

Investigation for immune activity of isolated and purified polysaccharides extracted from *Agaricus blazei* Murill

Young Hyun Park, Doo Jin Kang, and Eock Kee Hong

School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University

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

Abstract

The Basidiomycetes fungus, *Agaricus blazei* Murill has been well known as the biologically active polysaccharides. They do not attack cancer cells directly, but produce their antitumor effects by activating various immune responses in the host. This present study was designed to investigate the immune activity of polysaccharides extracted from fruiting body, culture broth, and mycelia. In order to examine the optimum conditions of polysaccharide production, medium and C/N ratio were examined in flask culture. The fine polysaccharides were isolated and purified by DEAE cellulose and Sephadex CL-6B, respectively. Each fraction was applied to recognize NO synthesis and TNF- α for immune activity test.

1. Introduction

최근에 버섯은 기능성 음식과 생리적으로 이로운 의약성분으로 각광받고 있다. 그중 담자균류 진균류에 속하는 아가리쿠스버섯(*Agaricus blazei* Murill)은 일반 버섯에 비해 탄수화물, 단백질, 식이섬유 등이 풍부하고 비타민류로는 B1, B2, 나이신 및 비타민 D2의 전구물질인 에르고스테롤을 다량 함유하고 있다. 뿐만 아니라 각종 미네랄을 비롯하여 리놀산을 주성분으로 한 불포화지방산 및 핵산, 아미노산 등도 매우 풍부하다. 아가리쿠스버섯은 β -glucan, 단백질, 다당류 등이 복잡하게 결합되어 있다. 이러한 성분들은 혈당, 혈압 강하효과와 콜레스테롤 저하, 항종양, 암예방, 제암효과가 있다고 알려져 있다. 일반적으로 아가리쿠스 버섯 자실체에는 단백질 40~45%, 당질 38~45%, 섬유질 6~8%, 회분 5~7%, 지방질 3~4% 등이 존재한다고 알려져 있다. 본 실험에서는 polysaccharide 생산을 위한

배양조건을 조사하고, 자실체, 균사체 그리고 배양여액에서 추출한 polysaccharide를 이용하여 Ion exchange chromatography와 Gel chromatography를 거쳐 분리 정제된 polysaccharide를 가지고 NO (nitrate oxide) synthesis를 실시하였다.

2. Materials and Methods

균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 담자균류의 일종인 *Agaricus blazei* Murill이었다. 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, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L, KH_2PO_4 2g/L로 구성하였다.

배양조건

전배양에서는 냉동 보관된 10mL의 활성화된 stock을 YMK media 100ml에 접종하여 진탕배양기에서 27°C, 150rpm으로 7일간 배양하였으며, 본배양은 전배양액을 homogenizer (heidolph co., DIAX 600)를 이용하여 충분히 균질화한 후 전배양액을 10%를 접종하였다. Flask 배양은 shaking incubator (Vision Scientific Co., VS-8480SR)에서 온도 27°C, 150 rpm, 초기 pH 5.5로 조절하여 배양하였다.

Sample preparation

자실체와 균사체는 121°C에서 2시간 추출하여 원심분리 후 여액을 3배의 에탄올에 넣은 후 4°C에서 overnight시켰다. 그 중 상층부를 분리하여 소량의 증류수를 넣고 용해시켜 농축 시킨 후 동결건조 하였다. 배양여액은 원심분리 후 여액을 3배의 에탄올에 넣은 후 4°C에서 overnight시켰다. 다시 원심분리를 실시하여 상등액은 버린 후 소량의 증류수를 넣고 용해시켜 농축 시킨 후 동결건조 하였다.

Ion exchange chromatography

증류수 500 mL에 DEAE cellulose (Sigma aldrich, USA)를 넣고 교반한 후 24 시간동안 1 L 비이커에서 팽윤시켰다. Cl^- form으로 전처리된 DEAE cellulose를 glass column (2.5 X 50cm)에 충전하고 시료를 용해시킨 후, 원심분리 (3000 rpm, 15min)를 통하여 불용성 물질을 분리하여 상등액만 주입하였다.

Gel chromatography

Sepharose CL-6B (Sigma aldrich, USA)를 증류수로 수세한 후에 glass column (2.3 X 80cm)에 충전하였다. 용출 용매는 0.5N NaCl 600 mL을 흘려주었다. 농도는 각 4 mg을 0.5N NaCl 1 mL에 용해시킨 후 원심분리 (5000 rpm, 10 min)를 실시하여 불용성 물질을 제거한 후 주입하였다.

NO (nitric oxide) assay

cell line은 RAW264.7을 사용하였으며, 각각 1×10^6 cells/mL 농도의 세포를 18 시간 CO₂ incubator에서 전배양한 후 각 well 중의 세포배양액을 제거하고 새로운 배양액과 시료를 처리하여 혼합배양한 각 well에서 100 μ l의 세포배양 상층액을 취하여 동량의 Griess 시약(50 μ l of 1% sulanilamide in 5% phosphoric acid + 50 μ l of 0.1% N-naphthylethylenediamine in H₂O)을 넣고 실온에서 30분간 반응시킨 후 ELISA 측정기로 측정하였다.

