

표고버섯 배양액으로부터 단백다당류의 추출 및 정제 방법

박 경 숙 · 이 별 나
대구공업전문대학 식품영양과

Extraction and Separation of Protein-bound Polysaccharide by *Lentinus edodes*

Kyung-Sook Park and Byul-La Lee

Dept. of Food and Nutrition, Taegu Technical Junior College,
831-Bondong, Taegu, Korea

Abstract

The extraction and separation methods of protein-bound polysaccharides from the mycelium and culture broth of *L. edodes* were investigated. The use of 2% solution of surface active agent, Triton X-100 was effective for extraction of the protein-bound polysaccharide from the mycelium. The extraction of the protein-bound polysaccharides from mycelium with hot water was achieved by 4 hours extraction at 100°C. For the separation and partial purification of the protein bound polysaccharides the column chromatography using DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex and Sephadex proved to be effective.

Key words : *Lentinus edodes*, protein-bound polysaccharide, mycelium, DEAE-Sephadex, DEAE-cellulose.

서 론

표고버섯(*Lentinus edodes*(Berk) Sing)은 분류학상 송이과(Tricholomataceae)에 속하여 원목조직에서 cellulose, lignin, sugar, protein 등을 섭취하여 생육하는 대표적인 식용버섯으로 지방, 단백질, 각종 비타민, 무기질 및 회분을 함유하고 있어서 오래전부터 식품뿐만 아니라 약용으로도 널리 이용되어 왔다. 자실체의 갓, 주름, 색깔 등은 생육조건에 따라 다르고 이에 함유된 유용물질로서 hypocholesterol성 물질인 lentinacin(eritadenine)과 항암성 물질인 lentinan이 있고 polyene계의 항균작용이 있는 물질도 발견되었으며 항virus 작용이 있는 방향성 물질도 함유되어 있다¹⁻²⁾.

담자균류인 버섯에서 독성과 부작용이 적은 항암물질을 찾으려는 연구가 널리 진행되고 있으며, 자실체나 균사 배양물에 대한 항암실험이 시행되어 다당류 또는 단백질 다당류가 우수한 항암효과를 나타내는 것으로 확인되었다^{3,4,5)}. 따라서 버섯의 유효성분중 항암효과를 지니는 단백질 다당류에 관한 특성을 규명하고자 하는 실험이

활발히 진행되고 있다⁶⁻¹¹⁾.

이 연구를 위해서 우선 배양 균사체에서 단백질 다당류의 분리가 필수적이며 균사배양액을 열수로 처리한 다음 ethanol로 침전시키는 방법이 주로 이용되고 있다. 이 과정에서 얻어진 단백질 다당류에는 비항암적인 단백질 및 당류 성분들도 포함될 것으로 추측된다. 단백질 다당류의 특성과 생리적 활성을 조사하기 위해서는 가능한 순수한 상태로 이 성분이 분리되어야 한다.

본 연구의 목적은 표고버섯 균사 배양체로부터 항암 성분인 단백질 다당류를 보다 순수하게 분리 정제하는 방법을 개발하는 것과 지금까지 사용된 열수를 이용한 추출방법 외에 계면활성제용액에 의한 추출방법을 서로 비교하고 당분석에 의한 정량방법을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

1. 균 주

본 연구에 사용된 균주는 *Lentinus edodes*(산조 1호)로써 본 연구실에서 보관중인 균주를 사용하였다.

2. 배 지

균의 보존용 배지는 조성이 malt extract 1.0%, yeast extract 0.4%, glucose 0.4%, agar 1.5%인 MYG(Yanagi 등, 1984)¹¹⁾를 사용하였고, 액체 진탕 배양용 배지는 표고버섯이 가장 잘 자라는 것으로 보고 된 L.E.M(Park 등, 1991)¹²⁾을 사용하였다.

3. 균배양방법

L.E.M 액체 배지에서 40일간 배양된 균사체를 Homogenizer(Nisselan-11)로 1분간(3,000rpm) 삼각 플라스크에 15ml씩 집중하여 28±1℃에서 80 strokes /min으로 7일간 진탕 배양하였다.

