

Isolation and Purification of Polysaccharide from Fruiting body and Culture Broth of *Agaricus blazei* Murill

Yong Soo Youm and Eock Kee Hong

School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University

TEL: 033-250-6275, Fax: 033-243-6350

Abstract

The polysaccharides were extracted from fruiting body, mycelia, and cell-free broth of *Agaricus blazei* Murill. The crude polysaccharides were obtained by the ethanol addition. They were further purified using ion-exchange chromatography and gel chromatography. Ion-exchange chromatography using DEAE-cellulose column separated neutral and acidic polysaccharides. Neutral polysaccharides were then purified with gel filtration chromatography. For single peak obtained from gel filtration chromatography was molecular weight was measured with Sepharose CL-6B. The same procedure with acidic polysaccharides were performed to get the purified polysaccharides.

서 론

오랜 세월전부터 식용 및 약용으로 이용되어져 왔던 버섯은 일반적으로 단백질, 이미노산, 효소, 비타민, 무기염류, 지방질 및 당 등과 같이 인체에 중요한 각종 영양성분을 함유하고 있으며 버섯속에 함유되어 항암활성을 나타내는 polysaccharide에 대한 연구가 진행되고 있다. 전통적으로 버섯을 열수 추출한 polysaccharide에서 항암 활성이 높은 것으로 알려져 있다. 항암활성을 나타내는 polysaccharide의 기본 구조는 주사슬이 glucose의 (1-3)결합이며 1.2~4개의 잔기마다 (1-6)결합으로 glucose가 연결되어 있는 (1-3),(1-6)- β -D-glucan이다. β -D-glucan 사슬에 작은 단백질이나 polypeptide 사슬이 안정하게 결합되어 있는 것을 polysaccharide-peptide 또는 proteoglycan이라고 한다. 버섯의 종마다 항암활성이 나타내는 polysaccharide의 구조가 다르며 분자량도 매우 다양하다. *Coriolus versicolor* 균사체에서 추출한 β -glucan-protein(Krestin)은 2.0×10^6 이며, *Lentinus edodes* 자실체에서 추출한 β -glucan은 1.0×10^6 , 균사체에서 추출한 β -mannan-peptide는 7.8×10^4 의 분자량을 가지고 있는 것으로 나타났다. 이와 같이 버섯의 종에 따라 버섯의 자실체 및 배양 균사체, 배양여액에 따라 polysaccharide

의 분자량은 다름을 알 수 있다. 본 실험에서는 *Agaricus blazei*의 자실체 및 균사체, 배양여액에서 ethanol추출한 polysaccharide의 정제를 거친 후 분자량의 분포를 확인, 비교하였다.

재료 및 방법

균주 및 보존

본 실험에 사용된 균주는 담자균류의 일종인 *Agaricus blazei murill*이었다. 보관용 배지로는 PDA(potato dextrose agar)를 사용하였다. 균주 배양을 위한 기본배지로서는 fungi의 기본배지로 사용되고 있는 YMK media를 사용하였으며, 그 조성은 glucose 20g/L, yeast extract 5g/L, MgSO₄·7H₂O 1g/L, KH₂PO₄ 2g/L로 구성하였다.

Crude polysaccharide 분리

Crude polysaccharide의 추출 및 분리는 자실체의 경우 파쇄하여 분말화된 100g을 증류수 1L로 121 °C에서 2시간 추출하였으며, 원심분리(5000 rpm, 30 min)를 통하여 침전물을 제거하고 상등액에 3배의 ethanol을 가하여 4 °C에서 24시간 동안 침전대기 하였다. 상층부의 부유 다당체를 filter paper를 사용하여 분리하였으며, 침전물은 원심분리(5000 rpm, 30 min)를 통하여 분리하고 다시 증류수로 용해한 후 rotary vaccum evaporator를 이용하여 ethanol을 제거하고 다당체를 농축하였다. 농축된 시료를 7일간 투석하고 동결건조하여 crude polysaccharide를 얻었다. 균사체는 자실체와 동일한 실험과정으로 수행하였으며, 배양여액은 3배의 ethanol을 가하는 과정부터 위와 동일하게 시행하였다.

