

차가버섯 균사체로부터 단백다당체의 추출 공정 확립

박남규, 전계택¹, 정용섭*

Development of Extraction Process of Protein-bound Polysaccharides from *Inonotus obliquus* Mycelia

Nam-Kyu Park, Gie-Taek Chun¹, and Yong Seob Jeong*

접수: 2010년 11월 26일 / 게재승인: 2012년 6월 20일
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: *Inonotus obliquus* mushroom, which is a fungus belonging to *Hymenochaetaceae* family, is known to grow on birth trees in colder northern climates and to be a fungal parasite that draws nutrients out of living trees rather than from the ground. For the separation of protein-bound polysaccharide (PBP) from the culture broth and mycelium of *Inonotus obliquus*, three well known extraction methods namely hot water, ultrasound and microwave were used. The best extraction conditions to separate the PBP (64.94 mg/g) from mycelium by microwave were found to be for 1 hour and 150°C. The possibility for concentration of extracted PBP solution by using membrane was also studied. The extracted PBP solution was concentrated effectively by using an ultrafiltration membrane and the molecular weight cut off (MWCO) is 30 KDa. It was observed that a concentration by the ultrafiltration membrane is essential not only for the development of clean separation technology but also for enhanced production of PBP. As a result, we have shown that PBP in the final concentrated solution showed approximately 10 times higher than that in the crude solution by application of the developed separation systems. The separation yield of PBP was about 89.79% by gel filtration of purification steps

and the purified product was confirmed to be PBP by using FT-IR.

Keywords: *Inonotus obliquus*, protein-bound polysaccharide, extraction, ultrafiltration, FT-IR

1. 서론

고등균류인 버섯은 오래전부터 맛과 영양이 풍부하여 식품으로 애용되어 왔을 뿐 아니라 약용 등의 목적으로도 널리 이용되어 왔다. 특히 질병의 치료와 예방에 효과가 있는 천연물 중 가장 주목받고 있는 담자균류 (*Basidiomycetes*) 버섯은 이들의 광범위한 약리작용으로 인해 한방의학에서도 널리 활용되고 있다. 최근 담자균류 유래 약용버섯들의 항암 효과가 과학적으로 입증되고 있으며, 이 중에서도 특히 대표적인 담자균류에 속하는 차가버섯 유래의 단백다당체는 면역증강 효과와 함께 인슐린 분비 촉진작용에 의한 혈당강하 효능이 탁월한 것으로 밝혀져 당뇨개선 효과를 갖는 새로운 생리활성물질로 주목을 받고 있다 [1].

학명이 *Inonotus obliquus* 혹은 *Fuscoporia obliquus* 두 가지로 불리는 차가 (Chaga, Tchaga) 버섯은 백색부후균의 일종이다. 그리고 자연 상태에서 성장하면 검은색의 균핵 덩어리가 되어 자작나무 등의 줄기를 가해하게 된다. 옛날부터 민간의학에서는 차가버섯을 악성 종양과 위장 질환 (위궤양, 위염 등) 치료제 및 강장제와 원기회복제로 사용하여 왔다. 특히 러시아의 일부지역에서는 일반 차를 대신해 차가버섯을 우려낸 물을 음용하여 암 발병 확률이 훨씬 적다는 기록이 있다 [2].

전북대학교 식품공학과
Department of Food science & Technology, Chonbuk National University
Tel: +82-63-270-2571, Fax: +82-63-270-2572
e-mail: ysjeong@jbnu.ac.kr

¹강원대학교 생명과학과
¹Division of Life Science, Kangwon National University

차가버섯은 트리테르페노이드 (triterpenoids), 라노스테롤 (lanosterol), 이노토디올 (inotodiol) 및 trametenolic acid와 같은 많은 스테로이드와 페놀 화합물 등의 생리활성물질이 풍부하게 존재한다 [3-5]. 이러한 생리활성 물질들이 혈당조절, 항바이러스성, 항진균류성과 항종양 활성을 나타낸다고 보고되었다 [6-14]. 특히 약용버섯 추출물 중 면역증강작용에 의해 탁월한 항암효능과 당뇨병 개선효과를 보이는 생리활성물질은 β -D-glucan 구조를 갖는 수용성 단백질다당체로 구성되어 있음이 밝혀졌다 [15,16].

β -D-glucan은 다당류의 일종으로 면역증강작용을 가지고 있으며, 포도당 중합체로서 포도당 단위체의 1,3위치에 β -글리코시드 결합을 기본 구조로 가지고 있다. 그 기능은 암세포를 직접 공격하지 않고 비 특이적 면역반응으로 정상세포의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제한다. 그리고 대식세포 (macrophage)를 활성화 시켜 암세포가 있는 체내로 들어가 여러 가지 사이토카인 (cytokine)의 분비를 촉진시킴으로써 면역세포인 T세포와 B세포의 면역기능을 활성화 시켜 준다. 이 외에도 혈당강하와 혈중 콜레스테롤 감소효과가 우수하며, 지질대사를 개선하여 체지방 형성과 축적을 억제함으로써 항비만 효과를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다 [15-16].

현재, 약용버섯으로부터 얻어진 생리활성 효과를 지닌 크레스틴, 렌티난, 시조피란 등의 단백질다당체에 대한 수요는 많다. 그러나 자실체의 생산력이 일반적으로 매우 낮기 때문에, 높은 생산력을 보이는 균사체 액상배양이 유망한 대체 방법으로 떠오르며 상업적으로 생산되고 있다. 이미 일본에서는 기능성 식품으로 표고버섯 균사체추출물이 일반화되어 있으며, 의약품의 경우 구름 (운지)버섯 배양 균사체에서 추출한 단백질다당체 PSK는 항암성 면역증강제인 Krestin으로, 치마버섯 균사체 배양의 배양액에서 추출한 세포외다당체 Shizophyllan은 항암성 면역증강제인 Sizofilan 주사제로 판매되는 등 면역증강효과에 의한 암치료를 위한 보조제로 사용되고 있다 [17-18]. 이렇듯 낮은 생산력과 고가의 자실체를 대체할 수 있는 균사체 배양으로부터 얻은 단백질다당체도 자실체 유래의 단백질다당체가 지닌 면역증강 효과가 입증돼 생리활성물질로 주목 받고 있으며, 기능성식품으로 활용하기 위해서 가능한 순수한 상태로 분리 되어야 한다. 그리고 차가버섯의 경우 자실체는 지역적 한계로 우리나라에서는 재배가 힘들고, 단백질다당체 고함유의 차가버섯을 수입하는 것도 어려운 실정이다 [19].