4. 균사체로부터 단백 다당류 시료 조제

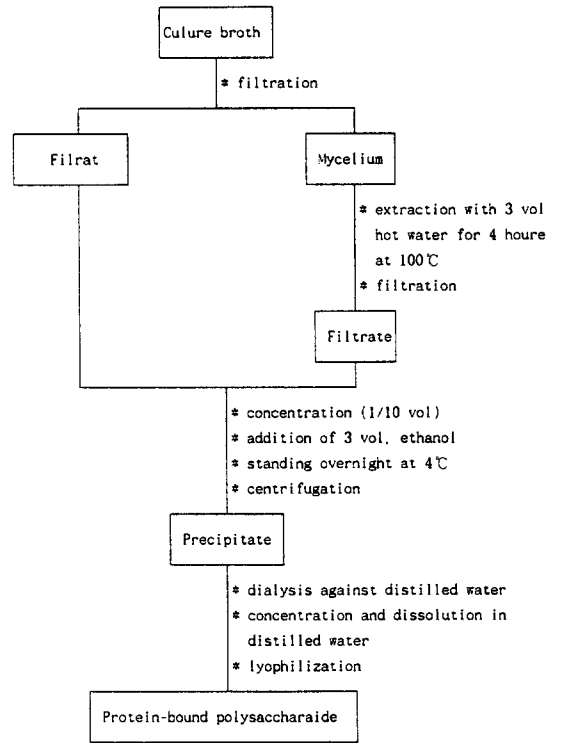
배양액을 여과하여 여과액과 균사체를 분리한 다음 일정량의 균사체에 3배량의 뜨거운 물을 가하여 100℃에서 4시간 동안 추출한 후 다시 여과하였다. 잔사를 제거한 여과액과 배양액의 여과액을 모아 감압 농축기로 1/10로 농축한 후 3배량의 ethanol을 가하여 4℃에서 하룻밤 방치하였다. 생성된 침전물을 15,000rpm에서 30분간 원심분리로 수거한 뒤 이를 소량의 증류수에 녹이고 24시간 동안 증류수로 투석한 다음 동결건조하여 단백 다당류를 얻었으며 이를 column chromatography에 의하여 정제하였다(Scheme 1).

5. 계면활성제 용액에 의한 단백 다당류 추출

균사 배양액의 여과로 얻어진 균사체의 일정량에 대해서 계면활성제 Triton X-100의 1%, 2%, 3% 농도별 추출, Triton X-100 용액과 4N NaCl이 포함된 2%(w/v) Triton X-100 용액을 3배량씩 가한 다음 실온에서 4시간 동안 교반시키면서 추출하였다. 추출액으로부터 동결건조된 단백 다당류를 얻는 과정과 동일한 방법으로 실시하였다.

6. Chromatography

Chromatography를 이용한 단백 다당류의 정제는 alumina, DEAE-cellulose 및 DEAE-sephadex를 충전제로 하여 실시하였다. 먼저 chromatography용 alumina를 증류수에 반죽하여 2×60cm인 column에 충전시키고 준비된 시료를 주입하였다. 증류수를 전개 용매로 시료를 전개시켰고 용출액은 10ml씩 시험관에 분취하였다. DEAE-cellulose와 DEAE-sephadex는 Cooper(1977)¹³⁾의 방법으로 처리하였다. 즉, 0.2N HCl로 처리한 후 0.2N NaOH로 처리하고, 증류수를



Scheme 1. Extraction and fractionation of the protein-bound polysaccharide from the culture broth of *L. edodes*.

이용하여 중성이 되도록 반복해서 세척하였다.

이어서 수지의 기포를 제거한 다음 DEAE-cellulose는 2×50cm column에, DEAE-sephadex는 2×45cm column에 충전시키고 준비된 시료를 주입시켰다. 시료의 전개는 증류수로 하였으며 전개된 용출액을 10ml씩 분취하였다. 280nm에서의 흡광도를 측정하여 단백질 용출을 확인한 다음 이들 단백질 peak에 대하여 anthrone test를 실시한 후 625nm에서의 흡광도를 측정함으로써 단백 다당류를 확인하였다.

