

Isolation of Anticarcinogenic Isoflavone-conjugated Glycoproteins from a Submerged Liquid Culture of *Agaricus blazei* Mycelia by the Autolysis Process

So Young Kim², Young Suk Kim³, Joung Soon Jang⁴, Boh Hyun Kim¹, Abdur Md. Rakib¹, Gon Sup Kim⁵, Jeong Ok Kim³ and Yeong Lae Ha^{1*}

¹Department of Applied Chemistry, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Department of Food and Nutrition, International University of Korea, Jinju 660-759, Korea

³HK Biotech, Co. Ltd., Jinju 660-844, Korea

⁴Department of Internal Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul 156-576, Korea

⁵Laboratory of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Received November 7, 2014 / Revised December 8, 2014 / Accepted December 9, 2014

Most beta-glucans obtained from various fruit bodies of mushrooms and mushroom mycelial cultures have high-molecular weight glycoproteins, conjugated with beta-glucans. We report that isoflavone-conjugated glycolproteins (designated as gluvone) were isolated and exhibited stronger anticarcinogenic activities. *Agaricus blazei* mycelia (ABM) was cultured in a liquid medium containing soybean flakes for 14 days. The liquid culture was autolyzed by incubating at 53°C (pH 5.5) for 3 h. A crude glycoprotein (CGP) fraction with a cytotoxic effect on a mouse ascite cancer cell line (S-180) and a human breast cancer cell line (MCF-7) was isolated from the autolyzed ABM cultures by 80% ethanol treatment. Gluvone was isolated from the CGP with Sephadex G-75 column chromatography. It exhibited a stronger anticancer effect than CGP against the S-180 cell-induced female ICR mouse ascites carcinogenesis. Gluvone with 9,400 daltons was identified as a glycoprotein conjugated with isoflavone. According to HPLC and GC analysis, in conjunction with ¹H-NMR spectral analysis, it contained 60% carbohydrates (glucose, fructose, and ribose), 31% protein, and 2% isoflavone (daidzein and genistein), which is a novel material. These results indicate that a strong anticarcinogenic gluvone was isolated from the autolyzed product of a submerged liquid culture of ABM, suggesting that autolysis could be a useful tool to produce antitumor agents.

Key words : *Agaricus blazei* mycelia (ABM), autolysis, MCF-7 cancer cells, S-180 cancer cells, submerged-liquid culture

서 론

버섯은 독특한 맛과 향기를 갖는 기호성 식품이면서 항암 효과, 항 콜레스테롤 효과 등의 생리활성을 갖기 때문에 민간 전통한약으로도 이용 되고 있다[9, 20, 34, 40]. 특히 표고버섯 (*Lentinus edodes*) [24, 45, 46], 구름버섯(*Coriolus versicolor*) [32], 갓버섯(*Lepiota procera*) [17], 잎새버섯(*Grifola frondosa*) [8, 33] 및 잔나비겉상버섯(*Ganoderma applanatum*) [42] 등은 항암효과가 뛰어난 버섯으로 보고되었고, 이들로부터 분리한 항암성 다당체는 주로 당단백질(glycoprotein: GP)로 보고되었다.

암을 치료 및 예방할 목적으로 항암성 버섯 자실체로부터 GP를 분리할 수 있지만, 이는 고비용, 장시간 및 비균질화 상

태이기 때문에, 저비용, 고효율 및 균질화 된 GP를 항암성 버섯균사체 액체배양으로 생산하고 있다[14, 21]. 액체배양에 이용되는 버섯균은 신령버섯(*Agaricus blazei*: AB), 목질진흠버섯(*Phellinus linteus*), 송이버섯(*Tricholoma matsutake*), *C. versicolor*, *L. edodes*, 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*) 균 등이 이용되고 있지만, AB 버섯균사체(ABM) 배양물의 항암효과가 가장 우수하였다[7, 24, 41, 48].

AB버섯은 국내에서 신령버섯, 아가리쿠스버섯, 또는 흰들버섯으로 불리며, 일본국립암센터는 동물실험에서 고형암에 대한 억제율이 99.4%, 완전 치유율이 90%인 것으로 보고하였다[48]. 이들의 주 활성 성분은 β-(1,6)-glucosyl 가지를 가진 β-(1,3)-glucan으로 고형암뿐만 아니라 복수암, S상 결장암, 난소암, 유방암, 폐암, 간암 등에 효과가 있고[10, 13, 15, 26, 28, 29], AB버섯에 함유된 GP는 탄수화물이 50.2%이고 단백질이 43.3%로 이들 탄수화물과 단백질 복합체가 항암활성이 있다고 하였다[3, 6, 16, 27, 31, 40]. Mizuno 등[30]과 Back 등 [2]은 버섯균사체로부터 중요한 항암성 β-D-glucan을 분리하였고, 그 활성 정도는 평균 분자량, 구조 및 용해도 등에 따라 차이가 있다고 보고하였다[2, 31, 38].

*Corresponding author

Tel : +82-55-772-1962, Fax : +82-55-772-1969

E-mail : ylha@gnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

본 연구에서는 지금까지 AB버섯 자실체나 ABM 배양물로 부터 분리된 항암성 GP와는 상이한 분자량이 적고 isoflavone이 결합된 GP, 즉, isoflavone-conjugated glycoprotein (Gluvone으로 명명)을 분리하였다. ABM을 액체배양하고, 이 액체배양물이 가지고 있는 효소를 이용한 자가분해로 항암성이 우수한 Gluvone을 분리하였다. Gluvone의 항암성은 mouse 복수암 세포주인 S-180 세포, 인체 유방암 세포주인 MCF-7 세포 및 S-180 세포로 유도한 mouse 복수암에 대해 확인하였다.

재료 및 방법

재료

AB버섯 균주는 농촌진흥청(Suwon, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 대두박은 태평양화학(Seoul, Korea), 황백당은 제일제당(Seoul, Korea), KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O는 Shinyo사(Osaka, Japan)에서 구입하였다. 7주령 female ICR mouse는 Life science사(Daegu, Korea)에서, S-180 세포와 MCF-7 세포는 Korea Cell Line Bank (Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. Fructose, galactose, glucose, maltose, ribose, sucrose, xylose, acetic acid, potato dextrose, daidzin, genistin, daidzein, genistein은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO)에서 구입하였다. Diethyl ether, ethanol, hexane은 J. T. Baker사(Phillipsburg, NJ)에서 HPLC grade를 구입하였고, 그 외 사용된 시약은 1급 이상이였다.