차가버섯 균사체 배양액으로부터 고농도의 조단백다당체 분리하기 위해서는 추출방법의 선정 및 추출방법에 따른 추출온도, 추출 용매 량과 추출시간 등이 영향을 미치므로 최적화 할 필요가 있다. 추출 방법 중에서 열수추출은 일반적으로 가장 많이 사용되는 방법으로 장치설비의 know-how가 잘 알려져 있고, 시료를 대량으로 추출할 수 있는 장점을 가지고 있으나 낮은 수율과 추출시간이 길다는 단점이 있다. 초음파 에너지에 의한 추출은 초음파 진동에 의한 공동현상에 의해 매우 큰 에너지를 발생시키며, 주위에 위치하는 반응물 입자들의 운동에너지를 크게 하기 때문에 반응에 필요한 충분한 에너지를 얻게 된다. 특히 초음파 에너지의

충격효과로 높은 압력을 유도하여 혼합 효과를 높여주게 되며 다양한 분야에 응용이 가능하다. 그리고 전자파를 이용한 추출은 물질내부까지 짧은 시간에 가열, 복잡한 형상의 물질도 고르게 가열, 제어와 조작의 편리와 깨끗한 작업 환경 유지 등의 장점이 있다. 현재는 설비의 초기 투자비용이 열수추출에 비해 높다는 단점이 있으나, 높은 수율과 추출시간 단축 등의 장점이 있어 앞으로 산업적으로 많이 이용될 것으로 판단된다 [20].

본 연구에서는 액상배양에 의한 차가버섯 균사체로부터 다양한 추출방법을 비교하여 최적의 조단백다당체 추출방법과 추출조건 및 추출된 조단백다당체를 막을 이용하여 농축하기 위한 조건을 확립하고자 하였다. 그리고 추출된 조단백다당체를 정제하여 획득한 분획물에 대한 단백질다당체의 특성 기능기를 FT-IR를 이용하여 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 차가버섯 균사체 배양 배지 및 발효조건

발효조 배양은 1차와 2차 성장 배양과 생산 배양을 기본으로 하여 수행하였다. 성장배지는 Glucose 30 g/L, Brown rice 10 g/L, Yeast extract 8 g/L, Soytone peptone 4 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 0.6 g/L와 FeSO_4 (Stock: 10g/L) 1 mL/L이었고, 생산배지는 Glucose 30 g/L, Ammonium tartrate 8 g/L, Yeast extract 4 g/L, KH_2PO_4 2 g/L와 MgSO_4 0.6 g/L이었다.

차가버섯 균사체 배양은 75 L 발효조 (Bioengineering, Switzerland)를 사용하여 45 L working volume으로 수행하였다. 초기 1차 성장 배양은 30% (v/v)로 균을 접종하였으며 이후 2차 성장배양과 생산배양은 7.5% (v/v)씩 균을 접종하였다. 교반속도는 100-300 rpm 범위에서, 공기유속은 1 vvm을 유지한 상태에서 발효조를 운전하였다. 그리고 1차와 2차 성장배양기간은 각각 4 일하였고, 생산배양기간은 7일 동안 수행하였다. Foam의 발생 시 센서에 의하여 자동으로 발효기 내부로 소포제가 공급되도록 하였다. 또한 용존산소 농도는 25-30 (% sat.) 이상 유지되도록 교반속도를 조절해 주었다. 그리고 생산배양 단계에서는 humidifier를 장착하여 발효조 내의 배지가 증발되어 발효부피가 감소하는 현상을 방지하였다 [21].

2.2. 차가버섯 균사체 배양액으로부터 균사체 분리

차가버섯 균사체 배양액을 8,000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 균사체는 증류수로 3번 세척 후 동결건조 하여 시료로 사용하였다. 상장액은 4배의 에탄올을 가해 단백질다당류를 침전시킨 후 4°C에서 24시간 방치하고 원심분리 하였다. 침전된 단백질다당류는 소량의 증류수로 용해하여 dialysis tube (MWCO; 12,000 Da, Sigma, U.S.A)에 넣고 4°C에서 24시간 투석 후 동결 건조하여 분석용 시료로 사용하였다.

2.3. 조단백다당체 (세포내 단백질다당체; IPS)의 추출

조단백다당체를 추출하기 위한 과정을 Fig. 1에 나타냈다. 열수추출은 냉각관이 연결되어있는 1000 mL의 둥근 플라

스크에 시료 20 g과 증류수 200 mL을 넣고 일정온도가 유지되는 항온수조에서 추출하였다. 다만 100°C 추출은 고압멸균기를 이용하였다. 추출 후 조단백다당체를 분리하기 위해 여과지(Whatman No. 1)로 여과하여 1차 추출액을 얻었으며, 2차 추출액을 얻기 위해 1차 추출 후 남은 잔사에 같은 부피의 증류수를 가한 후 여과하였다. 초음파 추출은 100 mL 플라스크에 시료 3 g과 증류수 30 mL을 넣고, 초음파 장치(JAC Ultrasonic 2010, KODO, R.O.K)를 이용하여 일정온도와 시간을 조절한 후 추출하였다. 전자파 추출은 전자파 추출용기에 시료 5 g과 증류수 50 mL을 넣어 전자파 장치(Mars microwave sample preparation, CEM, U.S.A)를 이용하여 각각의 온도와 시간을 설정해 놓고 추출하였다. 추출은 열수추출 방법에서 언급한 것과 동일한 방법을 사용하였다.

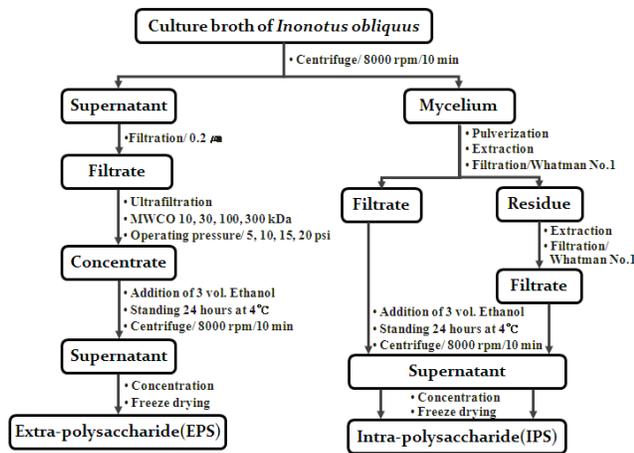


Fig. 1. Flow diagram for extraction of protein-bound polysaccharides from *Inonotus obliquus*.