7. 당 분석

다당류의 정량분석은 Cho(1988)⁸⁾ 등과 Carney(1986)¹⁴⁾의 방법에 준해 실시하였다. Anthrone 시약 200mg을 absolute ethyl alcohol 5ml에 용해한 후 75% H₂SO₄를 가해 100ml로 한 다음 glucose 표준용액에 대한 정색반응을 하였다. 반응 후 625nm에서 흡광도를 측정하여 glucose 농도에 따른 표준곡선을 만들었

으며 이를 기준으로 시료중 당의 함량을 정량하였다.

8. 열수의 시간별, 온도별 추출

균사 배양액을 여과하여 얻어진 균사체의 일정량을 시간별(4시간, 6시간), 온도별(70℃, 100℃)로 열수 추출한 후 동결건조하여 얻은 단백 다당류의 수율을 비교하였다.

결과 및 고찰

지금까지 버섯류의 단백 다당류 추출을 열수 추출이 주로 실시되었다. 생체 조직에서 단백 다당류 추출할 때 많이 사용되는 비이온성 계면 활성제인 Triton X-100 (Faltz, 1979¹⁵; Kjellen, 1980¹⁶)을 사용하여 1%, 2% 4% 농도로 첨가한 추출액으로 추출하였을 때의 추출효율을 비교하였다(Table 1).

Table 1. Yield of protein-bound polysaccharide from cultured broth of *L. edodes* according to the concentration of Triton X-100

Conc. of Triton X-100	Yield
1% Triton X-100	1.95±0.06
2% Triton X-100	3.04±0.56
4% Triton X-100	3.55±0.28

* : The mycelium was cultured at 28℃ for 40 days in shaking incubater.

Coriolus versicolor(Fr) Quel에서 Park 등 (1992)¹¹이 발표한 것과 비교해 보았을 때, Triton X-100 2% 첨가한 추출액에서 *Coriolus versicolor*와 같이 추출효율이 높았다. 열수추출 후 ethanol 침전으로 얻어진 단백 다당류의 함량을 비교한 결과 (Table 2) 열수 추출보다 2% Triton X-100에 의한 추출이 더 효과적인 것으로 나타났다. 그러나 전해질을 포함한 계면 활성제 용액이 효과적이라는 Older 등 (1979)¹⁷의 발표와는 달리

Table 2. Yield of protein-bound polysaccharide from cultured broth of *L. edodes* according to the extractions

Extractions	Yield(mg /100g mycelium)
Hot water	1.75±0.06
2% Triton X-100	3.02±0.64
2% Triton X-100 containing 4N NaCl	not obtained

* : Mycelium was cultured at 28℃ for 40 days in shaking incubater.

Triton X-100 용액 NaCl 4N 농도가 되도록 첨가한 용액으로 추출하였을 경우에는 ethanol에 의한 침전이 거의 일어나지 않았는데 이는 4N NaCl용액이 단백질의 염용(salting in)효과를 나타내는 것으로 생각된다.

다른 종류의 계면 활성제 및 전해질이 추출에 미치는 영향을 확인해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

일반적으로 균사 배양액의 여과로부터 얻어진 균사체의 열수추출에 있어서 시간별 온도별로 나누어 추출한 후 동결건조하여 얻은 단백 다당류를 비교한 결과는 (Table 3) 4시간 추출이 효과적인 것으로 나타나 4시간 이상 추출은 단백 다당류 수율에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Table 3. Yield of protein-bound polysaccharide from cultured broth of *L. edodes* according to extraction time

Extraction time	Yield(mg /100g mycelium)
2 hours	0.89±0.08
4 hours	1.74±0.12
6 hours	1.76±0.04

* : Mycelium was cultured at 28℃ for 40 days in shaking incubater.

온도별 추출 효과(Table 4)에 있어서는 일반적으로 사용되어지는 100℃에서의 열수 추출이 70℃에서 추출보다 효과적이었다.

Table 4. Yield of protein-bound polysaccharide from cultured broth of *L. edodes* according to extraction temperature

Extraction temp.	Yield(mg /100g mycelium)
70 ℃	1.40±0.01
100 ℃	1.75±0.02

* : Mycelium was cultured at 28℃ for 40 days in shaking incubater.

