Investigation for culture conditions and characteristics of crude protein-bound polysaccharides compositions extracted from *Agaricus blazei* Murill

Young Hyun Park and Eock Kee Hong
School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University
TEL (033) 250-6275 FAX (033) 243-6350

Abstract

The Basidomycetes fungus *Agaricus blazei* Murill has been well known as a health food for the prevention of cancer, diabetes, hyperlipidemia, arteriosclerosis and chronic hepatitis. This study was concentrated to investigate the characteristics of crude protein-bound polysaccharides(PBP) compositions extracted from *Agaricus blazei* Murill. In order to produce crude polysaccharides, culture conditions were examined using YMK media. Total sugars and protein contents of PBP were detected by phenol-sulfuric acid method and Bradford assay. Hexosamine was found to be involved in the linkage, N-linked and O-linked types. To identify helical conformation existence, wavelength was measured using Congo red after the treatment with alkali solution.

Introduction

최근에 버섯은 기능성 음식과 생리적으로 이로운 의약성분으로 각광받고 있다. 그 중 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 Protein-bound polysaccharides(PBP) 생산을 위한 배양조건을 조사하고, 자실체, 균사체 그리고 배양여액에서 추출한 PBP를 가지고 단백질 정량, 총당

량, 구성당, conformation analysis 그리고 Hexosamine 정량을 실시하였다.

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℃, 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℃, 150 rpm, 초기 pH 5.5로 조절하여 배양하였다.

Sample preparation

자실체와 균사체는 121℃에서 2시간 추출하여 원심분리 후 여액을 3배의 에탄올에 넣은 후 4℃에서 overnight시켰다. 그 중 떠 있는 상층부와 침전층을 분리하여 소량의 증류수를 넣고 용해시켜 농축 시킨 후 동결건조 하였다. 배양여액은 원심분리 후 여액을 3배의 에탄올에 넣은 후 4℃에서 overnight시켰다. 그 중 떠 있는 상층부와 침전층을 따로 분리하여 소량의 증류수를 넣고 용해시켜 농축 시킨 후 동결건조 하였다.

총 당 및 단백질의 정량

총 당의 함량은 phenol-sulfuric acid법 (Dubois 등, 1956)으로 측정하였으며, 단백질 함량은 Bradford test(Scopes, 1987)의 방법을 준하였고, bovine serum albumin (sigma Chem. co.)을 표준으로 사용하여 시료중의 단백질 함량을 측정하였다.

Hexosamine의 정량

Elson-Morgan method에 준하여 실시하였다. (Chaplin et al., 1987). Hexosamine의 함량은 D-glucosamine를 이용하여 얻은 표준직선으로부터 산출하였다.

Conformation analysis

NaOH 처리 후 Congo-Red를 이용하여 helical conformation 유무를 확인하였고, 샘플을 NaOH 처리 후 HCl로 중화를 시키자마자 Aniline Blue를 이용하여 single helix를 확인하였다.

결과 및 고찰

C/N ratio 확인 결과, 균체량은 glucose 80g/l와 Yeast extract 10g/l에서 22.6g/l로 가장 높게 나타났고, crude polysaccharide는 glucose 60g/l와 Yeast extract 10g/l에서 2.356g/l로 가장 높은 것을 알 수 있었다. Hexosamine은 균사체 추출물과 배양여액 Et-OH 침전물에서 1.26%의 높은 결과를 얻었고 총당은 자실체 추출물 중Et-OH 침전물에서 74.9%로 가장 높았다. Helical analysis에서는 균사체 추출물에서만 0.15N에서 흡광도가 급격히 떨어짐을 확인되어 Helical conformation이 존재함을 알 수 있었다.