2.4. 조단백다당체의 추출 효율 향상을 위한 전처리 방법

조단백다당체의 추출 효율 향상을 위한 전처리 방법으로 효소처리 방법과 균사체의 입자 크기 조절을 위한 초미쇄 분쇄 방법을 사용하였다. 세포막의 변형을 유도하여 조단백다당체의 추출을 용이하게 하기 위하여 셀룰라아제 (Sigma, U.S.A)를 농도 0.5, 1와 5 % (v/v)로 첨가 하여 온도 50°C에서 1시간 효소반응 시킨 후 열수와 전자파를 이용하여 조단백다당체를 추출하였다. 그리고 균사체의 크기가 추출에 미치는 영향을 조사하기 위하여 초미세분쇄는 KMS-200 (Korea Medi Co., Ltd. R.O.K)를 이용하여 시료를 분쇄하였다. 전처리 후 위에서 언급한 열수와 전자파 방법을 통해 추출을 실시하였다.

2.5. β-glucan 함량

Mecleary와 Glennie-Holmes의 효소적 방법에 따라 Megazyme β-glucan kit (Megazyme Pty. Ltd., Australia)를 사용하여 설명서의 방법을 따라 측정하였다.

2.6. HPLC에 의한 단백다당체 분석

미세잔사를 제거하기 위해 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상정액을 0.45 μm로 여과하여 Ultrahydrogel

1000 column (7.8 mm × 300 mm, Waters, USA)을 이용하여 HPLC (Futechs, R.O.K)로 분석하였다. 단백다당체 분석조건은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. HPLC conditions for protein bound polysaccharide analysis

HPLC	Futechs (R.O.K.)
Detector	ELSD
Column	Ultrahydrogel 1000 column (7.8 mm × 300 mm, Waters, USA)
Mobile phase	H ₂ O
Flow rate	0.6 mL/min
Injection volume	20 μL

2.7. 한외여과를 이용한 단백다당체 농축

추출 후 조단백다당체 농축을 위해 실험에 사용한 한외여과막 시스템 (Sartoflow® Slice 200 Benchtop Crossflow System, Satorius, Germany)은 다음과 같다. 저장조에 있는 시료 용액은 펌프에 의해 이송되며, 막을 통과한 용액은 여과조로 수집된다. 그리고 막을 통과하지 않은 거대물질은 저장조로 순환되어 최종적으로 농축이 가능하도록 막 시스템이 설계되어 있다. 추출된 조단백다당체 용액을 농축하기 위한 최적 막을 선정하기 위해 한계분자량 (Molecular weight cut-off, MWCO) 10, 30, 100과 300 kDa의 다양한 hydrosart 재질의 평판막을 사용하였다. 농축에 사용된 막은 1 N NaOH로 30분간 세정하였으며, 분리 후 사용하지 않는 막은 0.1 N NaOH 용액에 침지하여 다시 사용할 때까지 냉장 보관하였다.

2.8. Gel filtration column chromatography를 이용한 단백다당체 분리

조단백다당체를 구성하고 있는 단백다당체를 분자량 크기로 분리하기 위하여 Sepharose CL-4B (MWCO; 10⁴-10⁶, Pharmacia, Sweden)를 충전제로 하여 만든 Sepharose 400 칼럼 (200 mm × 600 mm)을 이용하여 gel filtration을 행하였다. 시료는 균사체를 제거한 배양액을 에탄올 침전 후 동결건조 하여 사용하였고, 조제 후 200 μL를 칼럼에 주입하여 분획하였다. 용출된 각 fraction은 peak가 높게 측정된 부분을 모아 동결건조 후 분석용 시료로 하였다. 단백다당체를 분획하기 위한 Gel filtration column chromatography의 조건은 Table 2에 나타내었다.

Table 2. HPLC conditions for protein bound polysaccharide separation by using gel filtration

HPLC	GILSON (U.S.A)
Detector	UV/VIS
Column	Sepharose 400 (20 mm × 600 mm)
Fraction collector	BIORAD (U.S.A)
Mobile phase	H ₂ O
Flow rate	0.25 mL/min
Injection volume	200 μL

2.9. FT-IR 분석

시료 0.5 mg과 KBr 50 mg을 잘 혼합하여 막자사발로 마쇄

Table 3. Comparison of various extraction method to extract the protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus*

Extraction conditions	PBP conc. (mg/g)	Extraction conditions	PBP conc. (mg/g)	Extraction conditions	PBP conc. (mg/g)
*IM-U-65-1	1.17	IM-H-80-1	1.49	IM-M-125-0.5	3.37
IM-U-65-2	1.20	IM-H-80-2	1.52	IM-M-125-1	3.77
IM-U-65-3	1.54	IM-H-80-3	2.52	IM-M-125-2	4.09
IM-U-65-4	1.57	IM-H-80-4	2.65	IM-M-125-3	4.88
IM-U-65-5	1.51	IM-H-80-5	2.53	IM-M-125-4	6.93
IM-U-65-6	1.22	IM-H-80-6	2.46	IM-M-125-5	5.40
IM-U-80-1	1.51	IM-H-100-1	2.24	IM-M-150-0.5	6.89
IM-U-80-2	1.55	IM-H-100-2	2.29	IM-M-150-1	7.35
IM-U-80-3	2.52	IM-H-100-3	3.72	IM-M-150-2	6.93
IM-U-80-4	2.68	IM-H-100-4	3.96	IM-M-150-3	6.33
IM-U-80-5	2.56	IM-H-100-5	3.75	IM-M-150-4	5.96
IM-U-80-6	2.44	IM-H-100-6	3.57	IM-M-150-5	4.94

*Sample (IM; *Inonotus obliquus* mycelium) - Extraction condition (U; Ultrasound, H; Hot water M; Microwave) - Extraction Temp (°C) - Extraction time (hour)

후 펄펄을 만든 다음, 적외선 흡수 스펙트로미터 (Spectrum GX, USA)를 사용하여 분석하였다. 표준물질로서 상황버섯에서 추출한 Mesima (메시마, Hankuk Sin Yak, R.O.K)를 구입하여 적외선 흡수 스펙트럼을 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 조단백다당체 (세포내 단백질; IPS)의 추출

조단백다당체의 추출을 위하여 3가지 추출방법 (열수, 초음파와 전자파)으로 추출조건에 따라 수행하였으며, Table 3에 나타내었다. 열수추출과 초음파 추출의 경우 같은 추출 시간에서는 온도가 높을수록 조단백다당체의 함량이 높게 나타났으며, 같은 온도 조건에서 일정시간까지는 추출시간이 증가할수록 고분자의 조단백다당체의 함량이 높아지나 그 이후에는 오히려 고분자의 조단백다당체 보다는 단당류의 함량이 높아지는 것을 볼 수 있었다. 그 결과 추출된 조단백다당체 함량이 상당히 낮은 것을 알 수 있었으며, 열수추출은 100°C에서 4시간 추출 시, 초음파추출은 80°C에서 4시간 추출 시 각각 3.96 mg/g과 2.68 mg/g으로 가장 높은 조단백다당체 함량을 보였다. 그리고 전자파 추출은 150°C

에서 1시간 추출 시 7.35 mg/g으로 가장 높은 조단백다당체 함량을 보였다. 일반적으로 추출 온도와 시간이 증가하면 조단백다당체의 추출 함량이 증가하는 경향을 보였으나, 대체적으로 추출시간이 길어지면 조단백다당체의 함량은 감소하였다. 전자파 추출한 시료를 HPLC로 분석한 결과 온도가 높고, 추출시간이 길어질수록 조단백다당체의 함량은 적어지고 저분자물질이 증가하였다 (자료 미제시). 이는 고온에서 조단백다당체가 저분자 물질로 분해하였거나 열 변성에 의한 결과로 추측되었다. 정확한 검증을 위한 연구가 이 부분에서 필요하다고 생각되었으나 본 연구에서는 생략하였다.