Park 등 (1989)⁹에 의하면 균사 배양액을 농축한 다음 ethanol 첨가로 얻어진 침전물이 항암효과를 나타내는 단백 다당류로 일반적으로 인정되고 있으나 ethanol 침전물에는 일반 단백질 함유 가능성을 배제할 수 없으므로 chromatography에 의한 정제과정이 필요하다고 생각된다.

*L. edodes*에서 얻은 동결건조된 조단백 다당류에 대하여 alumina를 충전제로 한 colum chromatography를 실시하였을 때에 (Fig. 1) 13~16번 분획에서, DE-AE-cellulose를 이용한 chromatography (Fig. 2)에서는 9~10번 분획에서, DEAE-sephadex에 의한 chr-

omatography (Fig. 3)는 11~12번 분획에서 그리고 sephadex(G-100)에 의한 chromatography (Fig. 4)는 10번 분획에서 각각 최고의 anthrone 정색반응을 나타내는 단백 다당류 용출을 확인하였다.

Alumina와 sephadex를 충전제로 한 gel filtration은 DEAE-cellulose와 DEAE-sephadex를 충전제로 한 ion exchange chromatography에서는 단백 다당류 용출 양상이 달랐다.

각각의 전개과정에서 가장 높은 anthrone 정색반응

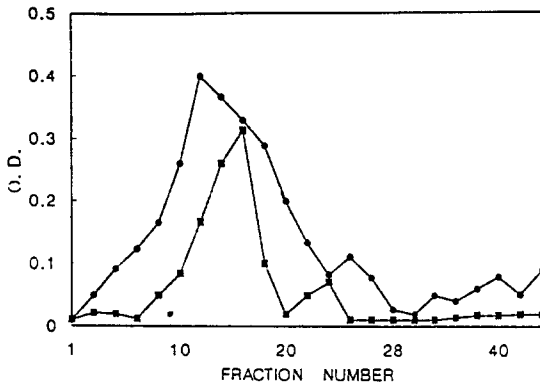


Fig. 1. Column chromatogram from the culture of *Lentinus edodes* on alumina.

Column : 2×60cm
 Flow rate : 0.73ml /min
 Solvent : H₂O
 ●-----● : O. D. at 280nm for protein elution
 ■-----■ : O. D. at 625nm for glucan elution

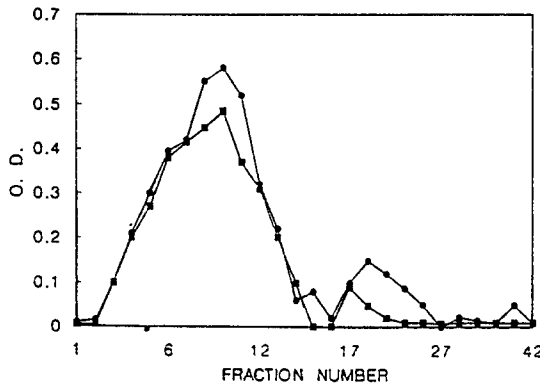


Fig. 2. Column chromatogram from the culture of *Lentinus edodes* on DEAE-cellulose.

Column : 2×50cm
 Flow rate : 1.31ml /min
 Solvent : H₂O
 ●-----● : O. D. at 280nm for protein elution
 ■-----■ : O. D. at 625nm for glucan elution

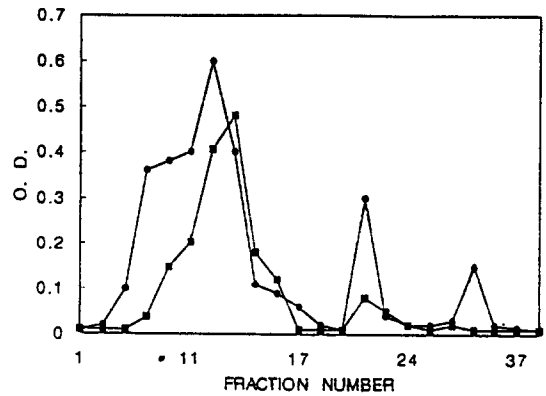


Fig. 3. Column chromatogram from the culture of *Lentinus edodes* on DEAE-Sephadex.