버섯균사체 배양

PDA배지 조제 및 배양

Potato dextrose (100 g)에 황백당 30 g, Bacto-agar 20 g을 첨가하고, 증류수를 사용하여 1 l로 보정하고 살균(121°C, 15 min) 한 후, petri-dish에 분주하여 PDA 배지로 사용하였다. AB버섯균주를 PDA배지에 일정량 접종하여 항온기(25°C)에서 배양하면서 균사 성장을 측정하였다.

액체배양배지 조제 및 배양

기본배지(1 l)에 황백당 20 g, 대두박 분해물 100 ml, MgSO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 0.5 g을 첨가하였다. 이 액체배지를 500 ml 용량의 삼각플라스크에 300 ml 분주하고 살균(121°C, 30 min)하여 액체배지로 사용하였다. 액체배지에 PDA 배지에서 활성화 한 ABM을 접종하고 진탕항온기(120 rpm, 25°C)에서 14일 배양하였다.

배양물의 자가분해

자가분해 조건

상기에서 배양한 ABM 액체배양물을 반응온도(53°C, 63°C), 반응 pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.5), 반응시간(1, 3, 5, 15, 24 hr)에서 진탕(120 rpm) 하면서 자가분해 정도를 측정하였다. 이들 반응에서 자가분해 최적조건을 확립하였다.

자가분해물의 활성성분 분획

ABM 액체배양물을 자가분해(53°C, pH 5.5, 120 rpm, 3 hr) 하였다. Fig. 1에 준하여 자가분해한 ABM 배양물을 열수추출(100°C)하여 여과한 여액을 진공농축(10배)하였다. 이 시료에 80% ethanol 용액이 되도록 ethanol을 첨가하고 진탕(120 rpm, 15 min)한 다음, 4°C에서 24 hr 방치하였다. 침전물을 분리하여 활성성분 분석시료(crude glycoprotein: CGP)로 사용하였다.

활성성분 분석

Fig. 1에서 분리된 CGP를 Fig. 2에 준하여 Sephadex G-75 column을 이용하여 분획하였다. CGP 시료 1 ml (100 mg/ml)를 1% NaCl이 충전 된 Sephadex G-75 column (5 cm ×

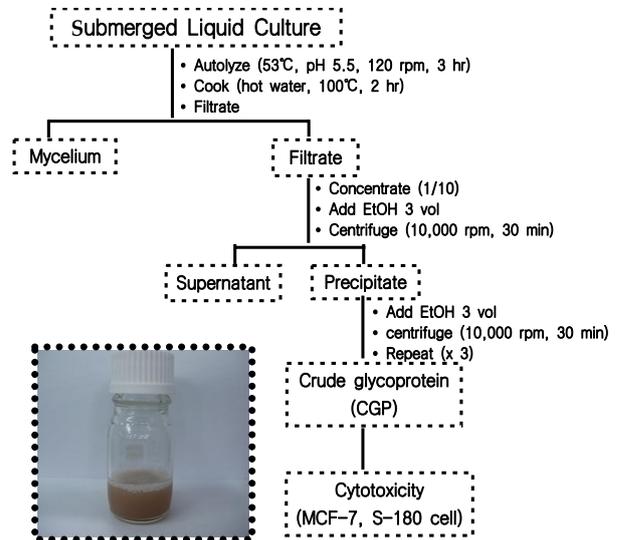


Fig. 1. A flow chart for the isolation of CGP fraction from the submerged-liquid culture of ABM by autolysis.

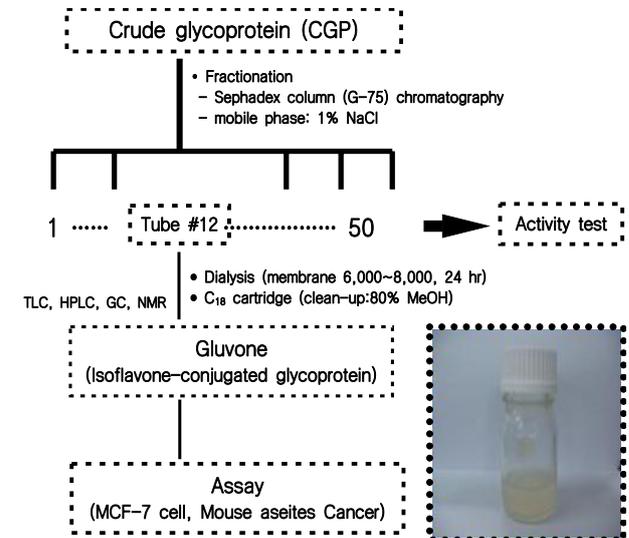


Fig. 2. A flow chart for the isolation of Gluvone from CGP.

50 cm)에 loading 한 후 10 ml씩 50개를 분취하였다. 이때 사용된 mobile phase는 1% NaCl이었다. 분리한 활성성분인 Gluvone의 총 탄수화물 함량은 페놀-황산법[44], 총 단백질 함량은 Bradford 법[23]으로 측정하였다.

Gluvone의 성분 분석

구성 당 분석

구성당은 가수분해 한 다음 HPLC [43] 및 GC [47]로 분석하였다. Gluvone 시료 10 mg을 가수분해(10 ml 6N-HCl, 6 hr)한 다음 10 ml의 6N-NaOH로 중화한 후 단당류를 Dionex HPLC [column, Rezex RCM-Monosaccharide column (200×10 mm); column temp., 75°C; mobile phase, deionized water; detector, RI; flow rate, 0.6 ml/min]로 분석하였다[43].

또한 Gluvone 시료 10 mg을 가수분해(1 M H₂SO₄, 90°C, 8 hr)한 다음, CaCO₃로 중화하였다. 그 여액을 원심분리하고, 농축시킨 다음 건조하였다. 건조된 시료를 acetyl화(Ac₂O-Pyridine, 90°C, 30 min)하여 생성된 alditol acetate를 GC (Model 6890, Agilent Co. Ltd., CA)로 분석하였다[47]. 칼럼은 HP-5 capillary column (25 m × 0.32 mm, i.d.)을 사용하였고, helium을 carrier gas로 사용 하였다. 온도는 150~240°C (2°C/min) program하였고, 최종 온도에서 10분간 분석하였다.

