

말굽버섯 자실체에서 분리한 항보체 활성 다당체의 화학적 분석

박정근¹, 박계원², 신광순³, 이창묵¹, 석순자⁴, 김정봉⁵, 구본성¹, 한범수¹, 윤상홍^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부

²성균관대학교 식품생명공학과

³경기대학교 식품생물공학과

⁴농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

⁵농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부

Received : November 1, 2012 / Revised : February 7, 2013 / Accepted : February 8, 2013

Isolation and Chemical Analysis of Potent Anti-Complementary Polysaccharides from Fruiting Bodies of the *Fomes fomentarius*. Park, Jung-Keun¹, Kwe-Won Park², Kwang-Soon Shin³, Chang-Muk Lee¹, Soon-Ja Seok⁴, Jeong-Bong Kim⁵, Bon-Sung Koo¹, Bum-Soo Han¹, and Sang-Hong Yoon^{1*}. ¹Agricultural Biotechnology Department, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea, ²Department of Food Science & Biotechnology, Sunckyunkwon University, Suwon 440-746, Korea, ³Department of Food Science & Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea, ⁴Agricultural Biology Department, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea, ⁵Agro-food Department, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

The five anti-complementary polysaccharides (MFKF-NP, MFKF-AP1 α , β , and MFKF-AP2 α , β) were separated from hot water extracts of fruiting bodies of *Fomes fomentarius* by two subsequent column chromatography using DEAE-sepharose FF and Concanavalin A-sepharose 4B. The order of anti-complementary activity was MFKF-AP1 β > MFKF-AP1 α > MFKF-AP2 α > MFKF-AP2 β > MFKF-NP > Polysaccharide Krestine (PSK). Especially, MFKF-AP1 β among those showed the most excellent anti-complementary activity (70% of ITCH₅₀ value at 20 μ g/ml). The monosaccharide composition analysis by gas chromatography indicates that MFKF-AP1 α and β are a kind of homoxylan consisted mainly of xylose above 97%. Molecular weight of MFKF-AP1 β , major anti-complementary polysaccharide, was estimated to be about 12,000 by high performance liquid chromatography (HPLC). After the incubation of the serum with MFKF-AP1 β in the presence or absence of Mg⁺⁺ and Ca⁺⁺ ions, its anti-complementary activity was investigated. This result indicated that MFKF-AP1 β seems to be activator both on the classical and the alternative pathway of complement activation.

Keywords: *Fomes fomentarius*, anti-complementary activity, homoxylan

서 론

인체의 혈장 내에 존재하는 보체단백질로 구성된 보체계 (complement system)는 침입한 항원에 MAC (membrane attack complex)를 형성하여 직접적으로 이를 분해하는 일 (complement mediated lysis), 침입세균이 보다 쉽게 숙주의 면역세포에 의한 제거되도록 만드는 일 (opsonization), 염증 반응 촉진, 및 항원-항체 복합체가 제거되도록 하여 외부의 감염방어 등에 작용할 뿐만 아니라, 면역시스템 증진에도 관

련하고 있다고 알려져 있다[29].

보체계를 활성화하는 천연물은 주로 저 분자물질 보다 고 분자 물질에(주로 다당체나 단백질다당체) 존재한다. 과거 에너지원으로써의 기능만 부각되어 온 탄수화물, 그 중에서도 천연물 유래의 항보체 활성 다당체는 생체 내 대식세포 등의 면역세포들을 자극하여 임파구의 증식 및 활성화에 필요한 cytokine의 분비를 유도하여 암 치료에 도움이 될 수 있거나 생체의 면역 부진 상태를 개선 치료하는 면역 요법제로 개발되어 질병의 예방과 치료에 효과적으로 이용될 수 있는 가능성이 보고되고 있다[27, 35, 42]. 특히 버섯에서 유래한 항암 다당체들의 일부가 항보체 활성과 연관된다는 흥미 있는 연구들이 과거에 보고된 바 있다[19, 23]. 따라서 최근 식품 및 약용으로 사용되는 버섯의 건강향진 효능에 관하여

*Corresponding author

Tel: +82-31-299-1691 Fax: +82-31-299-1672

E-mail: shyo556@rda.go.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

일반인들의 관심이 점차 높아지고 있다.

현재 버섯으로부터 다당체를 분리하여 생체 반응 조절제 (biological response modifier)로 의약품 내지는 기능성 식품으로 이용하는 상업적 성공사례[26, 34]에 힘입어 이 분야에 많은 연구가 진행되고 있다. 이들 중 비교적 상세한 연구가 진행된 부분은, 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 lentinan [26, 30] 운지버섯(*Coriolus versicolor*)의 krestin [34], 치마버섯(*Schizophyllum commune*) [32], 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) [19], 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*) [16, 17], 양송이버섯(*Agaricus bisporus*) [39], 잎새버섯(*Grifola frondosa*) [5, 31], 장수버섯(*Formitella fraxinea*) [40] 등으로부터 항보체 활성 및 항암 활성 다당체들이 계속 보고되고 있다. 이들은 대부분 오래 전부터 식품이나 약용으로 널리 사용되어왔던 재료로서 인체에 대한 안전성이 확보된 물질들이라 할 수 있다.

