 Gel permeation chromatography (Shimadzu, VP seies, Japan)을 사용하였다.

4. 사용균주

본 연구에 사용한 공시균주로는 원광대학교 병원에서 분리하고 동대학교 치과대학 구강미생물학 교실에 보관중인(6) 12주 (Table. 1)의 methicilline -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)와 표준균주로는 methicilline -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33591, methicilline -susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) ATCC 25923을 사용하였다.

5. 항균효과

병원성 감염균 중의 methicilline 내성 황색포도상구

균을 Tryptic soy broth(Difeo, USA)배지에 접종을 하고 incubator에서 37 $^{\circ}\text{C}$, 24시간 배양하였다. 이때 균의 농도가 1×10^8 CFU/mL되게 같은 배지로 희석하였다. 그리고 시료를 DMSO에 녹인 후 2배씩 희석 well에 첨가하여 주사전자현미경으로 세포의 손상여부를 확인하였다. 이때 최소억제농도를 결정하였다.

결과 및 고찰

1. 핵자기공명에 의한 정성분석

버섯균사체 배양액으로부터 분리·정제한 고분자 중합체의 화학구조를 확인하기 위하여 핵자기공명분석 분석스펙트럼의 Figure 1에 나타내었다. 그림1의 $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO- d_6)에서 δ 4.567, δ 4.346, δ 4.323 및 δ 5.250에서 β -1,3-glucan의 결합과 관련된 특이한 수소의 화학적 이동이 나타난 것을 알 수 있었다. 또한 δ 4.567, δ 4.346, δ 4.323 및 δ

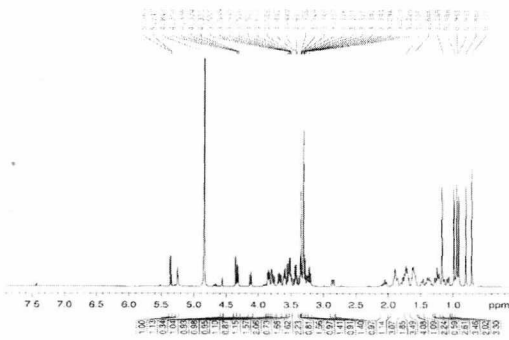


Fig. 1. NMR spectra of β -glucan produce by *mycelium*.

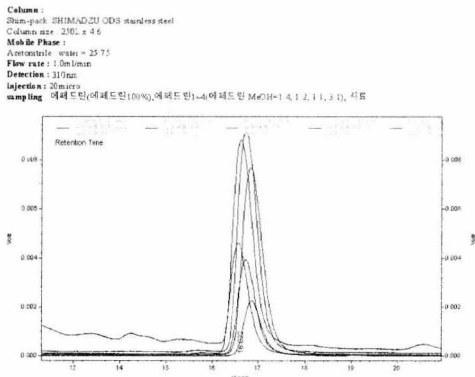


Fig. 2. Gel permeation chromatography of β -glucan produce by *mycelium*.

5.250에서 β -1,6-glucan 결합과 관련된 수소의 결합이 관찰되었다. 이러한 결과를 종합해 볼때 β -1,3- 및 β -1, 6-glucan 결합이 서로 혼합어 있는 가지형태의 β -글루칸(β -1,3/ β -1,6글루칸)으로 판단된다.

2. 버섯균사체로 배양한 시료에 함유된 β -glucan의 정량

버섯균사체로 배양한 시료에 β -glucan의 함량을 정량한 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다.

Figure 2에서 주 peak 의 retention time이 분으로 *mycelium*에서 분리하여 이화학 장비를 통하여 얻은 화합물의 표준품과 동일한 위치에서 나타났으며, 또한 이들을 정량하기 위하여 표준품 첨가방법으로 얻은 결과는 20mg/kg이다. 이때의 추출된 시료를 여러 번 측정 결과한 평균치는 38 ± 0.19 mg/kg 이었다.

3. 항균효과

병원성 감염균 중인 methicine 내성 황색포도상구균(MRSA)을 Tryptic soy broth(Difeo, USA)배지에 접종을 하고 incubator에서 37°C, 24시간 배양하였다. 이때 균의 농도가 1×10^8 CFU/mL되게 같은 배지로 희석하였다. 그리고 시료를 DMSO에 녹인 후 2배씩

Table 2. Antibacterial effects of glucan against clinical isolates of 12 MRSA standard MSSA and MRSA strains.

