

Isolation, Purification and Characterization of Polysaccharides that induce *in vitro* Immuno-Stimulation of Macrophages derived from Liquid Culture of *Cordyceps militaris*

Jeong Seok Kwon, Hyo Sil An, and Eock Kee Hong

School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University

TEL (033) 250-6275, FAX (033) 243-6350

Abstract

The crude polysaccharides(C-CPF, C-CPM, C-CPB) derived from fruiting body, mycelia and mycelia free broth of *cordyceps militaris* were obtained by ethanol precipitation of hot water extracts. After a batch fermentation of *C. militaris* was carried out in a 5 L jar vessel, endo-polysaccharide and exo-polysaccharide were obtained. They were demonstrated as the hetero polysaccharides which were composed of glucose, galactose and mannose by performed with HPAEC(high pH anion exchange chromatography) and conformation of random coil by its complex forming ability with congo red reagent. They were purified by ion exchange (DEAE-cellulose) and gel filtration chromatography. They were monitored by phenol-sulfuric acid method and Bradford method. The NO induction activities of crude polysaccharides and purified polysaccharides derived from mycelia free broth were enhanced rather than LPS(lipo polysaccharide) which was used as a general NO inducer. These effects presumably contribute to the antitumor activities. The homogenities and molecular weights of polysaccharides were determined by using Sepharose CL-6B. The yield, molecular weights and NO induction activities of C-CPF Fr.III, C-CPMN Fr.III, C-CPBN Fr.II were 0.387, 0.408 and 0.153, 127 K, 210 K and 36 K, 40.79%, 88.72%, and 104.17%, respectively.

서론

동충하초는 겨울에는 곤충의 몸에 있다가 여름에는 풀처럼 나타나는 자실체로서 자낭균강의 맥각균목 동충하초과에 속하며, 전 세계적으로 100여속 750여종이 보고되었다. 예로부터 중국에서는 동충하초가 인삼, 녹용등과 함께 귀한 3대 한방 약재로 취급되어 왔으며, 결핵, 황달치료와 아편중독의 해독제로도 이용되어왔다. 대표적인 생리활성물질로는 cordycepin, polysaccharide, SOD, cordycepic acid 등이 있으며, 그러한 생리활성물질을 다량 함유하고 있는 종으로써 *cordyceps militaris*가 있다. 특히 polysaccharide는 항당뇨 및 항암작용이 우수한 것으로 보고되어지고 있고, 그것의 구조적 특징이나 이화학적 특성에 따라 항암효과 및 항당뇨 효과의 활성정도가 다름이 보고되고 있다. 지금까지는 *C. militaris*는 대부분 자실체에 국한되어 연구되어져 왔으며, 따라서 본 연구에서는 균사체의 액체배양을 통해 생산되어진 polysaccharide를 분리 정제하여 그것의 이화학적 특성과 암세포에 대한 면역세포인 macrophase의 NO생성 유도 효과를 in vitro에서 측정하여 자실체 성분과 비교하였다. 이 중 높은 면역반응 유도 물질을 screening 하였으며, 항암활성이 있는 후보 물질로써의 polysaccharide를 검토하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지조성

본 실험에 사용된 균주는 *cordyceps militaris* KCTC 6064 이었으며, 기본배지로 YMK media를 사용하였으며, 그 조성은 glucose 20g/L, yeast extract 5g/L, MgSO₄ 7H₂O 1g/L, KH₂PO₄ 2g/L 이었다.

2. 배양조건

배양은 5 L jar fermentor (Korea Fermentor Co.)에서 24 °C, 200 rpm, 1 vvm에서 배양하였으며 초기 pH는 조절하지 않았다.

3. 조 다당체 추출

배양물을 각각 6000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 균사체와 배양액을 분리한 후 배양여액에 3배 volume의 ethanol을 가하여 4 °C에서 24시간 방치후 filtering하여 소량의 증류수에 녹인 후 회전 진공식증발기를 이용하여 잔류 ethanol을 제거한 후

dialysis tubing (cut off size : 12400 dalton)에 5일간 투석한후 동결건조하여 조 다당체를 얻었으며, 균사체 및 자실체는 열수 추출하여 원심분리 후 상등액을 상기와 같은 조건으로 추출하여 조다당체를 얻었다.

4. Polysaccharide의 분리 정제

조 다당체를 증류수에 녹여 ion exchange chromatography(DEAE-cellulose, Cl⁻ form)을 행하여 중성 분획과 산성 분획으로 나눈 후 중성분획을 gelfiltration chromatography(Sepharose CL-6B)를 행하여 고분자 및 중·저분자를 분획하였다.