Isoflavone 조성

Isoflavone의 조성은 HPLC로 분석하였다[35]. Gluvone 시료 10 mg을 가수분해(10 ml 6N-HCl, 6 hr)한 다음 10 ml의 6N-NaOH로 중화한 후 methanol로 추출하여 HPLC로 분석 [Column, C18 column (3.9×30 cm); column temp., 25°C; mobile phase, 0.1% ammonium acetate와 methanol (2:8→8:2); detector, UV (254 nm); flow rate, 1 ml/min]하였다. 표준물질은 daidzin, genistin, daidzein, genistein을 이용하였다.

아미노산 조성

시료 10 mg을 6N-HCl로 가수분해(6N-HCl 1 ml, N₂ gas 충전, 110°C, 24 hr)하였다. 이 가수분해물을 냉각하고, deionized water 3 ml을 첨가하여 HCl을 감압으로 제거(3회 반복 세척)하고 건조하였다. 이 시료를 0.3 M lithium hydroxide에 용해하고 여과한 다음, 5 ml로 정용한 뒤 0.22 µm membrane filter로 여과하고, 여액을 아미노산 분석기(Hisashia Hirano)로 분석[Column, Ultrapac 11 cation exchange resin (6 mm × 200 mm); buffer flow, 45 ml/hr; ninhydrin flow, 35 ml/hr; column temp., 50~80°C; buffer step, 4 step; reaction bath temp., 130°C; buffer pH range, 3.2-10.0; injection volume, 40 µl]하였다.

분자량 측정

TSK column (7.8×30 cm)이 장착된 Dionex HPLC [P-680 pump; column temp., 25°C; mobile phase, deionized water;

detector, RI; flow rate, 1 ml/min]로 분석하였다. Standard 물질로 dextran (5,000, 12,000, 25,000), maltoheptaose, maltotriose)을 이용하여 log scale로 계산하였다.

암세포 배양 및 세포독성 측정

MCF-7 및 S-180 세포는 10% FBS와 penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 항온기(5% CO₂, 37°C)에서 배양하였다[1]. 세포는 Nunc culture dishe (35 mm, i.d., Rochester, NY)에서 80% confluency까지 배양하고 0.25% trypsin-2 mM EDTA 처리한 후, 원심분리(1,000 rpm, 10 min)하여 세포를 회수 하였다. 세포를 96-well culture plate (Nunc)에 well 당 1×10⁴ 세포를 seeding하고 배지를 첨가하여 24 hr 배양하였다. 배양된 세포에서 serum의 효과를 제거하기 위해 배지를 제거하고 5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml sodium selenite와 0.1 mg/ml BSA가 함유된 배지를 첨가하여 24 hr 배양하였다. serum-starved 세포에 시료(50 µg/ml deionized water) 50 µl를 첨가하여 ascorbic acid (50 ng/ml), α-tocopherol phosphate (20 ng/ml)가 함유된 RPMI 1640 배지에서 48 hr 배양하였다,

세포독성은 MTT assay로 측정하였다[1]. 시료가 처리된 세포에 MTT 용액(5 mg/ml PBS)을 처리하고 4 hr 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하고 200 µl DMSO를 첨가하여 MTT formazan crystal을 용해하였다. 570 nm에서 흡광도를 Anthos 2020 microplate reader (Wals, Austria)로 측정하여 시료의 세포독성을 측정하였다.

Mouse 항복수암 실험

Mouse 항복수암 실험은 Lee 등[22]의 방법에 준하여 실시 하였다. Female ICR mouse (6-7주령)를 cage당 10마리씩 넣고(이때, cage당 mouse 평균무게가 같게 무작위로 분배), 온도(22±1°C)와 습도(55±5%)가 유지되는 사육장에서 1주일 사육한 후 실험에 사용하였다. 물과 사료(Chow diet)는 자유롭게 먹도록 하였다.

Female ICR mouse 복강에서 계대배양된 S-180 세포(1×10⁷ 세포/ml PBS)을 복강에 0.1 ml 주사하여 복수암을 유발하였다. 복수암 유발 후 2일마다 시료 0.2 ml (10 mg 시료 함유)을 mouse의 복강에 주사하였다. S-180 세포 복강 투여 후 42일 동안 생존한 mouse의 수와 생존일수를 기록하였다. 이 동물 실험은 경상대학교 동물실험 윤리강령(GAR-120227-M0004)에 따라 수행하였다.

통계처리

Data는 평균(Mean)±표준편차(SD)로 나타내었고, data의 통계처리는 SAS program을 이용하여 ANOVA (Analysis of variance) test와 Duncan's multiple range test를 하였다.

결 과

ABM 액체배양

PDA배지에서 계대배양 중인 AB버섯균을 지름 8 mm 크기로 잘라 배양할 PDA 배지의 중앙에 올려놓고 24℃ 항온기에서 14일간 배양(균사가 약 90 mm 정도 자람)하였다. 이것을 ABM 액체배양 원으로 사용하였다.

ABM을 14일간 액체배양하면서 3, 7, 10, 14일에 배양한 배양액 100 ml를 원심분리(4℃, 5,000 rpm, 30 min)하여 균사체를 회수하여 무게를 측정하였다. ABM의 건물은 배양기간에 따라 4.1 g (3일), 5.8 g (7일), 13.1 g (10일), 20.0 g (14일)으로 증가하였다. 따라서 ABM을 14일간 액체배양하여 자가분해 시료로 사용하였다.

ABM 액체배양물 자가분해

ABM을 14일간 액체배양한 후, ABM 액체배양물을 삼각플라스크(100 ml)에 넣고 53℃와 63℃의 항온기에서 pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5의 조건으로 1, 3, 5, 15, 24 hr 반응시킨 다음 자가분해효소 활성을 점도의 변화로 측정하였다(Fig. 3). ABM 액체배양물은 53℃의 pH 5.5에서 3 hr 반응에서 점도가 18,750 ml/sec에서 1,500 ml/sec으로 최대 감소(12.5배)하였다. 또한 ABM의 다른 반응 조건(53℃와 63℃, pH와 반응시간)에서도 ABM 액체배양물의 점도가 감소되었지만, 그 정도는 53℃의 pH 5.5에서 3 hr 반응보다 낮았다. 이 결과로 ABM 액체배양물은 자가분해 되었음을 알 수 있었고, 자가분해 최적조건은 53℃에서는 pH 5.5에서 3 hr 반응이었다.