상기 실험 결과를 보완하기 위하여, 일차적으로 고온의 조건에서 분해 등으로 인해 소실 가능성이 높은 유효성분은 저온 추출하고, 다음 단계에서 상대적으로 높은 온도에서 추출한다면 이전 실험에서 나타났던 문제점들을 해결할 수 있을 것으로 판단되어 2단계 추출 공정을 수행하였다. 즉, 온도 80°C와 100°C에서 각각 1, 2, 4, 8시간 동안 1차 열수추출하여 여과한 후 남은 잔사에 일정 용매를 넣어 전자파를 이용하여 2차 추출을 행하였다. 이중 100°C에서 4시간 동안 1차 열수추출을 행한 후 여과하고 남은 잔사를 이용해 150°C에서 0.5시간 동안 2차적으로 전자파추출을 행하였을

Table 4. Comparison of various two-step extraction conditions to extract the protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus*

Extraction conditions	PBP conc. (mg/g)	Extraction conditions	PBP conc. (mg/g)
*IM-H-80-1-M-150-0.5	6.15	IM-H-100-1-M-150-0.5	6.21
IM-H-80-2-M-150-0.5	7.17	IM-H-100-2-M-150-0.5	7.85
IM-H-80-4-M-150-0.5	8.95	IM-H-100-4-M-150-0.5	9.40
IM-H-80-6-M-150-0.5	4.72	IM-H-100-6-M-150-0.5	3.32
IM-H-80-1-M-150-1.0	7.09	IM-H-100-1-M-150-1.0	7.24
IM-H-80-2-M-150-1.0	8.25	IM-H-100-2-M-150-1.0	8.34
IM-H-80-4-M-150-1.0	8.81	IM-H-100-4-M-150-1.0	8.92
IM-H-80-6-M-150-1.0	5.03	IM-H-100-6-M-150-1.0	3.54
IM-H-80-1-M-150-1.5	6.02	IM-H-100-1-M-150-1.5	5.98
IM-H-80-2-M-150-1.5	6.19	IM-H-100-2-M-150-1.5	6.24
IM-H-80-4-M-150-1.5	6.52	IM-H-100-4-M-150-1.5	6.47
IM-H-80-6-M-150-1.5	3.82	IM-H-100-6-M-150-1.5	2.99

*Sample (IM; *Inonotus obliquus* mycelium) - 1st Extraction condition (H; Hot water) - 1st Extraction temp (°C) - 1st Extraction time (hour) - 2nd Extraction condition (M; Microwave) - 2nd Extraction temp (°C) - 2nd Extraction time (hour).

때 9.4 mg/g으로 가장 높은 조단백다당체 함량을 보였다. 이는 1차 추출 중 가장 높은 함량을 보였던 전자파 추출보다 1.3배 높은 것으로 1차적인 열수 추출에 의해 세포벽이 한층 더 약해져 2차 전자파추출에 의해 더 많은 양의 조단백다당체가 추출 된 것으로 판단되었다 (Table 4).

3.2. 조단백다당체의 추출을 위한 전처리 효과

차가버섯 균사체에 존재하는 단백다당체는 구조다당류의 형태로써 세포벽을 구성하는 물질이다. 그러므로 유용물질을 세포벽으로부터 얻기 위하여 효과적인 추출방법을 고려하여야 한다. 세포벽을 전처리하기 위한 방법으로써 셀룰라제, 아밀라제, 글루카나제, 헤미셀룰라제, 글루코시다제, 키틴나제, 펙티나제, 라이소자임 등을 이용한 연구 등이 보고되고 있다 [22]. 본 연구에서는 여러 효소 중 쉽게 구입 가능한 셀룰라제를 선택하여 조단백다당체 추출 가능성을 검토하였다. 차가버섯 균사체 배양액으로부터 균체를 분리 한 후, 균사체에 셀룰라제 농도를 0.5%, 1% 그리고 5% (v/v)로 첨가 하여 50°C에서 1시간 반응 시킨 후 열수와 전자파를 이용하여 추출하여 결과를 Table 5에 나타내었다.

Table 5. Separation of protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus* by various enzyme concentrations and different extraction conditions

Extraction conditions	Cellulase concentration (%)		
	0.5	1.0	5.0
*IM-H-80-1	**1.00	1.32	7.84
IM-H-80-3	1.40	1.72	9.16
IM-H-80-5	1.92	1.88	11.28
IM-H-80-7	1.80	1.80	10.20
IM-H-100-1	2.32	2.72	7.84
IM-H-100-3	2.48	2.56	7.92
IM-H-100-5	2.48	1.92	11.44
IM-H-100-7	2.08	2.20	10.92
IM-M-100-0.5	8.92	13.2	19.72
IM-M-100-1.0	2.76	10.24	6.08
IM-M-100-1.5	2.24	5.36	17.76
IM-M-125-0.5	19.48	17.76	-
IM-M-125-1.0	18.48	-	-
IM-M-125-1.5	9.64	-	-
IM-M-150-0.5	-	-	-
IM-M-150-1.0	-	-	-
IM-M-150-1.5	-	-	-

*Sample (IM; *Inonotus obliquus* mycelium) - Extraction condition (H; Hot Water and M; Microwave) - Extraction Temp (°C) - Extraction time (hour).

**Protein bound polysaccharides concentration (mg/g).

열수 온도와 시간은 80°C와 100°C에서 1시간, 3시간, 5시간과 7시간 각각 추출한 결과, 조단백다당체 함량은 1.0-11.44 mg/g 범위이었으며, 추출온도와 시간은 높고 길수록 증가하는 경향을 나타냈다. 셀룰라제 첨가량이 증가하면, 높은 효소농도에 의한 세포벽 변화로 인하여 조단백다당체 함량은 증가하는 경향을 나타냈다. 그러나 추출을 위한 효소 첨가량이 너무 많아 효과적인 방법으로 판단되지는 않았다.