Strains	Class	MIC(mg/mL)	
		<i>mycelium</i>	β -glucan
<i>S. aureus</i> ATCC25923	MSSA	4	4
<i>S. aureus</i> ATCC33591	MRSA	4	4
78	MRSA	9	9
M11	MRSA	18	9
21-8	MRSA	18	9
6-2	MRSA	18	9
7-3	MRSA	18	9
8-4	MRSA	18	9
9-5	MRSA	18	9
13-7	MRSA	36	9
27-9	MRSA	18	9
47-10	MRSA	36	9
105-13	MRSA	18	9
106-14	MRSA	18	9

회석 well에 첨가하여 주사전자현미경으로 세포의 손상여부를 확인하였다. 이때 최소억제농도를 결정한 결과는 table 2와 같다. 이때 *mycellium*와 β -glucan의 표준균주 MSSA인 *S. aureus* ATCC25923와 MRSA인 *S. aureus* ATCC33591의 항균효과인 MIC는 모두 4 mg/mL으로 나타났으며, 병원내원환자로부터 분리한 12균주인 MRSA의 MIC는 모두 18과 9mg/mL으로 나타났다. 이상의 결과로부터 기존의 항생제들과 combinationgy하여 시너지 효과등에 대한 정밀 연구가 필요하다고 사료된다.

요 약

항암, 항콜레스테롤, 항산화 및 면역증가 효과와 피부재생 효과 등 여러 가지 생리활성이 밝혀지고 있는 β -1,3/1,6-glucan은 크게 식물성 유래, 효모 및 곰팡이, 버섯유래의 것으로 등으로 분류할 수 있다⁽⁷⁾. 본 연구에서는 이 처럼 다양한 효능을 나타내는 버섯균 사체로부터 β -glucan를 다량함유하고 보다 쉽게, 대량으로 생산하기 위한 일환으로 연구를 하였다. 이때 고분자 중합체인 β -glucan을 분리하여 핵자기 공명분석기로 분석한 결과 β -1,3- 및 β -1,6-결합이 혼재되어 있는 β -1,3/ β -1,6-glucan의 전형적인 구조임을 확인할 수 있었다. 또한 β -1,3/ β -1,6-glucan의 함량을 gel permeation chromatography으로 분석한 결과 766 ± 0.19 mg/g 함유되었음을 확인할 수 있었다. 또한 항생제 내성균주인 MRSA의 항균효과를 측정 결과 MIC가 18mg/mL임을 확인할 수 있었다. 이 연구결과는 통하여 효과적인 생산방법과 효능을 접목시켜 보다 저렴한 생산비로 대량 생산할 수 있는 방법을 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Sandula J., G. Kogan M., Kacurakova and

E. Machova, Microbial (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, their preparation physico-chemical characterization and immunomodulatory activity, Carbohydr. Polymers, 1999;38:247-53.

2. Ohno N., T. Miura, N. N. Miura, Y. Adachi, and T. Yadomae, Structure and biological activities of hypochlorite oxidized zymosan, Carbohydr. Polymers, 2001;44:339-49.

3. Ukawa, Y., H. Ito, and M. Hisamatsu, Antitumor effects of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan and (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimeji(Lyophyllum decastes Sing.), J. Biosci, Bioeng. 2000; 90:98-104.

4. Navarini, L., J. Bella, A. Flaibani, R. Gilli, and V. Rizza, Structural characterization and solution properties of an acidic branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan from *Aureobasidium pulluans*, Int, J. Biol. Macromol, 1996;19:157-63.

5. Seo H. P., Kim J. M., Shin H. D., Kim T. K., Chang H. J., Park B. R. and Lee J. W. Production of β -1,3/1,6-glucan by *Aureobasidium pulluans* SM-2001. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 2002;17:376-80.

6. Jeong, S.I., Han, W.S., Yun, Y.H., Kim, K.J., Continentalic acid from *Aralia continentalis* shows activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Phytotherapy Research, 2006;20:511-4.

7. Kang T. S., Lee M. Y., Baek S. H., Jeong H. S., Park H. J., Kong Y. J., Jung I. S. Effect of oat soluble β -glucan on glucose dialysis retardation and blood glucose in diabetic rats, Food Engineering Progress, 2005;9:88-96.