ABM 액체배양물을 자가분해 최적 온도와 pH 조건(53℃, pH 5.5)에서 0, 1, 3, 5, 15, 24 hr 자가분해로 분리한 CGP의 S-180과 MCF-7 세포에 대한 세포독성을 비교하였다(Fig. 4A). 자가분해 하지 않은 대조 CGP에 비해 3 hr 자가분해하여 얻은 CGP는 S-180 세포에 대해 28%, MCF-7 세포에 대해 42%의 세포독성을 나타내었다. 그러나 3 hr 이하 또는 그 이상 반응시켜 얻은 CGP의 세포독성 효과는 증가하지 않았다. 따라서 세포독성을 높이기 위한 ABM 액체배양물의 최적 자

Table 1. Effect of CGP on the S-180 cell-induced mouse ascites carcinogenesis

Treatment ¹⁾	Mean survival day ²⁾	Survival rate (%) ³⁾	Survival mouse ⁴⁾
Control	19.2±0.5 ^c	100	0/10
CGP	22.3±1.0 ^b	116	1/10
Gluvone	26.9±0.9 ^a	140	3/10

¹⁾Each treatment was consisted of 10 mice. Mice were given 10 mg sample/mouse/0.2 ml PBS. Control mice were given S-180 cells and PBS (0.2 ml). CGP represents a crude glycoprotein fraction obtained from the liquid culture of ABM by autolysis (53℃, pH 5.5, 120 rpm, 3 hr). Gluvone means iso-flavone-conjugated glycoprotein purified from CGP by Sephadex G-75 column chromatography.

²⁾Average survival days of mouse until 42 days after treatment. Mean ± SD. Means with different small superscript letters represent significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

³⁾Survival rate = [mean survival days of treatment mice/mean survival days of control mice] × 100.

⁴⁾Numbers of mouse survived until 42 days after treatment.

가분해 조건은 53℃, pH 5.5, 3 hr이었다.

Gluvone의 함양성

ABM 액체배양물의 최적 자가분해 조건으로 얻은 CGP를 Sephadex G-75 column chromatography를 이용하여 분획하였다(10 ml/tube) (Fig. 4B). 각 분획의 UV 흡광도를 280 nm에서 측정하였고, 280 nm에서 흡광도를 갖는 3개의 분획[1 (tube 5), 2 (tube 12) 및 3 (tube 19)]을 얻었다(Fig. 4B). CGP와 CGP로부터 얻은 분획 1, 2, 3의 MCF-7 세포에 대한 세포독성은 PBS만을 처리한 대조군에 비해 분획 2가 유의성 있게 MCF-7 세포의 생육을 억제하였다(Fig. 4C). 따라서 이 분획 2를 Gluvone으로 명명하였다(Fig. 2).

S-180 세포로 유도된 mouse의 복수암에 대해 Gluvone은 강한 항암효과를 나타내었다(Table 1). PBS만을 투여한 대조 처리군 mouse의 평균수명은 19.2일이었고, 자가분해로 얻은

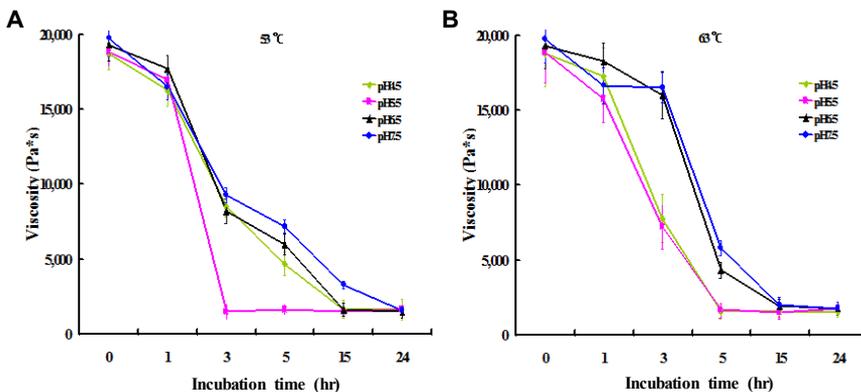


Fig. 3. Effects of autolysis reaction conditions on the viscosity of the submerged-liquid culture of ABM at 53℃ (A panel) and 63℃ (B panel). Viscosity of ABM liquid culture autolyzed at pH 5.5 and 55℃ for 3 hr was significantly decreased, $p < 0.01$, from that of other autolyzed conditions by Duncan's multiple range test. Detailed measurement condition was described in Materials and Methods.

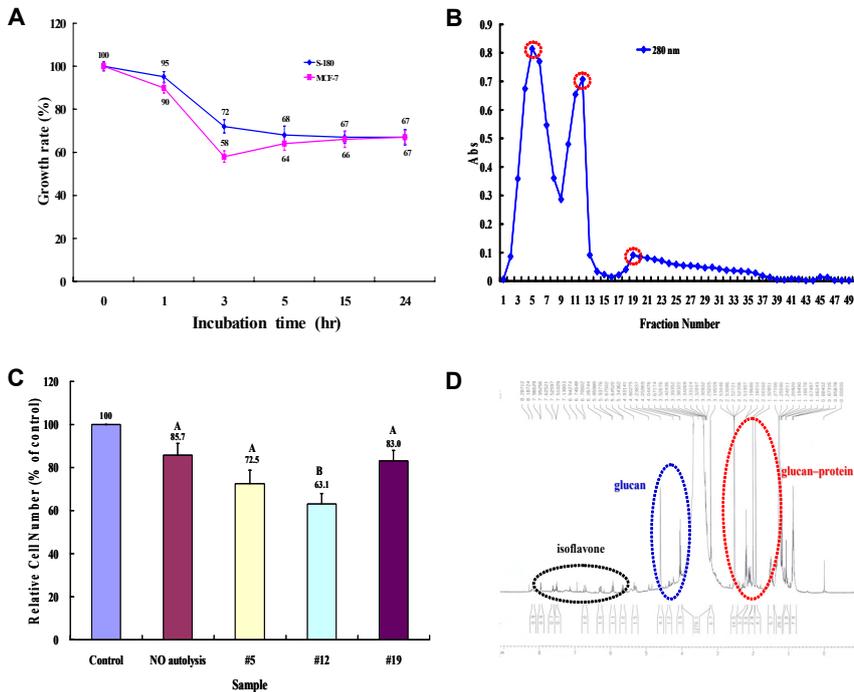


Fig. 4. Cytotoxic and structural characteristics of CGP and Gluvone. A panel, cytotoxicity of CGP against S-180 and MCF-7 cells; B panel, fractionation of CGP by Sephadex G-75 column chromatography; C panel, cytotoxicity of Gluvone (tube 12) on MCF-7 cells; and D panel, ¹H-NMR spectrophotometric analysis of Gluvone (500 MHz/DMSO). Bars with different capital letters represent significantly different at *p*<0.05 by Duncan's multiple range test (C panel). Detailed measurement and analysis conditions were described in Materials and Methods.