효소처리 후 전자파를 이용한 추출의 경우, 온도 100°C, 125°C와 150°C에서 추출시간은 30분, 60분과 90분 동안 각각 추출한 결과는 다음과 같다. 조단백다당체 함량은 2.24-19.72 mg/g의 범위를 나타내 열수추출 시 보다 높게 측정되었다. 전자파의 경우 복잡한 형상의 물질도 고르게 가열할 수 있기 때문이라고 판단되었다. 열수추출과 비슷하게 첨가한 효소농도가 증가하면 조단백다당체의 함량은 증가하는 경향을 보였다. 그러나 열수추출과 다르게 일부 고온의 추출 온도와 고농도의 효소에서는 조단백다당체의 함량을 측정할 수 없었다. 효소 농도 0.5%로 전처리 후 100°C에서 추출한 경우, 30분 추출 시 HPLC 분석결과 표준물질인 메시마의 단백다당체 peak와 가장 일치하여 많이 추출되었고, 추출시간이 길어질수록 조단백다당체가 저분자 당류로 분해되어 조단백다당체 함량은 감소하는 경향을 나타냈다. 1% 효소농도로 30분 추출 시 조단백다당체 함량은 13.20 mg/g으로 메시마와 같은 시간대에 추출되어 높은 값을 나타냈으며, 역시 추출 시간이 길어질수록 조단백다당체 함량은 감소하였다. 125°C의 경우, 효소농도 0.5%로 30분과 60분 추출 시 조단백다당체 함량은 각각 19.48 mg/g과 18.48 mg/g을 나타냈으며 90분 추출 시에는 조단백다당체 함량이 9.64 mg/g으로 감소됨을 보였다. 그리고 125°C에서 효소농도 1%로 30분 추출 시 조단백다당체 함량은 17.76 mg/g을 나타냈고, 60분과 90분 추출 시에는 조단백다당체가 검출 되지 않았다. 150°C의 경우, 각각의 효소 농도로 추출 시 조단백다당체는 높은 온도와 효소의 영향으로 조단백다당체가 저분자 당류로 분해되어 조단백다당체가 검출 되지 않은 것으로 판단되었다 (HPLC 자료 미제시).

Table 6. Comparison of various extraction conditions to extract the protein bound polysaccharides from mycelium residue of *Inonotus obliquus* which was obtained by the first extraction and cellulase (0.5%) pretreatment

Extraction conditions	PBP conc (mg/g)
*IMR (**100-1)-M-150-0.17	17.48
IMR (100-3)-M-150-0.17	13.44
IMR (100-5)-M-150-0.17	9.84
IMR (100-1)-M-150-0.33	23.16
IMR (100-3)-M-150-0.33	18.68
IMR (100-5)-M-150-0.33	9.40

*Sample (IMR; *Inonotus obliquus* mycelium residue-2nd Extraction condition (M; Microwave) - Extraction Temp (°C) - Extraction time (hour).

**The first extraction was done under hot water at 100°C and extraction time (hour).

상기 결과를 토대로 효소처리를 하더라도 1단계 추출보다는 2단계처리 방법이 조단백다당체 추출에 효과적인 것으로 생각되었다. 셀룰라제 효소농도 0.5% 처리 후 100°C에서 1시간동안 열수추출된 잔사를 다시 전자파처리를 한 결과를 요약하면 Table 6과 같다. 효소처리에 의한 최적의 단백다당체 추출 조건은 셀룰라제 효소농도 0.5% 처리 후 100°C에서 1시간동안 열수추출된 잔사를 전자파에서 150°C에서 20분 추출한 경우로 이때 조단백다당체의 함량은 23.16 mg/g

었다. 효소를 처리하지 않은 9.4 mg/g보다 조단백다당체 함량은 약 2.5배 향상됨을 알 수 있었다. 효소처리로 인하여 세포벽이 느슨해진 효과로 생각되었다. 효소 처리의 경우, 세포벽을 변화시키고 추출 효율을 높이기 위하여 차후 글루카나제 등의 효소와 병행하여 효소의 가격 등 경제성을 고려하여 실험을 수행할 필요가 있다고 생각되었다.

그러나 효소를 사용한 추출의 효율성과 효소의 가격을 고려한다면 물리적 처리방법이 최선의 선택이라는 생각을 하게 되었으며, 입자를 초미세 분쇄한 (20~40 micron, 입자 분포 측정 자료 미제시) 후에 조단백다당체 추출 정도를 실험해 보았다.

초미세분쇄 전에는 세포막의 파괴가 쉽지 않아 열수추출로 세포막을 약하게 만든 후에 전자파 추출을 통해 단백질 다당체를 추출하였으나, 초미세분말화한 후에는 열수추출만으로도 단백질 다당체의 추출이 용이할 것으로 생각되어 전자파만을 이용해 고온으로 단시간에 단백질 다당체의 추출 함량을 높일 수 있는지를 확인해 보았다. 초미세분쇄한 균사체의 경우 150°C에서 0.25시간 추출 시 37.86 mg/g, 150°C에서 0.5시간 추출 시 60.52 mg/g과 150°C에서 1시간 추출 시 64.94 mg/g이 추출되었다. 즉 추출시간이 길어질수록 추출 함량이 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 초미세분쇄후의 전자파추출에서는 150°C에서 1시간 추출 시 조단백다당체의 함량은 초미세분쇄하지 않았을 때의 9.4 mg/g보다 약 6.9배 증가를 보였으며, 효소처리 후 2단계 추출한 결과 (23.16 mg/g) 보다도 약 2.8배 더 높은 함량을 보였다. 이제까지 수행한 3가지 추출 방법, 전처리 여부와 다양한 추출조건에 따른 결과들을 비교 정리하여 Fig. 2에 나타내었다.

전자파를 이용하여 추출하는 경우는 추출시간이 길어질수록 높은 온도로 인해 추출된 조단백다당체의 함량이 낮아지는 경향이 있으며, 이를 방지하기 위해선 시료가 최대한 용매에 잘 분산되게 하고 추출온도가 고온인 경우에는 짧은 시간동안 전자파 추출을 행하는 것이 효과적이라 생각되었다.