Crude polysaccharide 정제

Ion exchange chromatography에 의한 정제

DEAE-cellulose에 0.2M HCl용액을 충분히 가하여 교반하면서 약 30분 동안 활성화 시키고, 증류수로 수세하였다. 여기에 0.2M NaOH용액을 충분히 가하고 30분 정도 교반하고 증류수로 수세하는 과정을 3회 반복하여 최종 Cl⁻ form으로 전처리된 DEAE-cellulose를 column(2.6 × 50 cm)에 충전하고 증류수로 충분히 수세하여 평형화 시켰다.

Crude polysaccharide를 증류수에 완전히 녹여 column에 주입하여 200 mL/hr의 유속으로 10mL씩 분획하여 용출하였다. 이로부터 중성분획을 얻었으며, NaCl 농도구배

(0-2M)로 용출하여 산성분획을 얻었다. 각 분획의 당 및 단백질 분석은 phenol-sulfuric acid법 및 Bradford법으로 측정하였다.

Gel chromatography에 의한 정제

증류수에 수세된 Sepharose CL-6B를 column(2.4 × 80 cm)에 충전하고 0.5M NaCl용액을 흘려보내어 평형화 시킨 후 ion exchange chromatography에 의해 정제된 시료를 0.5M NaCl용액에 충분히 녹인 후 원심분리하여 불순물을 제거하고 column에 주입하였다. 100 mL/hr의 유속으로 용출하여 5mL씩 분획하였다. 각 분획의 당 및 단백질 분석은 phenol-sulfuric acid법과 Bradford법으로 측정하였다.

분자량의 확인

Sepharose CL-6B를 column(2.4 × 80 cm)에 충전 후 0.5M NaCl용액에 standard dextran(670000, 410000, 150000, 28000)을 녹여 분자량과 용출부피로 standard curve를 작성하였다. Gel filtration chromatography를 이용하여 단일 피크의 분획물을 얻었다. 분획물을 sepharose CL-6B에 주입하여 용출부피를 이용하여 평균분자량을 계산하였다.

결과 및 고찰

Crude polysaccharide의 분리

자실체 및 균사체, 배양여액에서 추출한 crude polysaccharide의 추출 수율은 Table. 1과 같다,

Crude polysaccharide 정제

Ion exchange chromatography에 의한 정제

자실체 추출물에 ethanol 첨가로 침전된 crude polysaccharide(F-CP)는 DEAE-cellulose column을 사용하여 Fig. 1을 얻었다. Crude polysaccharide(F-P-CP)는 중성분획물(Fraction No. 14~18(F-P-CP-N))을 얻었으며, 산성분획물(Fraction No. 49~55(F-P-CP-A))을 얻었다.

Gel chromatography에 의한 정제

DEAE-cellulose ion exchange chromatography에 의하여 얻은 각종 중성 및 산성분획물을 sepharose CL-6B gel filtration chromatography는 Fig. 2와 Fig. 3과 같다. Fig. 2에서 crude polysaccharide(F-CP)의 중성 분획물(F-P-CP-N)은 gel filtration chromatography를 이용하여 재정제 과정이 필요한 것을 알 수 있었다.

분자량의 확인

Ion-exchange chromatography와 gel filtration chromatography를 이용하여 정제된 분획물을 sepharose CL-6B column에 주입하여 용출부피를 Fig. 4와 같이 얻었다.

Fig. 5의 분자량 standard curve를 이용하여 정제된 polysaccharide의 분자량을 계산하였다.

Reference

1. Xing-Feng Bao, and Xue-Song Wang, Qun Dong, Ji-Nian Fang, Xiao-Yu Li, "Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*"(2002), *Phytochemistry*, 59, 175-181.