CGP 처리군은 22.3일, CGP로부터 분리한 Gluvone 처리군은 26.9일이었다. 또한 최종 42일간 사육한 결과 10마리 중 대조군은 0마리, CGP 처리군은 1마리, Gluvone 처리군은 3마리가 생존하여 Gluvone 처리군의 수명연장 효과가 높게 나타났다. CGP 처리군의 수명연장효과는 PBS만을 투여한 대조군 보다는 강하였지만, Gluvone 처리군 보다는 약하였다. 이 결과로 자가분해에 의해 항암성이 증가하였지만 Gluvone의 항암성이 더 강하였음을 알 수 있었다.

Gluvone의 화학적 구성

Gluvone의 화학적 구성을 조사하기 위하여 먼저 일반성분을 분석하였다(Table 2). Gluvone 시료의 고형분 함량은 82.6%였고 고형분 중 총 탄수화물이 60.6%, 총 단백질이 31.0%, 총 isoflavone이 2.0%였다(Table 2).

¹H-NMR 분석에서 1.4-2.5 ppm의 glucan-protein complex

Table 2. Chemical composition of Gluvone¹⁾

Ingredient	Total solid (%)
Carbohydrate	60.6±2.3 ^{2)a}
Protein	31.0±1.5 ^b
Isoflavone	2.0±0.1 ^d
Others	6.4±0.8 ^c

¹⁾Gluvone means isoflavone-conjugated glycoprotein purified from CGP by Sephadex G-75 column chromatography.

²⁾Mean ± SD (n=3). Means with different small superscript letters represent significantly different at *p*<0.01 by Duncan's multiple range test.

signal, 4.0-4.5 ppm에서 glucan signal, 6.0-8.0 ppm에서 isoflavone signal을 확인하였다(Fig. 4D). 이 결과로 Gluvone은 isoflavone이 conjugated된 GP임을 예측할 수 있었다[36, 37].

총 탄수화물이 60% 함유된 Gluvone의 구성 당을 GC (Fig. 5A) 및 HPLC (Fig. 5B)로 분석하였고, 그 구성비는 glucose가 51%, fructose가 47%, ribose가 2%였다(Table 3). Gluvone의 glucose 이외의 fructose는 배지에 첨가한 황백당으로부터 유래한 것으로 생각되었다. 그리고 소량의 ribose는 ABM이 생육하면서 생성하는 효소들에 의해 합성된 것인지는 정확히 알 수 없었다.

Table 3. Composition of monosaccharides and isoflavones in Gluvone¹⁾

Component	Composition (%) ³⁾	
Monosaccharide ²⁾	Glucose	50.9±2.1 ^{3)a}
	Fructose	47.1±3.8 ^b
	Ribose	2.0±0.2 ^c
Isoflavone ²⁾	Daidzin	18.9±0.9 ^C
	Genistin	24.4±1.1 ^B
	Daidzein	37.4±2.1 ^A
	Genistein	19.3±0.5 ^C

¹⁾Gluvone means isoflavone-conjugated glycoprotein purified from CGP by Sephadex G-75 column chromatography.

²⁾Monosaccharides and isoflavones were isolated from Gluvone by HPLC

³⁾Mean ± SD (n=3). Means with different small superscript letters or same capital letters represent significantly different at *p*<0.01 by Duncan's multiple range test.

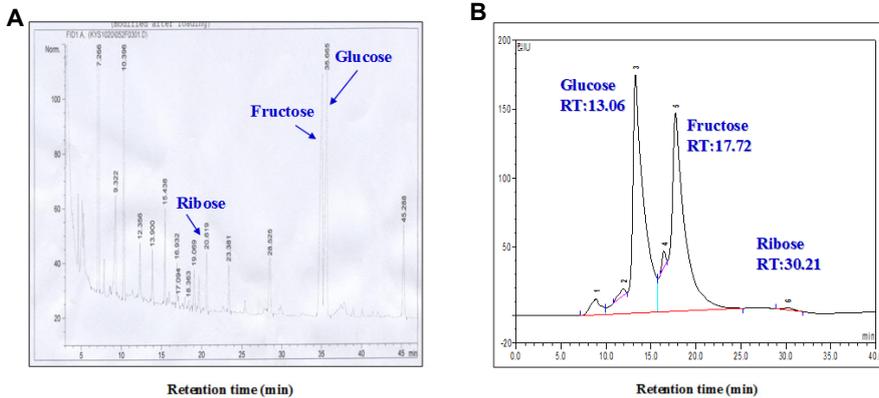


Fig. 5. Analysis of monosaccharides from Gluvone by GC (A panel) and HPLC (B panel). Detailed analysis condition was mentioned in *Materials and Methods*.

또한 Gluvone에 단백질이 31% 함유되어 있었는데, 이 단백질의 아미노산을 산가수분해하여 분석하였다, 그 결과 Asx (21.9%), Glx (12.5%), Lys (7.8%), Phe (7.8%), Gly (7.2%), Thr (5.7%), Ala (5.7%), His (4.9%), Ser (4.9%), Leu (4.7%), Arg (3.9%) Val (3.8%), Pro (3.6%), Cys (0.9%), Met (1.0%), Ile (2.8%), Tyr (0.9%)으로 나타났다.

Gluvone 구성 성분인 isoflavone을 HPLC로 분석하였다 (Fig. 6A). Glucose 배당체인 표준품 daidzin과 genistin의 retention time은 각각 9.5와 12.6 min이었고, glucose가 없는 비배당체 표준품 daidzein, genistein의 retention time은 각각 18.2, 22.2 min이었다. Gluvone 분해물로부터의 retention time 9.5, 12.6 min는 각각 daidzin과 genistin으로 확인되었고, retention time 18.0, 22.0 min은 각각 daidzein과 genistein으로 확인하였다. 또한 이들 daidzin, genistin, daidzein, genistein의 구성비는 각각 18.9, 24.4, 37.4, 19.3%로 나타났다 (Table 3).