버섯 중 가장 오래된 것으로 알려진 말굽버섯(*Fomes fomentarius*)은 기원전 8,000년 중석기시대의 유적에서 발굴된 바 있다. 북반구 온대 이북에 널리 분포하는 것으로 알려진 말굽버섯은 구멍 장이 버섯 과(*Polyporaceae*) 말굽버섯속(*Fomes*)에 속하는 버섯으로 활엽수의 고목 또는 생목(生木)에 발생하여 여러 해 동안 자란다. 민간에서는 항중양, 항그람양성균, 항산화, 해열, 이노 및 항당뇨 등의 효능이 알려져 있으며, 중국의 [중약대사전], [중국본초도록] 등에서는 화균지(樺菌芝)라 하며, 식도암, 위암, 자궁암 등에 사용한다는 기록이 있다. 그러나 최근에 이의 주 약리성 물질에 대한 연구를 미국, 일본의 일부 연구진이 활발히 진행시켜 혈관성 치매 예방 및 치료효과, 항당뇨, 항암 효과 등 다양한 약리성이 보고된 바 있다[3, 4, 11, 12, 18, 24]. 그러나 이 버섯 자실체의 다당체에 대한 체계적인 약리적 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 말굽버섯 자실체에서 분리한 수용성 다당체로부터 인체 혈장내 보체계를 강력히 활성화시키는 다당체를 정제하고 이들의 화학적 특성을 분석함으로써 말굽버섯에서 유래한 다당체를 기능성 식품소재로 개발하기 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

강원도 오대산에서 채집한 말굽버섯의 자실체를 본 연구의 공시재료로 사용했다. 다당체의 분리와 정제에 사용된 DEAE-Sepharose FF (Cl⁻ form)와 Concanavalin A-sepharose 4B는 미국 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA), 투석시 사용된 투석막 (MW cut-off 6,000)은 Spectrum medical industries 사 (Houston, Texas, USA), 분자량 측정에 사용된 표준물질 pullulan series (P-800, 400, 200, 100, 50, 20,

10 및 5)는 일본 Showa Denko사(Tokyo, Japan)로부터 구입하여 사용하였다.

PSK (polysaccharide-K from *Coriolus versicolor*)는 한국 광동제약(Seoul, Korea)에서 시판하는 코포랑[®]으로부터 가용획분을 정제하여 사용하였다. 한편, 항보체 활성에서 사용된 양의 감작적혈구(IgM-hemolysis sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본의 Biotest 사(Tokyo, Japan) 제품을, 교차 면역 전기영동에 사용된 anti-human C3는 Sigma사의 제품을 사용하였다. 그 외 본 실험에서 사용된 모든 시약은 시판 1급 이상의 분석용 제품이 사용되었다.

정량방법

총 당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법으로[6], 산성당 함량은 β -D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl법으로[1], 단백질 함량은 bovine albumin을 표준물질로 하여 Bradford법으로 각각 정량 분석하였다[2].

다당체의 추출, 분리, 정제

말굽버섯의 자실체는 물로 깨끗이 세척하고 풍건 한 뒤 작게 절편하였다. 절편조각 500 g에 5 L의 80% ethanol을 처리하여 상온에서 하루 동안 침지한 뒤 ethanol 용해성 물질을 버린 후 물로 세척하였다. 여기에 10 L의 물을 가해 100°C에서 3시간 이상 열을 가해 추출한 액을 Whatman No.4 여과지로 여과하여 이 액에 2.5배 (v/v) 부피의 100% ethanol을 가하고 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 다음날 원심분리기 (6000 rpm, 20 min, 4°C)를 이용하여 침전물을 회수하고, 이를 증류수에 용해시킨 후 투석 막(MW cut-off 6,000, Spectrum)을 이용하여 3일간 투석을 행하여 저 분자 물질을 제거한 후 동결건조한 수용성 조다당체인 MFKF를 얻었다. 이로부터 다당체의 분리와 정제는 DEAE-sepharose FF (Cl⁻ form, ϕ 5×50 cm) column과 Concanavalin A-sepharose 4B column (ϕ 1.5×15 cm)을 차례로 사용해 Fig. 1에 도시된 과정에 의해 수행하였다.

각 칼럼에서 해당 용출액으로 용출된 분획은 fraction collector (Model 2110, Bio-Rad사, USA)로 5 ml씩 시험관에 받아서 각 분획의 총 당, 우론산, 단백질 함량을 측정하여 해당성분의 peak 프로파일을 작성하였다. 또한, 다당체에 해당되는 각 분획들은 모아서 투석 및 동결건조를 행하여 이후의 분석 실험에 사용하였다

항보체 활성 측정

항보체 활성은 Meyer법[14]을 이용하여 시료에 의한 보체 소비(complement consumption) 후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test 방

법으로 측정하였다. 여러 농도로 증류수에 용해시킨 50 μ l 다당체 용액을 정상인의 혈청과 GVB⁺⁺ 완충액 (gelatin veronal buffer pH 7.4, 0.1% gelatin, 0.15 mM Ca⁺⁺, 0.5 mM Mg⁺⁺ 함유) 각각 50 μ l씩 혼합하여 37°C에서 30분간 1차 반응시켰다. 동 반응액에 GVB⁺⁺ 350 μ l를 가하고, 이를 10-160배까지 연속 희석시킨 후, 750 μ l의 GVB⁺⁺와 양의 감각적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocyte, EA cell, 1×10^8 cells/ml) 250 μ l를 가하여 37°C에서 60분간 2차 반응 시키고, 사전 냉각된 인산완충액(phosphate buffered saline, pH 7.4)을 각 시험관에 2.5 ml씩 가하고 4°C, 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 용혈활성을 측정하였다. 처리구의 항보체 활성(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH₅₀, %)은 아래의 식에 의거하여 정상인의 혈청(NHS)과 GVB⁺⁺, 시료대신 증류수만을 반응시킨 대조구의 총 보체용혈(50% of total complement hemolysis, TCH₅₀, %)에 대한 저지율로 표시하였다. 양성대조군으로는 운지버섯 유래 면역증강제인 krestine (PSK)을 사용하여 비교하였다[34].

$$\text{ITCH}_{50} (\%) = \frac{\text{TCH}_{50} \text{ of control} / \text{TCH}_{50} \text{ of sample}}{\text{TCH}_{50} \text{ of control}} \times 100$$

보체계 활성화 경로 검토

보체계의 활성 경로를 확인하기 위해 Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺ 이온이 모두 포함된 GVB⁺⁺ buffer, Ca⁺⁺이온이 선택적으로 제거된 Mg⁺⁺-EGTA-GVB⁻ buffer, Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺ 이온이 모두 제거된 EDTA-GVB⁻ buffer를 제조하여 다당체 시료 및 정상인의 혈청과 각각 혼합하여 37°C에서 30분간 사전 반응시켰다. 각 반응액은 37°C에서 60분간 재차 보체를 활성화 시키고, 인산완충액 2.5 ml를 가한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 용혈활성을 측정함으로써 보체계 활성화능을 비교하였다.