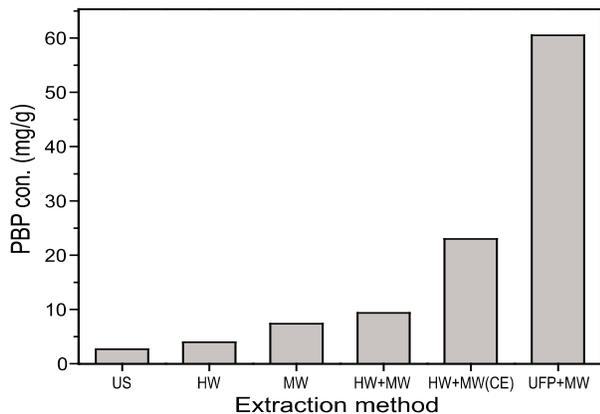


Fig. 2. Comparison of various extraction methods to extract the protein bound polysaccharide from mycelium of *Inonotus obliquus*. US; Ultrasound (*IM-U-80-4), HW; Hot water (IM-H-100-4), MW; Microwave (IM-M-150-1), HW + MW; (IM-H-100-4-M-150-0.5), HW + MW (CE, Cellulase 0.5%); (IMR(100-1)-M-150-0.33), UFP (Ultra-fine pulverization) + MW; (UFP-M-150-1).

*Refer to the Table 3,4,5 and 6 about the abbreviations used in Fig. 2.

3.3. 한의여과를 이용한 조단백다당체 농축

차가버섯 균사체 배양액에 존재하는 조단백다당체 농축을 위해 MWCO 10, 30, 100과 300 kDa인 막을 사용하여 압력은 15 psi로 고정한 후 3배 농축 실험을 실시하였다. 그 결과 여과시간을 결정하는 중요 요인인 플럭스는 막의 한계 분자량이 커질수록 증가하였고, 농축시간도 단축됨을 알 수 있었다 (Fig. 3). MWCO 10 kDa을 사용한 경우 플럭스는 초기에 증가하기 시작하여 2.2분에 290 g/min·m²으로 최대를 나타냈고, 그 후 서서히 감소하여 6.7분부터 270 g/min·m²으로 정상상태를 유지하다 56.2분에 농축이 완료되었다. MWCO 30 kDa을 사용한 경우 플럭스는 여과 시작 후 1.2분에 850 g/min·m²으로 최대값을 나타냈으며, 서서히 감소 후 22.2분에 농축이 완료되었다. MWCO 100 kDa을 사용한 경우 플럭스는 1.7분에 2730 g/min·m²으로 최대 플럭스를 나타냈으며 5.7분부터 2450 g/min·m²으로 서서히 감소하다가 6.2분에 농축이 완료되었다. MWCO 300 kDa을 사용한 경우 플럭스는 여과 1.7분에 3250 g/min·m²으로 최대를 나타냈고 5.2분까지 2820 g/min·m²으로 서서히 감소하였으며 5.7분에 이르러 농축이 완료되었다. 일반적으로 플럭스는 여과의 시간이 경과함에 따라 저하되며 일정시간을 경과하면 정상상태가 유지되는데 이러한 이유는 막 표면의 sublayer의 형성과 제거 속도가 일정하게 유지되기 때문이다. 상기 결과로부터 막의 MWCO가 커질수록 큰 세공으로 인한

Table 7. Data of protein bound polysaccharide separated by using various ultrafiltration membranes

UF (MWCO, kDa)	PBP conc. (mg/mL)	
	Retentate	Permeate
10	0.170	-
30	0.156	-
100	0.103	0.068
300	0.095	0.069

Initial conc. of crude solution: 0.057 (mg/mL), Initial crude solution is concentrated to 3 times by the use of different ultrafiltration membranes at 25°C and 15 psi.

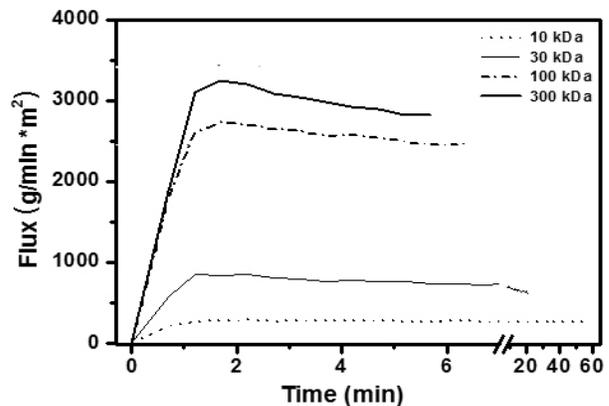


Fig. 3. Comparison of flux with time by using various MWCO membranes. Operation pressure was 15 psi. All the data are based on the automatic profiling information of the ultrafiltration membrane system.

여 플럭스는 증가하고, 농축하는데 걸리는 시간도 단축됨을 알 수 있었다. MWCO 10과 30 kDa 막을 사용하여 농축한 경우, 조단백다당체의 함량이 농축 전의 시료와 비교 시 각각 3배와 2.7배 농축되어 비교적 농축이 잘됨을 확인할 수 있었으며, 막을 투과한 투과액에서는 조단백다당체가 검출되지 않아 분리가 잘됨을 알 수 있었다. 하지만 MWCO 100과 300 kDa 막을 사용하여 농축한 경우에는 투과액 모두에서 조단백다당체가 검출되어 조단백다당체 일부가 막을 통과하는 것을 확인할 수 있었고, 농축 전 시료와 비교 시 각각 약 1.8과 1.7배 농축되어 조단백다당체 농축에는 적절하지 못함을 확인할 수 있었다 (Table 7).

조단백다당체 농축에 가장 적절하다고 판단되는 MWCO 30 kDa 막을 사용하여 다양한 압력에 따른 플럭스 변화를 관찰하여 농축에 적절한 압력을 선정하고자 하였다. 그 결과 압력이 증가할수록 플럭스는 증가하고 농축시간은 단축됨을 알 수 있었다 (Fig. 4). 단백다당체 함량은 농축 전 0.131 mg/mL에서 운전압력에 따라 1.291-1.302 mg/mL로 측정되었으며, 약 10배 농축됨을 확인할 수 있었다 (Table 8). 또한 압력이 높아질수록 최종 농축된 단백다당체 함량이 미미하게 감소하는 경향을 나타냈는데, 높은 압력으로 운전 시 막 표면에 용질이 침착되었기 때문으로 판단되었다. 따라서 본 연구에 사용된 한외여과 시스템의 경우, 조단백다당체 농축을 위한 압력은 최대 허용 압력인 20 psi 보다 낮은 15 psi로 운전하는 것이 효율적이라고 판단되었다.

Table 8. Data of protein bound polysaccharides separated under various operation pressures

Pressure (psi)	PBP conc. (mg/mL)	
	Retentate	Permeate
5	1.302	-
10	1.299	-
15	1.295	-
20	1.291	-

Initial conc. of crude solution: 0.131 (mg/mL).
Initial crude solution is concentrated to 10 times by the use of ultrafiltration membrane (MWCO 30 kDa) at 25°C.