Gluvone의 분자량을 dextran 표준품과 maltoheptaose, maltotriose 등을 이용하여 측정하였다(Fig. 6B). Dextran 25,000은 retention time이 8.5 min, dextran 12,000은 8.8 min, dextran 5,000은 9.2 min으로 나타났으며, maltoheptaose의 retention time은 9.8 min, maltotriose는 9.9 min으로 나타났다. Gluvone의 retention time은 9.0 min으로 표준품들의 re-

tention time과 비교하여 Gluvone의 분자량이 약 9,400 Da으로 측정되었다.

고찰

본 연구에서는 ABM을 대두박이 함유된 배지에서 배양한 액체배양물을 자가분해(53°C, pH 5.5, 3 hr, 120 rpm)하여 분자량이 9,400 Da 정도의 Gluvone을 세계 최초로 얻었다(18). 이 Gluvone은 자가분해 전보다 MCF-7 및 S-180 세포에 대한 세포독성이 강하였고, S-180 세포로 유발한 mouse 복수암에 대한 항암성이 크게 증가하였다. Gluvone의 항암성은 isoflavone과 자가효소분해 의해 Gluvone의 분자량이 작아졌기 때문인 일 것으로 추정되었다.

Mizuno 등[30]은 버섯균사체로부터 항암성 β-D-glucan을 분리하였고, 그 활성 정도는 고분자 물질의 평균 분자량, 구조 및 용해도 등에 따라 차이가 있다고 보고하였다. 또한 Liu 등 [25]은 *Saccharomyces cerevisiae* 반응물을 자가분해(55°C, pH 5.5, 120 rpm, 24 hr)하여 항암성이 큰 β-D-glucan 생산하였고, 이는 가수분해 효소의 작용으로 세포 내 생물 고분자 물질이 저 분자 물질로 변환된다고 보고 하였다. 이 과정에 관여하는 효소는 phospholipase, proteinase와 ribonuclease라 하였다. 또한 Cho와 Choi [5]는 먹물버섯의 자가분해 과정에서 버

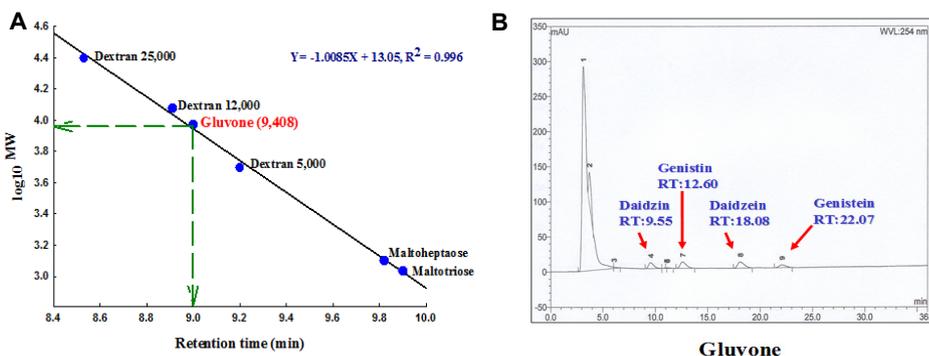


Fig. 6. Determination of molecular weight (A panel) and analysis of isoflavones of Gluvone by HPLC (B panel). Detailed measurement and analysis conditions were mentioned in *Materials and Methods*.

섯의 세포질 및 세포벽이 분해된다고 보고하였으며, 분해과정에 관련된 효소로는 chitin 분해효소인 chitinase와 밀접한 관계가 있다고 보고하였다.

본 연구에서도 ABM 액체배양물의 자가분해로 배양물의 점도가 18,750 ml/sec에서 1,500 ml/sec(12.5배 감소)으로 감소하였고, 이 배양물로부터 분리한 Gluvone은 강한 항암효과(S-180과 MCF-7 세포 및 S-180 세포로 유발한 mouse 복수암)를 나타내었다. 버섯으로부터 유래한 GP는 β -(1,3)-glucopyranose polymer에 β -(1,6)-glucopyranose의 가지를 갖고 있는 β -D-glucan이 단백질에 conjugation되어 있어, 분자량이 클수록 항암효과가 크다고 알려져 있다[12, 23, 46]. 그러나 본 연구에서 분리한 Gluvone은 분자량이 9,400 Da로서 분자량이 수십만에 달하는 GP보다 작지만 항암성이 우수한 것은 Liu 등[25]과 Cho와 Choi [5]가 보고한 바와 같이 배양물에 함유된 여러 효소에 의해 GP 분자량이 감소되어 항암성이 증가한다는 보고와 일치하였다. 또한 Gluvone의 항암성이 우수한 것은 GP에 isoflavone이 conjugation되어 있어 isoflavone의 시너지 효과 일 것으로 추정되지만 앞으로 더 연구가 수행되어야 할 것이다.

항암성을 갖는 GP의 항암효과는 손상된 면역 기능을 회복시키거나 촉진시키기 때문인 것으로 알려져 있다[40, 48]. 이와 같은 활성을 갖는 GP는 Lentinan (표고버섯 자실체), PS-K (Krestin) [구름버섯 (*Coriolus versicolor*) 균사체], Schizophyllan [치마버섯 (*Schizophyllum commune*) 균사체], Licovex (*C. versicolor*의 균사 배양물), Kp 및 Calvaine (상황버섯균사체 배양물) 등이 보고되었다[4, 11, 19, 22]. 그러나 본 연구에서 분리한 Gluvone은 이들 GP와는 구조나 특성이 다르다. Gluvone에는 isoflavone이 conjugation되어 있다는 것이 큰 장점이다. 현재 isoflavone이 glucose에 conjugation되어 있는지, 단백질에 conjugation 되어 있는지는 확실하지 않아 더 연구가 되어야 할 것이다.