Column : 2×45cm
 Flow rate : 1.45ml /min
 Solvent : H₂O
 ●-----● : O. D. at 280nm for protein elution
 ■-----■ : O. D. at 625nm for glucan elution

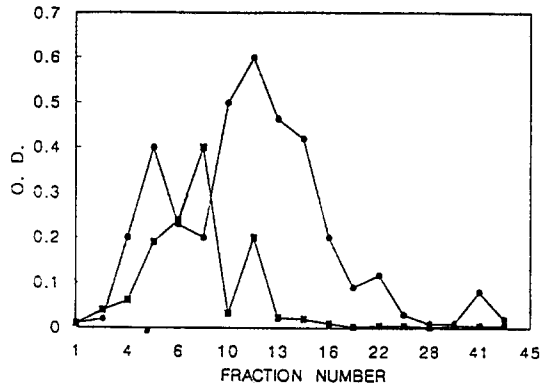


Fig. 4. Column chromatogram from the culture of *Lentinus edodes* on Sephadex(G-100).

Column : 2×60cm
 Flow rate : 1.23ml /min
 Solvent : H₂O
 ●-----● : O. D. at 280nm for protein elution
 ■-----■ : O. D. at 625nm for glucan elution

을 보인 각 분획에 대한 당 함량은 glucose를 표준당으로 하여 작성된 검량선을 기준으로 하여 (Table 5)에 정리한 결과 alumina를 통해 전개했을 경우보다 DEAE-sephadex, DEAE cellulose 및 sephadex에서 단백 다당류의 수율이 높았다.

균사체 추출액만을 침전, 동결건조시켜 얻은 조단백 다당류에 함유된 단백 다당류의 수율은 배양액과 균사체 추출액을 합하여 얻은 조단백 다당류에 함유된 단백 다당류의 수율에 비하여 현저히 낮았다 (Table 6).

Table 5. Yield of protein-bound polysaccharide from cultured broth of *L. edodes* in column chromatography

Pack material	Yield(mg /ml)
Alumina	0.085
DEAE-cellulose	0.21
DEAE-Sephadex	0.22
Sephadex(G-100)	0.16

Table 6. Yield of protein-bound polysaccharide from cultured broth of *L. edodes* in column chromatography

Pack material	Yield(mg /ml)
Alumina	0.079
DEAE-cellulose	0.12
DEAE-Sephadex	0.16
Sephadex(G-100)	0.10

이상의 결과로 보아 균사체만을 단백질 다당류 회수에 이용하고 있는 Fujii 등⁶⁾이 배양액을 사용하지 않음으로 해서 중요한 단백질 다당류 자원을 폐기하고 있음을 알 수 있다.

요 약

*L. edodes*의 배양액 및 균사체로부터 항암작용이 있는 단백질 다당류의 추출 및 정제방법에 관한 실험을 실시하였다.

단백다당류 추출에서 비이온성 계면 활성제인 2% Triton X-100 용액으로 추출할 경우 상온에서 추출하여도 통상의 100℃ 열수 추출을 통해 얻을 수 있는 것보다 수율이 높았다.

그러나 계면활성제 용액에 4N NaCl을 첨가하여 추출하면 ethanol 침전과정에서 단백질다당류의 침전물을 얻을 수 없었다.

열수 추출에 있어서 추출 온도는 100℃가 효과적이고 추출 시간은 4시간 정도면 충분하였다.

열수 추출 결과 ethanol 침전 및 동결건조를 통하여 얻어진 조단백 다당류의 정제 실험에서는 alumina를 충전제로 하는 gel filtration보다 sephadex에 의한 gel filtration 또는 DEAE-cellulose, DEAE-sephadex를 이용한 ion exchange chromatography가 보다 효과적이었다.