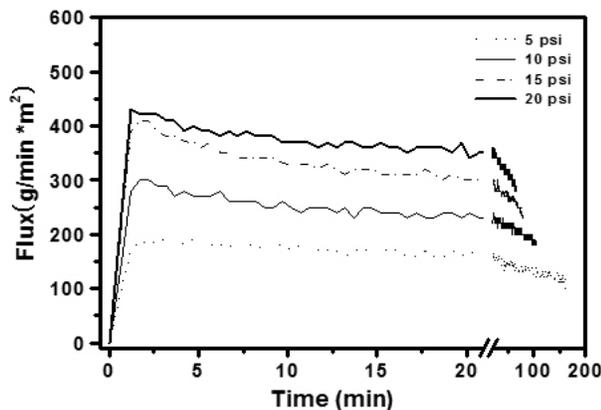


Fig. 4. Change of flux according to various operating pressures with time. Membrane; MWCO 30 kDa. All the data are based on the automatic profiling information of the ultrafiltration membrane system.

3.4. Gel filtration column chromatography에 의한 조단백다당체 분획

조단백다당체를 분자량 크기로 분획하기 위하여 Sepharose 400 칼럼 (200 mm × 600 mm)을 사용하여 gel filtration을 행하였다. 표준물질로 이용한 메시마와 차가버섯 균사체로부터 추출하여 농축한 조단백다당체의 분석결과, 메시마의 경우 peak가 60-116분 (No. 16-28), 136-164분 (No. 45-49)과 164-176분 (No. 50-51)에서 나타났고, 조단백다당체의 경우 peak가 60분-116분 (No. 16-28), 122-126분 (No. 32-40)과 128-134분 (No. 41-44) 분획에서 나타났다 (Fig. 5). 분획한 것을 다시 HPLC를 이용해 분석한 결과, 첫 번째 (No. 16-28) 분획은 표준물질의 단백다당체와 같은 시간대에 검출되어 단백다당체임을 확인할 수 있었고, 두 번째와 세 번째 분획은 시간대가 뒷부분에서 용출되어 저분자의 당류로 추측되었다 (Fig. 6).

Gel filtration을 이용한 분획과정 중 각 단계별 단백다당체 수율을 비교한 결과, 에탄올 침전과 gel filtration 후의 단백다당체 함량의 수율은 92.71%와 89.79%로 비교적 높은 수치를 나타냈다 (Table 9). 그러므로 배양된 차가버섯 균사체로부터 조단백다당체 추출을 위한 최적의 조건은 초미세 분쇄 후 전자과 추출기를 이용하여 150°C에서 1시간 추출과 MWCO 30 kDa 막을 이용한 농축 단계에서 전체 부피를 최대한 10배 이상 감소시키고 (다음 단계인 에탄올 침전 시 용매 사용량 저감 가능), 에탄올 침전을 병행하는 방법이 최적임을 확인할 수 있었다.

Table 9. Comparison of yield of protein bound polysaccharides at the different purification steps

Steps	PBP con. (mg/L)	PBP yield (%)
Ethanol precipitation	8.00	92.71
Gel filtration	7.40	89.79

PBP conc. of initial solution was 8.62 (mg/L).

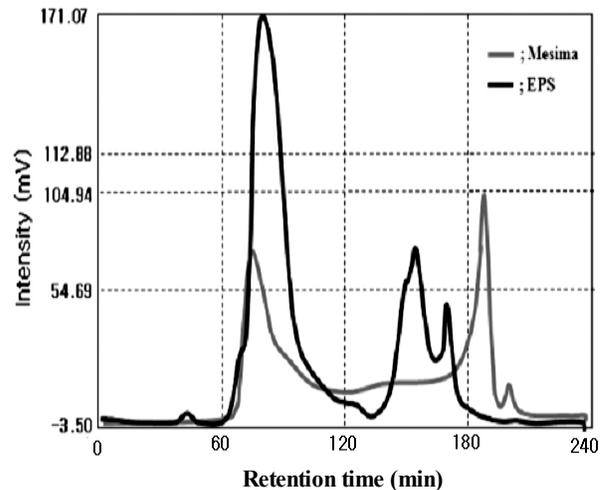


Fig. 5. Chromatogram of protein bound polysaccharides fractionated from Mesima and EPS by gel filtration. HPLC conditions for protein bound polysaccharide separation by using gel filtration are given in Table 2.

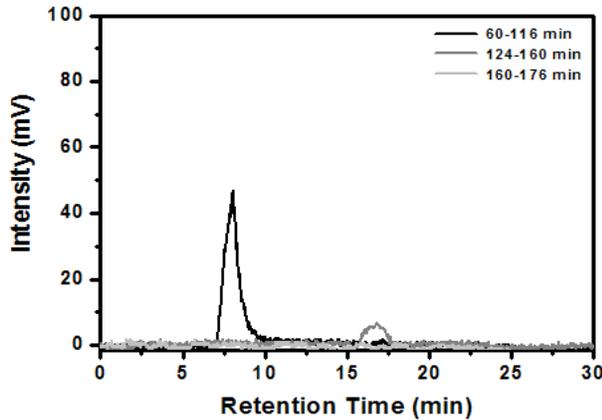


Fig. 6. Chromatogram of three different EPS fractions obtained from gel filtration (Fig. 5). HPLC conditions for protein bound polysaccharide analysis are given in Table 1.

3.5. FT-IR 분석

Gel filtration으로부터 분획된 시료 (단백다당체)가 어떤 작용기를 가지고 있는지 표준물질과 비교 관찰 하였다 (Fig. 8). 대부분의 peak가 표준물질과 일치하여 분리된 시료가 단백질다당체임을 확인할 수 있었다. 또한 Vlasta 등은 표고, 영지, 느타리버섯 등 약 70여 종의 버섯에 대한 FT-IR 패턴 연구에서 890 cm^{-1} 영역은 β -glycosidic linkage를 나타내며, 930 cm^{-1} 은 α -glycosidic linkage를 나타낸다고 보고하였다 [22]. 본 연구에서 추출한 시료의 경우 890 cm^{-1} 영역에서 peak가 나타났으며, β -glycosidic linkage를 가지고 있는 것으로 판단하였다 [23].

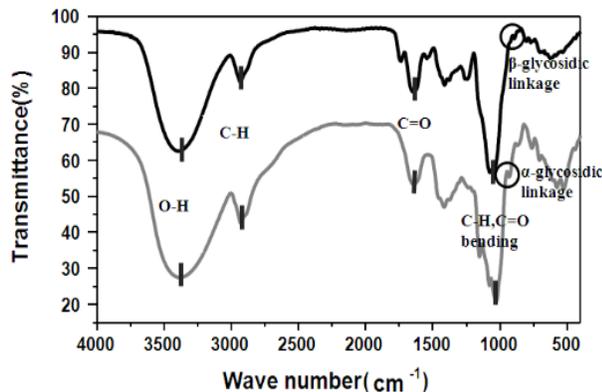


Fig. 7. FT-IR spectrum of Mesima and EPS which is purified by gel filtration. —; Mesima, —; EPS.