구성 당 분석

구성 당 분석은 Jones 등의 방법[13]을 일부 변형한 즉 가수분해 후 각 구성당을 alditol acetate로 유도체화 하여 Gas chromatography로 분석하였다. 다당체 시료 2 mg을 2 M TFA (trifluoroacetic acid)로 121°C, 1.5시간 반응시켜 가수분해한 후, 1 ml의 1 M NH₄OH에 용해하여 10 mg의 NaBH₄로 4시간 환원시켰다. acetic acid를 적당량 가하여 잔존 NaBH₄를 제거한 후, methanol을 가하며 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거하여 각 구성당에 상당하는 alditol로 전환하였다. 이 후 각각의 alditol은 1 ml의 acetic anhydride를 가하여 121°C에서 30분 동안 반

응시켜 alditol acetate로 전환시켰으며 이를 chloroform/H₂O 2상 용매계로 분리하여 추출하고, 질소 가스를 불어넣어 건조 후 소량의 acetone에 용해하여 만들어진 구성 당의 alditol acetate 유도체는 gas chromatography 분석용 시료로 사용하였다. 표준 당도 위와 같이 처리하여 구성당의 동정에 사용하였으며, 각 구성당의 mole%는 각 peak 면적, 분자량 및 FID에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였다.

분자량 측정

정제된 주 항보체 활성 다당체인 MFKF-AP1 β 의 보다 정확한 분자량 측정을 위해 액체 크로마토그래피(356-LC, Varian사, USA)에 의해 분석하였다. 칼럼은 SuperdexTM Peptide 10/300 column (GE Healthcare사), detector는 refractive index detector, 용출속도는 0.5 ml/min이었다. 다당체의 분자량 표준품으로는 Shodex사의 pullulan 키트(P-800; 708,000, P-100; 107,000, P-50; 47,100, P-20; 21,100, P-10; 11,000, P-5; 5,900 dalton)를 사용하였다. 분자량 측정 시에는 각각의 표준품 pullulan peak의 용출량을 구한 후 Kav 값 [Kav = (Ve - Vo) / (Vt - Vo)]을 산출하여 얻은 값을 분자량 log 값에 대한 표준곡선을 작성하고 이에 근거해 해당 분석시료 다당체의 Kav 값으로부터 분자량을 환산하여 결정하였다.

결과 및 고찰

수용성 다당체의 분리 및 정제

말굽버섯 자실체에서 열수로 추출한 조다당체(MFKF-CP)의 화학적 조성을 분석한 결과, 중성당 87.04%, 산성당 12.76%, 단백질 0.2%의 조성을 보였다. MFKF의 수율은 말굽버섯 1 kg당 2.4 g이었다. Fig. 1에서 도시된 대로 음이온 교환 수지와 친화성 칼럼 크로마토그래피로 5종의 수용성 다당체를 분리 정제하였다. DEAE-Sepharose FF (Cl⁻ form) 음이온 칼럼 chromatography를 수행한 결과, 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)로 용출한 1개의 비 흡착 분획인 중성다당체(MFKF-NP)를 먼저 분리하고 0.1 M, 0.4 M, 1 M, 2 M의 각 NaCl 용액으로 각각 용출하여 흡착 분획인 2종의 산성다당체(MFKF-AP1, MFKF-AP2)를 얻을 수 있었다(Fig. 2). 분리된 다당체들의 해당분획들을 모아서 증류수로 3일간 투석 및 동결건조하여 측정한 결과 세 종류 다당체의 상대 중량비가 MFKF-NP : MFKF-AP1 : MFKF-AP2 = 14 : 1 : 5인 것으로 나타났으며 이들은 단백질을 거의 포함되지 않았으나 우론산은 소량 함유되어 있었다. 이들에 대한 항보체 활성에서 중성다당체보다 산성다당체가 보다 우수했으므로 MFKF-AP1과 MFKF-AP2 다당체를 Concanavalin A-Sepharose