참고문헌

1. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.*, **30**, 2776~2781 (1970).
2. Maeda, Y. and Chihara, G. Lentinan : A new immunaccelerator of cell-mediated responses. *Nature*, **229**, 634 (1971).
3. Yoshioka, Y., Sano, T. and Ikekawa, T. : Studies on antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr) Sing, I *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 1772~1776 (1973).
4. Fukuda, K., Uematsu, T., Hamada, A., Akiya, S., Komatsu, N. Okubo, S. : The polysaccharide from *Lampteromyces japonicus*, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1955~1959 (1975).
5. Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. : Protein bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use, *Gann*, **65**, 557~558 (1974).
6. Hirase, S., Nakai, S., Akatsu, T., Kobayashi, A., Oohara, M., Matsunaga, K., Fujii, M., Kodaira, S., Fujii, T., Furusho, T., Ohmura, Y., Wada, T., Yoshikumi, C., Ueno, S. and Ohmura, S. : Structural studies on the antitumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor*(Basidiomycetes). I. Fractionation with barium hydroxide, *Yakugaku Zasshi*, **96**, 413~418 (1976a).
7. Hirase, S., Nakai, S., Akatsu, T., Kobayashi, A., Oohara, M., Matsunaga, K., Fujii, M., Kodaira, S., Fujii, T., Furusho, T., Ohmura, Y., Wada, T., Yoshikumi, C., Ueno, S. and Ohtsuka, S. : Structural studies on the antitumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor*(Basidiomycetes). II. Structures of β -D-glucan moieties of fractionated polysaccharides, *Yakugaku Zasshi*, **96**, 419~424 (1976b).
8. Cho, H. J., Shim, M. J., Choi, E. C., Kim, B. K. : Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea(L VII). Comparison of Various Antitumor Constituents of Comparison of Various Antitumor Constituents of *Corilus versicolor*, *Korean J. Mycol.*, **16**, 1622~174 (1988).
9. Park, Y. D., Hong, Y. K., Whang, W. K., Huh, J. D., Park, S. : Comparisons of Protein-bound Polysaccharide Contents Obtained from Mycelial Cultured Broth and Fruit Body of *Coriolus versicolor*, *Korean J. Mycol.*, **17**, 112~228 (1989).
10. Park, K. S., Lee, J. Y., Lee, S. J., Kim, S. H., Lee, J. S. : Extraction and Separation of Protein of Protein-bound polysaccharide Produced by *Coriolus versicolor*(Fr) Quel, *Korean J. Mycol.*, **20**, 72~76 (1992).
11. Yanagi, S. O., Takebe, I. : An efficient method for the isolation of mycelial protoplasts from *Coprinus macrorrhizus* other basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 58~60 (1984).
12. Park, K. S., Lee, J. S. : Optimization of Media Composition and Culture Condition for the Mycelial of *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes*, *Korean J. Biotechnol. Biotechnol. Bioeng.*, **6**, 91~98 (1991).
13. Cooper, T. G. : In *The Tools of Biochemistry*. A Wiley Interscience Publication N. Y., London, p. 136~168

- (1977).
14. Carney, S. L., Chaplin, M. F., Kennedy, J. F., eds. : *Carbohydrate analysis, a practical approach*. IRL Press, Oxford and Washington DC. p. 135 (1986).
 15. Faltz, L. L., Reddi, A. H., Hascall, G. K., Martin, D., Pita, J. C., Hascall, V. C. : Characteristics of Proteoglycans Extracted from the Swarm Rat Chondrosarcoma with Associative Solvents, *J. Biol. Chem.*, **254**, 1375~1380 (1979)
 16. Kjellen, L., Oldberg, A. and Hook, M. : Cell-surface Heparan Sulfate : Mechanisms of proteoglycan-cell association. *J. Biol. Chem.*, **255**, 10407~10413 (1980).
 17. Oldberg, A., Kjellen, L., Hook, M. : Cell-Surface Heparan Sulfate: Isolation and Characterization of A proteoglycan from rat liver membranes. *J. Biol. Chem.* **254**, 8505~8510 (1979).
 18. Roland, J. F., Chemielewicz, Z. F., Wenine, B.A., Gross, A. M., Boening, O. P., Lucas, E. H., Byerum, R. U., Stevens, J. A. Calvacin : A new antitumor agent, *Science*, **23**, (1897).
-
- (1997년 10월 14일 접수)