5. Polysaccharide의 구성당 조성 분석

구성당 분석은 다당체를 산 가수분해하여 HPAEC-PAD(Dionex Co.)를 이용하여 다음과 같은 분석 조건으로 분석하였다.

Table 1. Operation conditions and equipments of HPAEC.

Conditions	Dionex DX-500 Bio-LC [®] system
Columns	CarboPac PA10 Analytical Column 4×240 mm AminoTrap Column BorateTrap Column
Flow rate	0.9 mL/min
Oven temperature	30 °C
Injection vol.	10 µl
Eluent	A : Deionized water, 18 MΩ resistance or better, free of biological contamination B : 200 mM sodium hydroxide

6. Macrophase의 NO 생성 유도 효과 측정

Cell line은 RAW264.7을 사용하였으며, 1*10⁶ cells/mL 농도의 세포를 18시간 전배양한 후 fresh medium과 시료를 혼합하여 30분간 배양한 후 NO induction 효과를 ELISA reader를 이용하여 측정하였다. 각 실험data는 LPS처리군에 대한 polysaccharide 단독 처리군의 상대함량을 비교하여 나타내었다.

결과 및 고찰

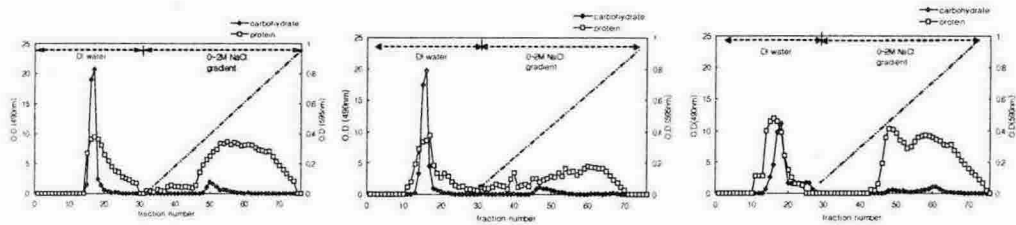


Fig 1. Ion exchange chromatogram of the crude polysaccharide derived from fruiting body, mycelia, and mycelia free broth (C-CPF, C-CPM, C-CPS)

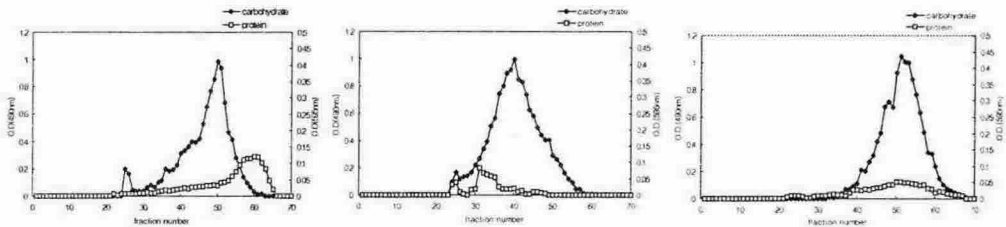


Fig 2. Gel filtration chromatogram of the neutral polysaccharide derived from fruiting body, mycelia, and mycelia free broth (C-CPFN, C-CPMN, C-CPSN)

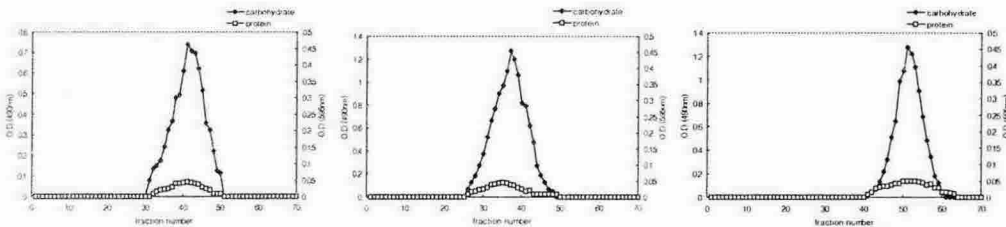


Fig 3. Gel filtration chromatogram of the polysaccharide derived from fruiting body, mycelia, and mycelia free broth (C-CPFN Fr. II, C-CPMN Fr. III, C-CPSN Fr. II)