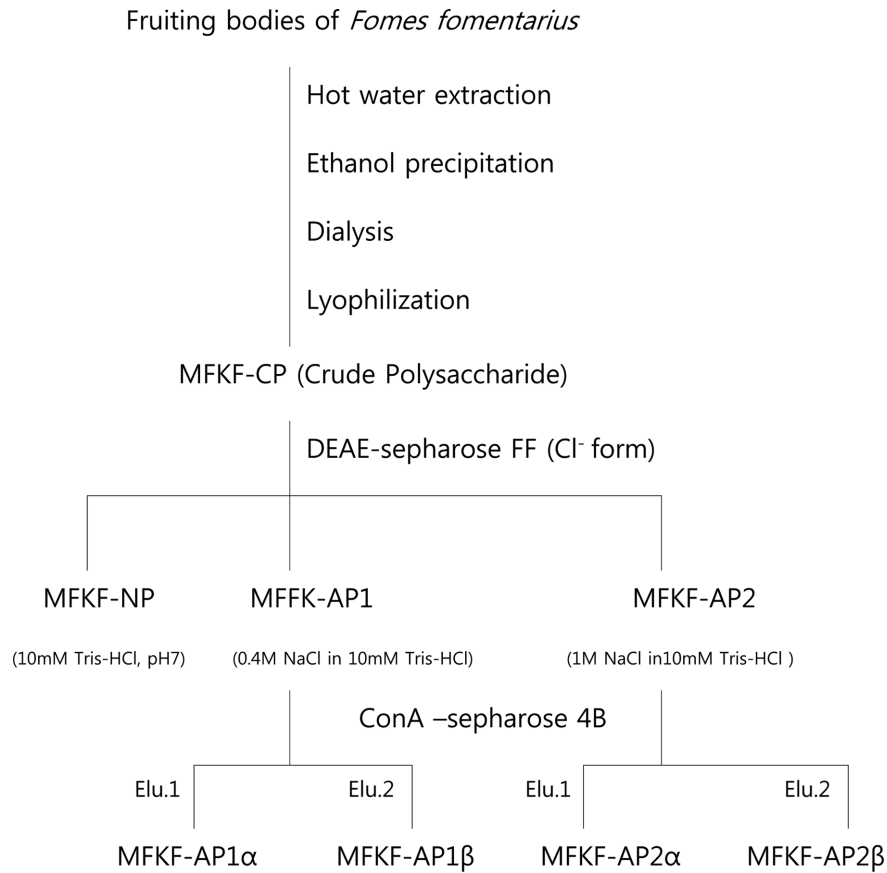


Fig. 1. Schematic diagram depicting the isolation process of water-extractable polysaccharides from fruiting bodies of *Fomes fomentarius*.

Elu. 1: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (pH 7.4), Elu. 2: 50 mM α -methyl-D-glucoside, 50 mM phosphate (pH 7.0).

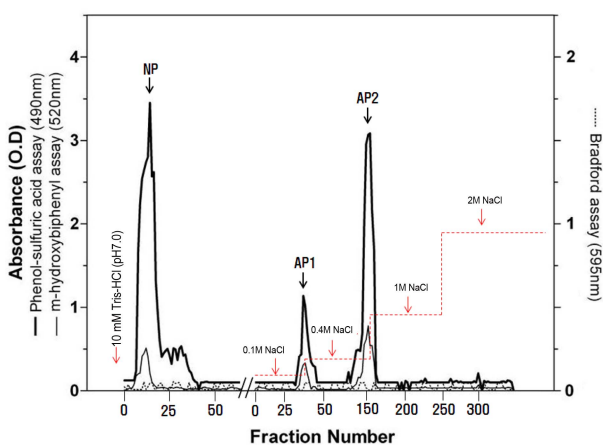


Fig. 2. Elution profiles of crude polysaccharides (MFKF-CP) on DEAE-sepharose FF column (Cl⁻ form ϕ 5 \times 50 cm). The column was equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). Each fraction (5 ml) was analyzed quantitatively on total sugar (phenol-sulfuric acid assay), uronic acids (m-hydroxybiphenyl assay), and proteins (Bradford assay).

4B column (1.5 \times 15 cm)으로 추가 정제하였다, 1차 용출 완충액(20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.4)으로 Concanavalin A와 친화성이 낮은 β 형-다당체, 2차 용출 완충액(50 mM α -methyl-D-Glucoside, 50 mM phosphate, pH 7.0)으로 Concanavalin A와 친화성이 높은 α 형-다당체를 각각 분리하였다.

분리된 다당체들의 항보체 활성

상기 정제된 5종의 다당체에 대한 농도 별 항보체 활성 분석 결과, 5종 모두 시판되고 있는 면역활성물질인 PSK(구름버섯유래 β 1,3-glucan)보다[34] 동일 농도에서 높은 항보체 활성을 보였으며, 특히 이들 중 MFKF-AP1 β 는 20 μ g/mL 농도에서도 70% 이상의 가장 높은 항보체 활성을 나타냈다 (Fig. 3). 일반적으로 1,000 μ g/mL 농도에서 70% 이상의 항보체 활성을 가진 다당체는 그 약리성이 통상적으로 인정된다고 알려져 있다[38]. 이에 기준할 때 MFKF-AP1 β 는 약 50배, MFKF-AP1 α 는 20배, MFKF-AP2- α MFKF-AP2- β 는

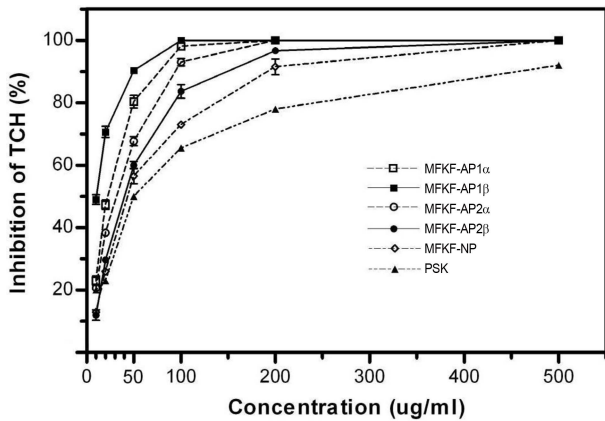


Fig. 3. Anti-complementary activities of purified MFKF polysaccharides on various concentrations. PSK (krestin) was used as the control. All values were mean ± SD (n = 3).

10배, 중성다당체인 MFKF-NP는 최소 5배 정도의 높은 항보체 활성을 보였다. 현재까지 항보체 활성 다당체는 세균, 곰팡이, 버섯, 조류, 식물에서 분리되어 왔다. 특히 MFKF-AP1β는 이제까지 검색된 천연 항보체활성 다당체 중 가장 탁월한 것으로 보고된 장수버섯(*Fomitella fraxinea*)의 FF-AP1 [40, 41] 및 자근(*Lithospermum euchromum*) 뿌리의 LR-2IID-5a보다는 항보체 활성이 낮지만[10], Shin 등이 55종의 한약재를 대상으로 선별한 대복피(*Areca catechu*) [28], 항암 보조제로 사용중인 표고버섯(*Lentinus edodes*) 유래의 Lentinan [30], 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 다당체 [16], 약쑥(*Artemisia princeps* PAMP) 잎[37], 인삼(*Panax*

ginseng) 잎[7], 질경이(*Plantago major L*)의 잎이나 종자[21, 25]에서 분리한 다당체보다 항보체 활성이 더 우수하였다.