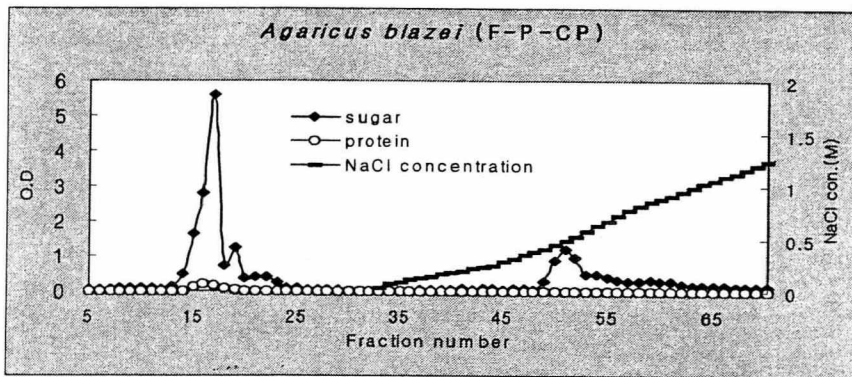


Fig. 1. Ion chromatography of precipitated polysaccharide from fruiting body on DEAE-cellulose.

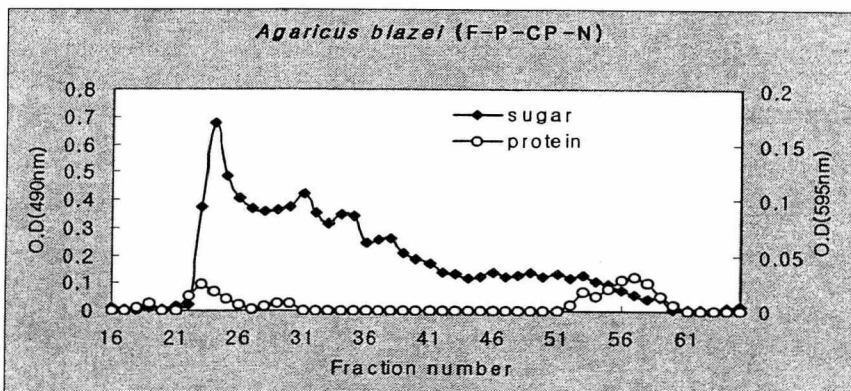


Fig. 2. Gel filtration chromatography of neutral fraction(F-P-N) of fruiting body on Sepharose CL-6B.

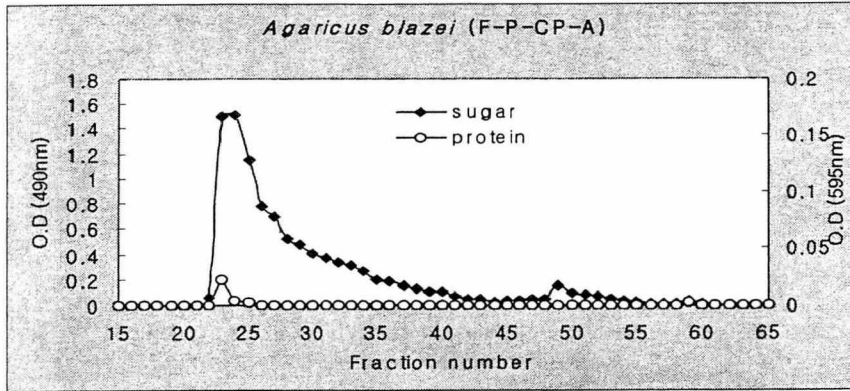


Fig. 3. Gel filtration chromatography of acidic fraction(F-P-A) of fruiting body on Sepharose CL-6B.

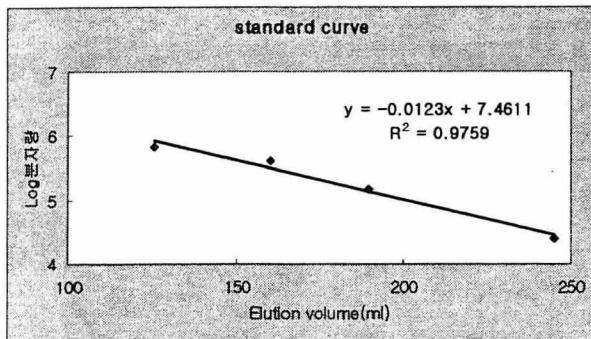


Fig. 4. The molecular weight curve of standard dextran on Sepharose CL-6B.