Results and Discussion

GY배지보다는 YMK배지에서 8일째 균체량 8.6g/L와 다당체 1.38g/L로 생산되었다. C/N ratio 확인 결과, glucose 60g/L와 Yeast extract 15g/L에서 가장 높은 균체량과 다당체 생산량을 보여주었다. 분리 정제된 시료를 가지고 NO 생산량을 검토한 결과 자실체, 배양여액, 균사체 crude polysaccharide에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 그 다음으로 각 그룹의 산성분획에서 높은 NO 생산량을 나타내었다.

References

1. Takaku, T., Y, Kimura, and H, Okuda, Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* murill and Its Mechanism of Action(2001), *J. Nutr.*, 131, 1409-1413.
2. Hong, J. H., S. Y. Kwang, and Y. H. Choi, Characteristics of Crude Protein-bound Polysaccharide from *Agaricus blazei* murill by Extraction and Precipitation conditions and Its Antitumor Effect(2004), *Korean J. Food Sci. Technol.*, 36(4), 586-593.
3. Wasser, S.P., Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides(2002), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 258-274.

4. Adachi, Y., N. N. Miura, N. Ohno, H. Tamura, S. Tanaka, and T. Yadomae, Enzyme immunoassay system for estimation the ultrastructure of (1,6)-branched (1,3)- β -glucans(1999), *Carbohydrate Polymers*, 39, 225-229.

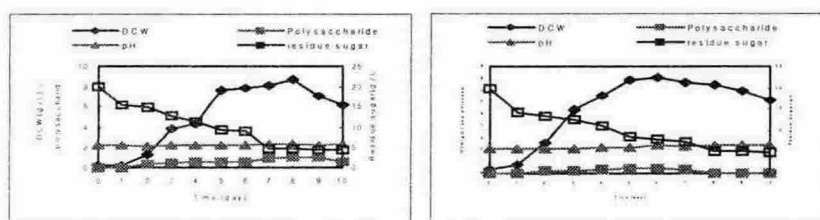


Figure 1. Profiles of cell growth, pH, residue sugar and polysaccharides in YMK medium and GY medium.

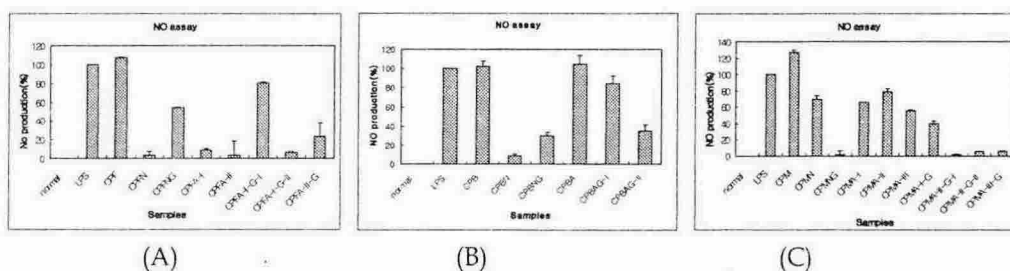


Figure 2. The effects of separated and purified polysaccharides from fruiting body(A), culture broth(B), and mycelia(C) on NO synthesis in murine macrophage cell.

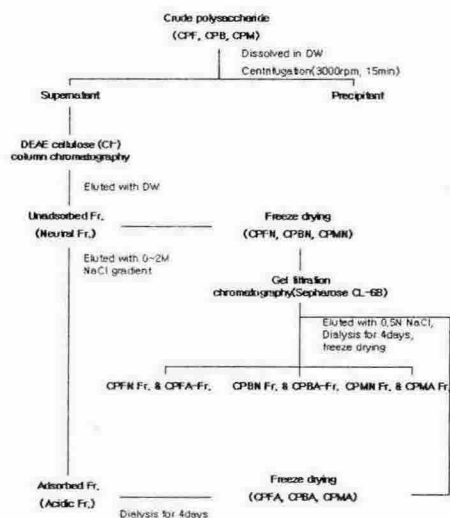


Figure 3 Procedure isolated neutral and acidic fraction of crude polysaccharide by DEAE cellulose ion exchange column chromatography

Table 1. Sepharose CL-6B elution volume and corresponding average molecular weight of purified polysaccharides extracted from fruiting body, culture broth, and mycelia

Fraction	Elution volume (mL)	Average MW (kDa)
CPFNG	130	840
CPFA-I-G-I	125	960
CPFA-I-G-II	265	27
CPFA-II-G	270	24
CPBNG	250	40
CPBAG-I	210	110
CPBAG-II	245	46
CPMNG	260	31
CPMA-I-G	250	40
CPMA-II-G-I	135	740
CPMA-II-G-II	280	19
CPMA-III-G	280	19