결론적으로, 본 연구에서는 ABM 액체배양물을 자가분해(53°C, pH 5.5, 120 rpm, 3 hr) 하여 얻은 Gluvone은 MCF-7 및 S-180 암세포에 대한 강한 세포독성을 나타내었고, S-180 세포로 유발한 mouse 복수암을 강하게 억제하였다. 이 Gluvone은 분자량이 약 9,400 Da의 중분자로서 GP에 isoflavone이 conjugation 되어 있다. 따라서 이 Gluvone은 인체 암예방 및 치료 물질로 활용할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 연구는 한국연구재단 연구과제(2013R1A1A2011587)와 중소기업청 연구과제(C0135881)에 의해 수행되었음에 감사드립니다.

References

1. Abdur, R. M., Kim, Y. S., Jang, W. J., Jang, J. S., Kang, S. J. and Ha, Y. L. 2011. Preventive effect of t,t-conjugated linoleic acid on 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced inhibition of gap junctional intercellular communication in human mammary epithelial MCF-10A cells. *J Agric Food Chem* **59**, 4164-4170.
2. Baek, S. J., Kim, Y. S., Chun, U. H., Lee, E. S. and Lee, J. W. 2001. Properties of the high and low molecule of the proteoglycan extracted from *Ganoderma lucidum* IY009. *Korean J Mycol* **29**, 1-8.
3. Chang, H. L., Chao, G. R., Chen, C. C. and Mau, J. L. 2001. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. *Food Chem* **74**, 203-207.
4. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. 1970. Fractionation of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* (Berk) Sing (an edible mushroom). *Cancer Res* **30**, 2776-2781.
5. Choi, H. T., and Cho, C. W. 2005. Ultrastructural studies on the autolysis of *Coprinellus congregatus*. *Korean J Microbiol* **41**, 312-315.
6. Choi, J. M. and Koo, S. J. 2000. Effects of β -glucan from *Agaricus blazei* Murill on blood glucose and lipid composition in db/db mice. *Korean J Food Sci Technol* **32**, 1418-1425.
7. Gao, C., Zhong, L., Jiang, L., Geng, C., Yao, X. and Cao, J. 2013. *Phellinus linteus* mushroom protects against taurine-induced mitochondrial impairment and oxidative stress in HepG2 cells. *Phytomedicine* **20**, 705-709.
8. Cui, F. J., Tao, W. Y., Xu, Z. H., Guo, W. J., Xu, H. Y., Ao, Z. H., Jin, J. and Wei, Y. Q. 2007. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. *Bioresour Technol* **98**, 395-401.
9. Dilani, D. D. S., Sylvie, R., Françoise, F., Ali, H. B. and Kevin, D. H. 2012. Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Divers* **55**, 1-35.
10. Dong, Q., Yao, J., Yang, X. T. and Fang, J. N. 2002. Structural characterization of water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydr Res* **337**, 1417-1421.
11. Han, M. W., Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, K. Y. and Kim, K. H. 1993. Effect of Kp, an antitumor protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep red blood cells. *Arch Pharm Res* **16**, 336-338.
12. Irina, S., Anissa, S., Sami, S., Thierry, G., Philippe, L., Catherine, M. G., Sarah, D., Pavel, S. D., Alexander, O. C., Alexander, S. S. and Anatolii, I. U. 2014. Chemical structure and biological activity of a highly branched (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)- β -D-glucan from *Ischrysis galbana*. *Carbohydr Polym* **111**, 139-148.

13. Itoh, H., Amano, H. and Noda, H. 1994. Inhibitory action of a (1→6)- β -D-glucan-protein complex isolated from *Agaricus blazei* Murill on metha fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn J Pharmacol* **66**, 265-271.
14. Kang, A. S., Kang, T. S., Cho, S. M. and Yu, S. H. 2001. Studies on submerged culture and mycelial components of *Naematoloma sublateritium* mycelia. *Korean J Mycol* **29**, 22-27.
15. Kawagish, H., Inagaki, R. and Kanao, T. 1989. Fraction and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr Res* **186**, 267-273.
16. Kawagish, H., Kanao, T., Inagaki, R., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T. and Nkamura, T. 1990. Formolysis of a potent antitumor (1-6)- β -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. *Carbohydr Polym* **12**, 393-403.
17. Kim, B. K., Shim, M. J., Kim, O. N., Kim, H. W. and Choi, E. C. 1989. Antitumor components fo the cultured mycelia of *Lepiota procera* (in Korea). *Korean J Food Hygiene* **4**, 109-118.
18. Kim, J. O., Ha, Y. L., Kim, Y. S. and Park, C. W. Isoflavone- β -D-glucan produced by *Agaricus blazei* in the submerged liquid culture and method of producing same. **US 07060470B2**, June 13, 2006.
19. Komatsu, N., Okubs, S., Likumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sakaki, S. 1969. Home-mediated antitumor action of schizophyllan a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gene* **60**, 137-142.
20. Kuko, K. and Nanba, H. 1996. The effect of Maitake mushrooms on liver and serum lipids. *Altern Ther Health Med* **2**, 62-69.
21. Kwon, S. H., Kim, C. N., Kim, C. Y., Kwon, S. T., Park, K. M. and Hwangbo, S. 2003. Antitumor activities of protein-bound polysaccharide extracted from mycelia of mushroom. *Korean J Food Nutr* **16**, 15-21.
22. Lee, S. H., Park, C. W., Park, K. A., Lee, Y. C., Choi, E. S. and Ha, Y. L. 1998. Inhibition of S-180 cell induced mouse ascites cancer by astaxantin-containing egg yolks. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **27**, 163-167.
23. Li, N., Li, L., Fang, J. C., Wong, J. H., Ng, T. B., Jiang, Y., Wang, C. R., Zhang, N. Y., Wen, T. Y., Qu, L. Y., Lv, P. Y., Zhao, R., Shi B., Wang, Y. P., Wang, X. Y. and Liu, F. 2012. Isolation and identification of a novel polysaccharide-peptide complex with antioxidant, anti-proliferative and hypoglycaemic activities from the abalone mushroom. *Biosci Rep* **32**, 221-228.
24. Li, Y. G., Ji, D. F., Zhong, S., Liu, P. G., Lv, Z. Q., Zhu, J. X., Chen, J. E. and Chen, H. P. 2013. Polysaccharide from *Phellinus linteus* induces S-phase arrest in HepG2 cells by decreasing calreticulin expression and activating the P27kip1-cyclin A/D1/E-CDK2 pathway. *J Ethnopharmacol* **150**, 187-195.
25. Liu, X. Y., Wang, Q., Cui, S. W., and Liu, H. Z. 2008. A new isolation method of β -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocoll* **22**, 239-247.
26. Menoli, R. C. R. N., Mantovani, M. S., Ribeiro, L. R., Speit, G. and Jordao, B. Q. 2001. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murill extracts on V79 cells. *Mutat Res* **496**, 5-13.
27. Mizuno, M., Morimoto, M., Minate, K. and Tsucjida, H. 1998. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 434-437.
28. Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K. and Sumiya, T. 1990. Antitumor activity and some properties of water soluble polysaccharides from the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric Biol Chem* **54**, 2889-2896.
29. Mizuno, T., Inagaki, R., Kanao, T. and Hagiwara, T. 1990. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glucans from *Himematsutake* the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric Biol Chem* **5**, 2897-2905.
30. Mizuno, T., Ushiyama, M., Usui, T., Arakawa, M., Shinkai, K. and Shimizu, M. 1982. Studies on the host-mediated antitumor polysaccharide. Part VI. Fractionation, isolation and characterization of antitumor active β -D-glucan from mycelial cells of *Ganoderma applanatu*. *Bull Fac Agr Shizuoka Univ* **32**, 42-57.
31. Nakajima, A., Ishida, T., Koga, M. and Takeuchi, M. 2002. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. *Int Immunopharmacol* **2**, 1205-1211.
32. Nomoto, K., Yoshikumi, C., Matsunaga, K., Fujii, T. and Takeya, K. 1975. Restoration of antibody forming capacities by PS-K in tumor bearing mice. *Gan* **66**, 365-374.
33. Ohno, N., Sato, K. and Yadomae, T. 1984. Antitumor activity and structural characterization of glucan extracted from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull* **32**, 1142-1151.
34. Park, Y. M., Yoon, S. K., Park, S. H., Baeg, N. J. and Kim, B. S. 1993. Efficiency and safety of *Coriolus versicolor* polysaccharide (Licovek) in the treatment of chronic type H. hepatitis. *Korean J Pharmacol Ther* **1**, 45-50.
35. Peñalvoa, J. L., Tarja Nurmi, T. and Adlercreutz, H. 2004. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. *Food Chem* **87**, 2, 297-305.
36. Rui, T., Toshie, H., Noriko, N. M., Yoshiyuki, A., Mitsuhiro, N., Toshiro, Y. and Naohito, O. 2007. NMR charcterization of the structure of a β -(1→3)-D-glucan isolate from cultured fruit bodies of *Sparassis crispa*. *Carbohydr Res* **342**, 2611-2618.
37. Rui, T., Yoshiyuki, A., Ishibashi, K. and Naohito, O. 2009. An unambiguous structural elucidation of a 1,3- β -D-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments. *Carbohydr Res* **344**, 400-404.
38. Shin, H. J. and Lee, D. C. 2003. Study on the process to decrease the molecular weight of β -(1,6)-branched β -(1,3)-D-glucans. *Korean J Biotechnol Bioeng* **18**, 352-355.
39. Suga, T., Shiito, T., Maeda, Y. Y. and Cjihara, G. 1984. Antitumor activity of lentinan in murine syngenic and autochthonous hosts and its suppressive effect on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis. *Cancer Res* **44**, 5132-