상기 결과의 의미는 특히 보체계의 활성화가 항암작용에 관여함을 관찰한 Okuda 등의 보고[23], 항암활성을 가진 다당체를 이용하여 항암 작용과 보체계 활성이 유의한 상관관계가 있다는 Ito 등의 보고[11]에 비추어 볼 때, 말굽버섯 자실체 유래의 MFKF-AP1β 다당체가 새로운 유력한 항암다당체의 연구소재로 제공될 수 있다는 것이다.

MFKF-AP1β의 보체계 활성화 경로 작용 양식

보체계의 활성화 경로는 크게 고전적 경로(classical pathway)와 대체경로(alternative pathway), 렉틴 경로로 구성되어 있으며, 고전적 경로의 활성화에는 Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺ 모두가 관여하고 대체경로에는 Mg⁺⁺만이 선택적으로 관여하고 있다고 보고되어 있다[33]. 따라서 보체계 활성능이 우수한 것으로 확인된 MFKF-AP1α와 MFKF-AP1β가 보체계 활성화의 두 경로 중 어느 경로를 통하여 활성화되는지 확인하기 위해 특정 금속이온을 제거하거나 첨가한 반응계에서 항보체 활성을 비교 측정하였다. MFKF-AP1α와 MFKF-AP1β는 Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺이 모두 존재 하였을 때 활성화되는 고전적 경로를 통해 주로 반응이 이루어지지만 일부는 Ca⁺⁺가 선택적으로 제거되고 Mg⁺⁺이 존재하는 반응계에서 활성화되는 대체경로를 통해 보체 활성화가 일어남을 보여주고 있다(Fig. 4). 특히 대체경로 반응계에서 농도에 정비례하여 항보체 활성이 증가되는 경향을 보였으며 1,000 μg/mL에서 최대 85%에 이르렀다. 이는 대부분의 항보체 활성 다당체들이 대체경로의 반응계에서 농도 증가에 상관없이 항보체 활성이 30%

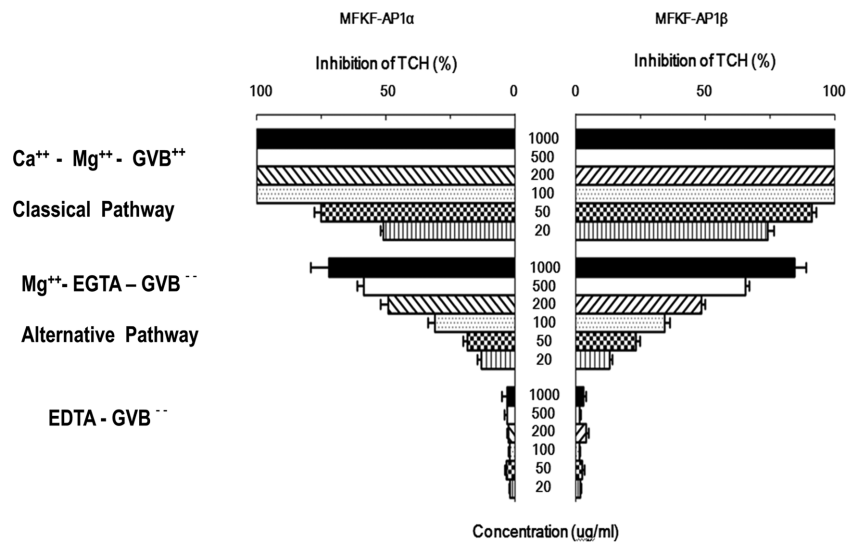


Fig. 4. Anti-complementary activities of purified MFKF-AP1α and MFKF-AP1β on various concentrations in the presence or absence of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺. All values were mean ± SD (n = 3).

Table 1. Composition of neutral monosaccharides in 5 anti-complementary polysaccharides isolated from fruiting bodies of *Fomes fomentarius*. (Mole%)^b

Constitutive Monosaccharide ^a	Isolated polysaccharides				
	MFKF-NP	MFKF-AP1- α	MFKF-AP1- β	MFKF-AP2- α	MFKF-AP2- β
Rhamnose	-	0.01	0.02	3.98	2.57
Fucose	5.53	-	-	4.49	2.52
Arabinose	13.19	1.66	0.66	1.89	-
Xylose	7.69	97.85	99.07	69.67	89.32
Mannose	8.71	0.41	-	9.46	5.54
Galactose	17.26	0.01	-	7.51	-
Glucose	47.62	0.07	0.24	3.01	-

^aMonosaccharides were analyzed using alditol acetates.

^bMole% was calculated from the detected total carbohydrate.

를 넘지 않는 것을 감안할 때 매우 특이한 사실이다. 한편, Ca^{++} 및 Mg^{++} 모두가 제거된 반응계에서는 활성이 거의 나타나지 않았다. 위의 결과를 종합하여 볼 때 MFKF-AP1- α 와 MFKF-AP1- β 가 고전경로와 대체경로 모두를 경유하여 보체계를 활성화시킴을 보여주며 특히 대체경로 활성화 정도가 기존 보고된 다른 항보체 활성 다당체 보다 더 우수한 것으로 나타났다.