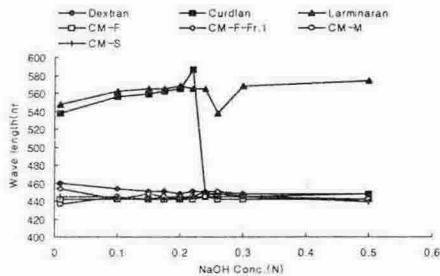


Fig 3. Changes of the maximum absorption wavelength for alkali solution of polysaccharide under congo red

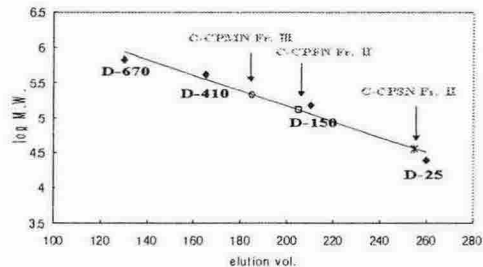


Fig 3. Molecular weights of standard dextrans and purified polysaccharides by Sepharose CL-6B gel filtration

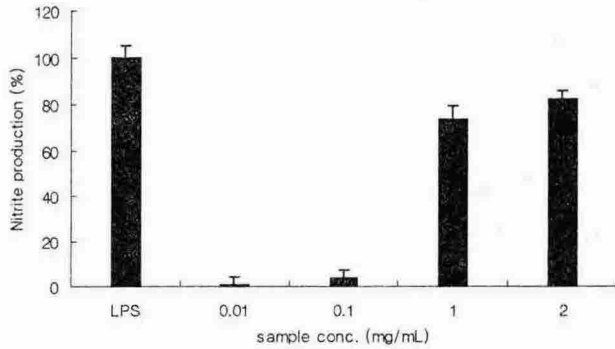


Fig 3. Nitrite production of macrophases at various concentration of polysaccharides

Table 2. Sugar compositions, nitrite-producing activities, yield of the polysaccharides fractionated based on molecular weights (D-Glc: D-glucose, D-Gal: D-galactose, D-Man: D-mannose, L-Fuc: L-fucose)

Samples	Constitutive sugars (unit, molar ratio %)				average molecular weight (kDa)	Nitrite production activity (%, mean±S.D)	Yield (g _{PF} /g _{CP})
	D-Glc	D-Gal	D-Man	L-Fuc			
C-CPF	56.06	22.61	19.17	0.37	-	66.58±7.13	1
C-CPFN Fr. II	56.40	26.40	17.20	-	127	40.79±7.61	0.167
C-CPM	50.79	24.36	23.42	-	-	90±0.51	1
C-CPMN Fr. III	9.17	18.61	72.22	-	210	88.72±0.03	0.408
C-CPS	31.03	20.46	46.67	-	-	93.58±1.23	1
C-CPSN Fr. II	6.12	28.72	65.12	-	36	104.17±1.72	0.153

*C. militaris*의 자실체, 균사체 및 배양여액 유래의 다당체의 분리 정제결과 대부분 중성분획으로 이루어진 다당체임을 알 수 있었다. 이 후 분자량 별 분획을 통해 수득되어진 흰 색의 분말을 이용하여 macrophase의 질산이온 생성여부와 구성단당의 분석, helical conformation 및 분자량을 확인 하였다. 면역세포중 하나인 macrophase의 질산이온 생성은 그것의 활성화에 기인하는데 면역반응 유도물질을screening하여 항암활성을 기대할 수 있는 면역소재로써의 가능성을 제시한다. 그 중 positive control 인 LPS보다 NO 생성이 유리한 물질로써 배양 여액 유래의 C-CPSN Fr.III 가 104%로 나타났다. 그것의 분자량은 약 36 kDa이었으며, glucose, galactose, mannose로 구성되어진 hetero-polysaccharide임을 알 수 있었다. 또한 congo red시약을 이용한 alkali 수용액에서의 최대 흡수과장대를 측정한 결과 농도별 최대흡수과장의 변화가

없는 random coil 형태의 다당체임을 확인하였으며, 다당의 homogeneity 측정 결과 균일한 다당체임을 알 수 있었다. 이 후 다른 cytokine류의 발현 여부 및 다당의 분광학적 기기를 이용한 구조분석의 면밀한 검토가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

References

1. Park, K. S., J. Y. Lee, S. H. Kim, and S. J. Lee (1992), Extraction and separation of protein bound polysaccharide produced by *Coriouis versicolor*(Fr) Quel., *Kor. J. Mycol.*, 20, 72-76.
2. Dische, Z. (1950), *J. Biol. Chem.*, 183, 489-494.