- 5137.
40. Sugiyama, K., Saeki, S. and Ishguro, Y. 1992. Hypercholesterolemic activity of ningyotake (*Polyporus confluens*) mushroom in rats. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* **45**, 265-270.
 41. Sung, J. M., Moon, H. W. and Park, D. S. 1999. Growth condition of liquid culture by *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Mycol* **27**, 1-9.
 42. Taichih, U., Yoshio, I. and Takashi, M. 1981. Isolation and characterization of two kinds of heterogalactan from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum* by employing a column of concanavalin a sepharos-4B. *Carbohydr Res* **92**, 103-114.
 43. Takuma, S. and Nobuo, T. 1976. Further study of the structure of lentinen, antitumor polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Carbohydr Res* **47**, 99-104.
 44. Tatiana, I. I., Anna, V. S. and Tatiana, N. Z. 2014. Antioxidant activity of fucose-containing sulfated polysaccharides obtained from *Fucus evanescens* by different extraction methods. *J Appl Phycol* DOI 10.1007/s10811-014-0293-7.
 45. Unursaikhan, S., Lina, Z., Xiaojuan, X., Xufeng, Z., and Fanbo, Z. 2006. Effects of molecular structure on antitumor activities of (1→3)-β-D-glucans from different *Lentinus edodes*. *Carbohydr Polymers* **63**, 97-104.
 46. Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 258-274.
 47. Yun, J. S., Jeon, H. S., Kim, I. S., Lee, H. J., Lee, H. J., Hyun, J. Y. and Kim, J. B. 2013. Simultaneous determination of fructose, glucose, and sucrose in honey and commercial drinks by GC and GC/MS. *Korean J Food Sci Technol* **45**, 537-544.
 48. Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. K. and Wang, Q. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci Technol* **18**, 4-19.

초록 : 신령버섯균사체 액체배양물의 자가분해에 의한 항암성 isoflavone-conjugated glycoprotein 분리

김소영² · 김영숙³ · 장정순⁴ · 김보현¹ · 라키브 압두르¹ · 김근섭⁵ · 김정옥³ · 하영래^{1*}

(¹경상대학교 대학원 응용생명과학부, ²한국국제대학교 식품과학과, ³주HK바이오텍, ⁴중앙대학교 내과학교실, ⁵경상대학교 수의과대학 생화학교실)

신령버섯균사체(*Agaricus blazei* mycelia: ABM)를 대두박이 함유된 액체배지에 배양하고, 이것을 자가분해(53 °C, pH 5.5, 120 rpm, 3 hr)하여 항암성이 강한 isoflavone-conjugated glycoprotein (Gluvone 이라 명명)을 분리하였다. Gluvone 은 지금까지 알려진 당단백질과는 달리 분자량이 작고(9,400 Da), isoflavone이 결합되어 있다는 점이 다르다, Gluvone 은 60% 탄수화물(glucose, fructose, ribose), 31% 단백질 및 2% isoflavone (daidzein, genistein)으로 구성되어 있었다. 이 Gluvone은 S-180 복수암세포, MCF-7 인체유선암세포에 대한 독성이 강하였고, S-180 세포로 유발한 mouse 복수암을 강하게 억제하였다.