분리된 항보체 다당체의 화학적 특성

말굽버섯 자실체에서 분리한 다당체들의 구성당 조성을 gas chromatography로 분석한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 이들 중 항보체 활성의 주 다당체인 MFKF-AP1 α 와 MFKF-AP1 β 는 xylose가 97%나 99% 이상이고 arabinose는 각각 0.66%, 1.66%씩 소량 함유하고 있었다. 그 외 mannose와 glucose가 미량 검출되었다. MFKF-AP2 α 와 MFKF-AP2 β 의 경우는 xylose 함량이 70%와 90% 정도고 mannose가 각각 9%, 6%씩 함유하며 그밖에 다양한 중성당으로 구성되어 있다(Table 1). 이러한 구성당 결과로 미루어 볼 때 이들의 구조는 xylose간 서로 결합된 xylan으로 주로 존재함을 나타내 주며 특히 MFKF-AP1 β 는 xylose로 99% 이상 이루어져 있으므로 homoxylan이라 할 수 있다. 일반적인 xylan이 통상적으로 항보체 활성을 가지고 있는지 아니면 본 연구의 MFKF-AP1 α 나 MFKF-AP1 β xylan만의 고유한 특성인지를 확인하기 위해 시약으로 판매되고 있는 자작나무에서 분리한 (1 \rightarrow 4)- β -D xylan (xylose 함량 90%)을 표준품으로 하여 항보체 활성을 비교 분석하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 자작나무 유래 xylan은 1,000 μ g/mL 농도에서도 항보체 활성이 40%에 지나지 않음을 고려해 볼 때 MFKF-AP1 α 와 MFKF-AP1 β 는 농도 대비 20-50배 이상의 보다 우수한 항보체 활성을 보였다.

현재까지 생리활성 xylan의 대표적 성공사례인 Biobran

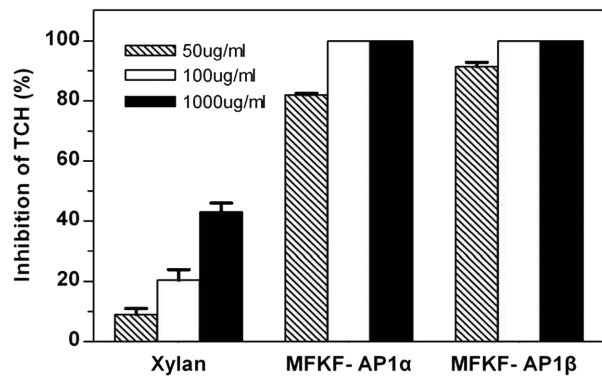


Fig. 5. Anti-complementary activities of purified MFKF-AP1 α and MFKF-AP1 β and xylan.

Xylan (Sigma X0502) was used as the control. All values were mean \pm SD ($n = 3$).

은 쌀, 밀, 호밀, 옥수수 등의 종자의 세포벽에서 분리하여 기능성 식품으로 판매되고 있으며 주성분인 MGN-3(일종의 arabinoxylan)는 xylose 함량이 본 연구의 xylan보다 높지 않지만(70% 이하) 항보체활성, 항산화 및 항 HIV능, NK세포 활성능이 우수한 것으로 보고된 바 있다[8, 9, 22]. 이 밖에도 예로부터 중국이나 일본에서 약용버섯으로 알려진 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*) 자실체에서 분리한 heteroxylan(FI₀-a- β ; xylose 함량 58%)이 쥐에 이식된 암세포들의 성장을 저해한다거나 질경이 종자에서 분리한 일부 heteroxylan이 유효한 항보체 활성을 가진다는 보고가 있다[20, 25]. 그러나 97% 이상의 xylose 함량을 가진 xylan이 약리적 활성이나 항보체 활성을 가진다는 보고는 본 연구가 현재까지 처음인 것으로 판단된다. 이것은 단순히 xylose 간의 결합형태만으로도 항보체 활성이 우수하다는 의미이므로 이것에 대한 구조연구가 매우 흥미로울 수 있다.

또한 항보체 활성의 주 다당체인 MFKF-AP1 β 의 분자량

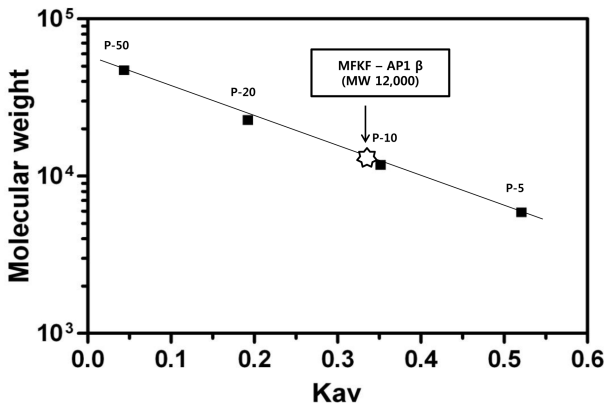


Fig. 6. Standard curves for molecular weight determination of MFKF-AP1α.

When the flow rate is 0.5 ml/min., $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$, V_t is total volume of packed resins (retention time of galactose \times 0.5), V_o is void volume (retention time of P-800 \times 0.5), V_e is elution volume of MFKF-AP1 β (retention time of sample \times 0.5), Molecular weight of standard pullulan series are following. P-800: 708,000, P-100: 107,000, P-50: 47,100, P-20: 21,100, P-10: 11,000, P-5: 5,900 dalton.

을 확인하기 위하여 pullulan 표준품 키트와 시료를 각각 HPLC 분석을 행하여 Fig. 6에서 보는 바와 같은 표준곡선을 얻어서 산정했을 때 MFKF-AP1 β 의 분자량이 대략 12,000임을 알 수 있었다. 이는 항보체 활성 다당체의 통상적 분자량에 비해 매우 낮은 편에 속한다.