4. 결론

본 연구에서는 차가버섯 균사체 배양액으로부터 수용성 조단백다당체를 추출과 농축하여 보다 순수하게 분리, 정제하는 방법을 확립하고자 하였으며, 분리된 조단백다당체의 기능기를 FT-IR를 이용하여 확인하였다. 배양된 차가버섯 균사체로부터 조단백다당체 추출을 위한 최적의 조건은 초미세 분쇄 후 전자파 추출을 이용하여 150°C 에서 1시간 추출한

것으로 조단백다당체의 함량은 64.94 mg/g 이었다. 이는 초미세분쇄를 하지 않았을 때의 가장 좋았던 추출함량인 9.4 mg/g 보다 약 6.9배 증가된 것이며, 효소처리 (총 22.5 mg/g)보다도 약 2.9배 더 높은 함량을 보였다. 막을 이용한 효율적인 조단백다당체 농축을 위한 한계분자량과 압력은 각각 30 kDa 과 15 psi 이었으며, gel filtration 크로마토그래피에 의한 단백질다당체 분리 수율은 89.79% 로 비교적 높았다. FT-IR 분석 결과 O-H, C-H, C=O와 CH, C=O bending 등 표준물질과 같은 작용기를 가지고 있어 단백질다당체임이 확인되었으며, 베타 글루칸 특성을 나타내는 890 cm^{-1} 영역에서 진동이 일어남을 알 수 있었다.

감사

본 연구는 농림수산물부 (농림기술개발사업 106418)과 전북대학교 바이오식품 소재개발 및 산업화연구센터의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Kier, L. (1961) Triterpenes of *Poria obliqua*. *J. Pharm Sci.* 50: 471-474.
- Shivrina, A. N. (1967) Chemical characteristics of compounds extracted from *Inonotus obliquus*. *Chem. Abstr.* 66: 17271-17279.
- Ludwiczak, R. S. and U. Wrzeciono (1975) Forschungen uber die cgemischen bestandteil of *Inonotus obliquus*, IV. *Ergosterol Roc. Chem.* 34: 1701-1705.
- Kahlos, K. and R. Hiltunen (1983) Identification of some lanostane type triterpenes from *Inonotus obliquus*. *Acta Pharm. Fenn.* 92: 220-224.
- Kukulyanskaya, T. A., N. K. Kurcheno, V. P. Kurcheno, and V. G. XBabitskaya (2002) Physicochemical properties of melanins produced by the sterile from of *Inonotus obliquus* ("Chaga") in natural and cultivated fungus. *Appl. Biochem. Microbiol.* 38: 58-61.
- Takashi, M., Z. Cun, A. Kuniaki, O. Hidehumi, K. Tadash, U. Shigeo, L. Sophie, and M. Laurent (1999) Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus*. (Pers.: Fr.) Pil. (Aphyllphoromycetidae). *Int. J. Med. Mush.* 1: 301-316.
- Shin, Y. S., Y. Tamai, and M. Terazawa (2000) Chemical constituents of *Inonotus obliquus*. A new triterpene; 3h-hydroxy-8, 24-dienlanosta-21, 23-lactone from sclerotium. *Eurasian. J. Fore. Res.* 1: 43-50.
- Kahlos, K. (1996) Preliminary test of antiviral activity of two *Inonotus obliquus* strains. *Fitoterapia LXVII* 4: 344-347.
- Ichimura, T., T. Otake, H. Mori, and S. Maruyama (1999) HIV-1 protease inhibition and anti-HIV effect of natural and synthetic water-soluble lignin-like substance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 2202-2204.
- Kahlos, K. (1994) Antifungal activity of cysteine, its effect on C-21 oxygenated lanosterol derivatives and other lipid in *Inonotus obliquus in vitro*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 3: 339-385.
- Kahlos, K., L. Kangas, and R. Hiltunen (1987) Antitumor activity of some compounds and fractions from an n-hexane

- extract of *Inonotus obliquus*. *Acta Pharm. Fen.* 96: 33-40.
12. Jarosz, A., M. Skorska, J. Rzymowska, J. Kochmanska-Rdest, and E. Malarczyk (1990) Effect of the extracts from fungus *Inonotus obliquus* on catalase level on hela and nocardia cells. *Acta Biochim. Pol.* 37: 149-151.
 13. Burczyk, J., A. Gawron, M. Slotwinska, B. Smietana, and K. Terminska (1996) Antimitotic activity of aqueous extract of *Inonotus obliquus*. *Bolle. Chim. Farm.* 135: 306-309.
 14. Galasinski, W., J. Chlabicz, A. Paszkiewicz-Gadek, C. Marcinkiewicz, and A. Gindzienski (1996) The substances of plant origin that inhibit protein biosynthesis. *Acta Pol. Pharm.* 53: 311-318.
 15. Misuno, T. (1990) Antitumor activity and some properties of water soluble polysaccharide from fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2889-2896.
 16. Hwang, Y. J., G. W. Noh, and S. H. Kim (2003) Effect of *Inonotus obliquus* extracts on proliferation and caspase-3 activity in human gastro-intestinal cancer cell lines. *J. Korean Nutr. Soc.* 36: 18-30.
 17. Komatsu, N., S. Okubo, S. Kikumoto, K. Kimura, G. Saito, and S. Sasaki (1969) Host mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum*. *Commun Gann.* 60: 137-144.
 18. Tshkagoshi, S. and F. Ohashi (1974) Protein bound polysaccharide preparation, PSK, effective against mouse sarcoma-180 and ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Commun Gann.* 65: 557-558.
 19. Kim, Y. O., S. B. Han, H. W. Lee, H. J. Ahn, Y. D. Yoon, J. K. Jung, H. M. Kim, and C. S. Shin (2005) Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Life Sci.* 77: 2438-2456.
 20. Huang, S. Q., J. W. Li, Z. Wang, H. X. Pan, J. X. Chen and Z. X. Ning (2010) Optimization of alkaline extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their effect on immune function in mice. *Molecules* 15: 3694-3708.
 21. Hong H. P. (2010) *Enhanced production of polysaccharides through strain improvement and medium optimization in suspended mycelial fermentations of Inonotus obliquus*, M. S. Thesis, College of Biomedical Sci., Kangwon National University, Gangwon.
 22. Pamela, M. and P. Laura (2000) Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chem.* 68: 315-318.
 23. Vlasta, M. G., B. Romano, and J. P. Gerwin (2001) Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochimica Acta Part A* 57: 2815-2829.