한약재로부터 많은 보체계 활성 다당체들을 보고한 Yamada 등[36]은 일반적으로 분자량 크기에 비례하여 생리적 활성이 증가된다고 하였으나, Yanihara 등[38]의 보고에서는 분자량 크기와 항보체 활성간의 뚜렷한 유의성이 없는 것으로 보고하고 있다. 그러나 본 연구의 MFKF-AP1 β 는 기존 보고된 항보체 활성 다당체보다 크기에서 약 12,000 정도로 비교적 작지만 오히려 항보체 활성은 우수하므로 분자량 크기와 활성간에 서로 무관함을 보여주고 있다. 이는 이것의 활성이 3차적 구조보다, 주쇄 내 xylose간의 결합형태 또는 2차적 구조에 기인할 가능성도 예상되나 보다 정확한 사실은 추후 구조분석 연구에서 자세히 검토 분석되어야 할 것이다.

많은 연구에서 보고되는 바와 같이 버섯에서 유래한 생리 활성 다당체들의(β 1,3 glucan) 대부분이 수십만 이상의 분자량을 가지거나 물에 거의 녹지 않는 난용성인 반면에, 본 연구의 MFKF-AP1 β 는 분자량이 비교적 작은 수용성 다당체임에도 불구하고 보체계 단백질을 활성화 시키고 있음이 매우 특이하다. 일반적으로 저분자의 수용성 다당체는 복용시, 고분자의 난용성 다당체보다 속주의 장내 세포에서 흡수율이 우수하므로 동일 농도에서 그것의 생리적 활성효과가

뚜렷하다면 기능성 식품의 소재로 큰 장점이 될 수 있을 것으로 기대된다.

결론적으로 본 연구에서는 한국에서 자생하는 말굽버섯의 자실체로부터 항보체 활성이 우수한 물에 잘 녹는 homoxylan을 처음으로 보고하고 이것의 기능성 식품 소재로서의 가치를 제시하였다.

요 약

말굽버섯의 열수추출물에서 얻은 조다당체인 MFKF-CP를 분리, 정제하기 위하여 DEAE-sepharose FF 및 ConcanavalinA-sepharose 4B를 이용한 두 차례의 연속적인 chromatography를 수행하였다. DEAE-sepharose FF에서는 3종류의 다당체(MFKF-NP, MFKF-AP1, MFKF-AP2)를 분리하였는데, 그 중에서 MFKF-AP1이 50 μ g/ml 농도에서 70% 이상의 높은 항보체 활성을 보였다. 이어서 ConcanavalinA-sepharose 4B 칼럼을 이용해 MFKF-AP1과 MFKF-AP2 다당체로부터 각각 MFKF-AP1 α , β 와 MFKF-AP2 α , β 다당체를 분리하였다. 그 중에서 MFKF-AP1 β 가 20 μ g/ml 농도에서 70% 이상의 가장 우수한 항보체 활성을 나타내었고 그 활성 순서는 MFKF-AP1 β > MFKF-AP1 α > MFKF-AP2 α > MFKF-AP2 β > MFKF-NP > PKS이었다. 또한, Mg⁺⁺과 Ca⁺⁺ 이온이 제거되거나 첨가된 상태에서의 항보체 활성 실험을 통해 말굽버섯의 주 항보체 다당체인 MFKF-AP1 β 는 고전경로(classical pathway)와 대체경로(alternative pathway) 모두를 경유하여 활성을 나타내고 있음을 확인하였다. Gas chromatography에 의한 구성당 조성 분석에서는 중성다당체인 MFKF-NP를 제외하고 나머지 4종의 다당체가 xylose를 약 70-99%의 높은 비율로 함유하고 있으며 특히 주요 항보체 다당체인 MFKF-AP1 β 는 xylose를 99% 함유하고 glucose (0.24%) 및 arabinose (0.66%)를 미량 함유하고 있는 매우 특이한 homoxylan이었다. 또한, MFKF-AP1 β 의 분자량을 HPLC로 분석한 결과, 약 12,000 정도인 것으로 추정되었다.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the National Academy of Agricultural Sciences (Project No. PJ0067032011).

References

1. Blumenkrantz, N. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.* **54**: 484-489.
2. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

3. Chen, W., Z. Zhao, S. F. Chen, and Y. Q. Li. 2008. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect *in vitro*. *Bioresour. Technol.* **99**: 3187-3194.
4. Chen, W., Z. Zhao, and Y. Q. Li. 2008. Simultaneous increase of mycelia biomass and intracellular polysaccharide from *Fomes fomentarius* and its biological function of gastric cancer intervention. *Carbohydr. Polym.* **85**: 369-375.
5. Cui, F. J., W. Y. Tao, Z. H. Xu, W. J. Guo, H. Y. Xu, Z. H. Ao, J. Jin, and Y. Q. Wei. 2007. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Gri-fola frondosa* GF9801. *Bioresour. Technol.* **98**: 395-401.
6. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
7. Gao, Q. P., H. Kiyohara, J. C. Cyong, and H. Yamada. 1989. Chemical properties and anti-complementary activities of polysaccharides fractions from roots and leaves of *Panax ginseng*. *Planta Med.* **55**: 9-12.
8. Ghoneum, M. and A. Jewett. 2000. Production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma from human peripheral blood lymphocytes by MGN-3, a modified arabinoxylan from rice bran, and its synergy with interleukin-2 *in vitro*. *Cancer Detect. Prev.* **24**: 314-324.
9. Ghoneum, M. 1998. Anti-HIV activity *in vitro* of MGN-3, an activated arabinoxylan from rice bran. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**: 25-29.
10. Yamada, H., J. C. I. Cyong, and Y. Otsuka. 1986. Purification and characterization of complement activating-acidic polysaccharide from the root of *Lithospermum euchromum* royle. *Int. J. Immunopharmacol.* **8**: 71-78.
11. Ito, H., M. Sugiura, and T. Miyazaki. 1976. Antitumor polysaccharides from the culture filtrate of *Fomes formentarius*. *Chem. Pharm. Bull.* **24**: 2575.
12. Ito, H. 1986. Effects of the antitumor agents from various natural sources on drug-metabolizing system in sarcoma 180-bearing mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **40**: 435-443.
13. Jones, T. M. and P. Albersheim. 1972. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* **49**: 926-936.
14. Kabat, E. A. and M. M. Mayer. 1964. Complement and complement fixation: in *Experiment Immunology*, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois.
15. Kojima, T., K. Tabata, W. Itoh, and T. Yanaki. 1986. Molecular weight dependence of the antitumor activity of schizophyllan. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 231-232.
16. Kweon, M. H., H. Jang, W. J. Lim, H. I. Chang, C. W. Kim, H. C. Yang, H. J. Hwang, and H. C. Sung. 1990. Anti-complementary properties of polysaccharides isolated from fruit bodies of mushroom *Pleurotus ostreatus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 450-456.
17. Lavia, I., D. Friesemb, S. Gereshc, Y. Hadarb, and B. Schwartza. 2006. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Lett.* **244**: 61-70.
18. Lee, J. S. 2005. Effects of *Fomes fomentarius* supplementation on antioxidant enzyme activities, blood glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr. Res.* **25**: 187-195.
19. Lee, K. H., J. W. Lee, M. D. Han, H. Jeong, Y. I. Kim, and D. W. Oh. 1994. Correlation between anti-complementary and antitumor activity of the crude polysaccharide from *Ganoderma lucidum* IY009. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 45-51.
20. Mizuno, T. and N. Ukai. 1992. Antitumor-active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, and edible, and medicinal mushroom called *Yamabushitake* or *Houtou*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 347-348.
21. Michaelson, T. E., A. Gilje, A. B. Samuelson, K. Hogaesen, and B. S. Paulsen. 2000. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction. PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian. J. Immunol.* **52**: 483-490.
22. Okawa, K., M. Takeuchi, and N. Nakamura. 2005. Immunological effects of partially hydrolyzed arabinoxylan from corn husk in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 19-25.
23. Okuda, T., Y. Yoshioka, T. Ikekawa, G. Chihara, and K. Nishioka. 1972. Anti-complementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature New Biol.* **238**: 59-60.
24. Park, Y. M., I. T. Kim, H. J. Park, J. W. Choi, K. Y. Park, J. D. Lee, B. H. Nam, D. G. Kim, J. Y. Lee, and K. T. Lee. 2004. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Fomes fomentarius*. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 1588-1593.
25. Samuelsena, A. B., I. Lunda, J. M. Djahromia, B. S. Paulsena, J. K. Wolda, and S. H. Knutsenb. 1999. Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L.. *Carbohydr. Polym.* **38**: 133-143.
26. Sasaki, T. and N. Takasuka. 1976. Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Carbohydr. Res.* **47**: 99-104.
27. Schepetkin, I. A. and M. T. Quinn. 2006. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutical potential. *International Immunopharmacology* **6**: 317-333.
28. Shin, K. S., K. S. Kwon, and H. C. Yang. 1992. Screening and characteristics of anti-complementary polysaccharides from Chinese medicinal herbs. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **35**: 42-50.
29. Song, W. C. and M. R. Sarrias. 2000. Complement and innate immunity. *Immunopharm.* **49**: 187-198.
30. Song, C. H. 1998. Anti-complementary activity of endopolymers produced from submerged mycelial culture of higher fungi with particular reference to *Lentinus edodes*. *Biotechnol.*

- Lett.* **20**: 741-744.
31. Suzuki, H., K. Hasimoto, S. Oikawa, K., Sato, M. Osawa, and T. Yadomae. 1989. Anti-tumor and immunomodulating activities of a β -glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 410-413.
 32. Tabata, K., W. Itoh, T. Kojima, S. Kawabate, and K. Misaki. 1981. Ultrasonic degradation of schizophyllan, and antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* RRIES. *Carbohydr. Res.* **89**: 121-135.
 33. Thomas, A. E. and I. Kimishige. 1974. Activation of alternative pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.* **113**: 348-358.
 34. Tsukagoshi, S., Y. Hashimoto, G. Fujii, H. Kobayashi, K. Nomoto, and K. Orita. 1984. Krestin (PSK). *Cancer Treat Rev* **11**: 131-155.
 35. Vincent, E., C. Ooi, and F. Liu. 2000. Immunomodulation and Anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr. Med. Chem.* **7**: 715-729.
 36. Yamada, H., T. Nagai, J. C. Cyong, Y. Otsuka, N. Shimizu, and K. Shimada. 1985. Relationship between chemical structure and anti-complementary activity of plant polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **144**: 101-111.
 37. Yameda, H., T. Nagai, J. C. Cyong, and Y. Otsuka. 1991. Mode of complement activation by acidic heteroglycan from the leaves of *Artemisia princeps* PAMP. *Chem. Pharm. Bull.* **39**: 2077-2081.
 38. Yanahira, S., H. Kiyohara, J. C. Cyong, and Y. Otsuka. 1987. Characterization of anti-complementary acidic heteroglycans from the seed of *Coix lacrym-jobi* var. *ma-yuen*. *Phytochemistry* **26**: 3269-3275.
 39. Yang, H. C. 1998. Structural characterization of the anti-complementary and macrophage activating polysaccharides isolated from *Agaricus bisporus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**: 709-716.
 40. Yoon, S. H., J. H. Lim, Y. S. Kim, C. H. Kim, J. H. Jo, and Y. S. Hwang. 1998. Pharmacological effects of proteoglycans extracted from fruitin bodies of *Fomitella fraxinea*. *The Korean J. Mycology* **26**: 511-518.
 41. Yoon, S. H. 1998. Chemical analysis of acidic proteo-heteroglycans with anti-complementary activity from the hot-water extracts of *Fomitella fraxinea*. *The Korean J. Mycology* **26**: 502-510.
 42. Zhang, M., S. W. Cui, P. C. K. Cheung, and Q. Wang. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology.* **18**: 4-19.