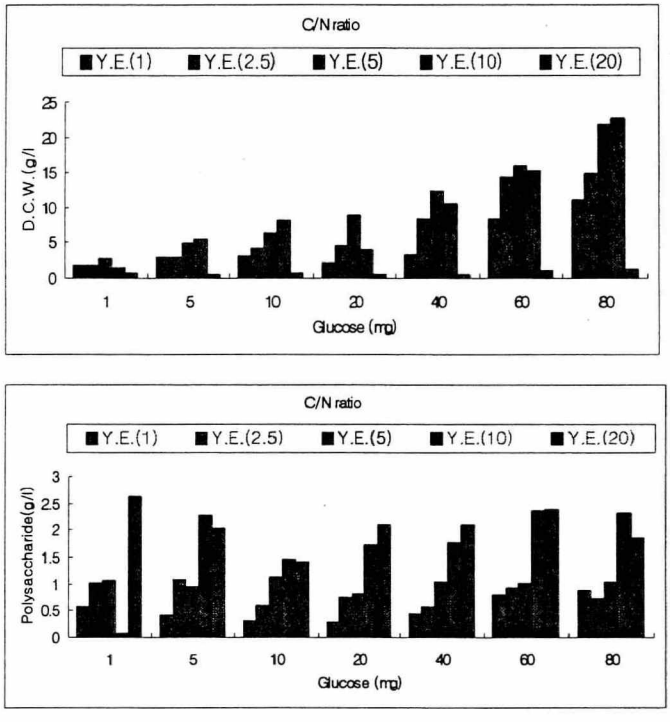

Fig. 1. Effects of glucose and yeast extract concentrations on cell growth and polysaccharides production in YMK medium.

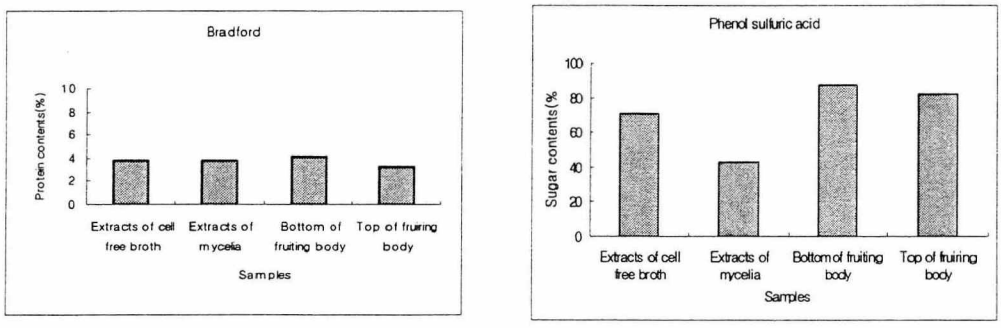

Fig. 2. Relative concentration of total sugar and hexosamine in *Agaricus blazei*.

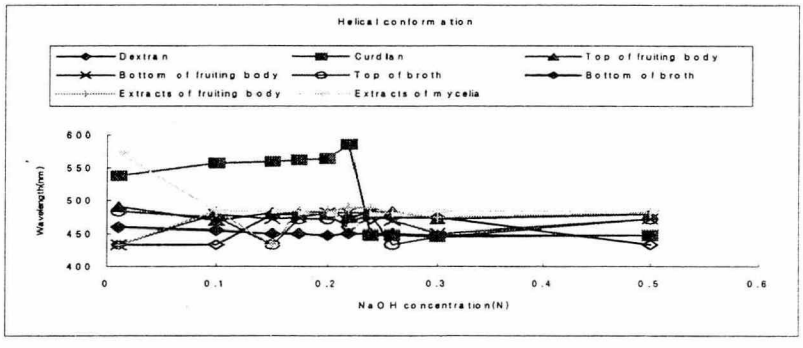

Fig. 3. Change in the absorption maximum of the congo red.

References

1. Guterrez, Z.R., M.S. Mantovani, A.F. Eira, L.R. Ribeiro, and B.Z. Fordao, Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* murill in vitro(2004), *Toxicology in Vitro*, 18, 301-309.
2. Joo Heon Hong, Kwang Sup Youn, and Yong Hee Choi, Characteristics of Crude Protein-bound Polysaccahride from *Agaricus blazei* murill by Extraction and Precipitation conditions and Its Antitumor Effect(2004), *Korean J. Food Sci. Technol.*, 36(4), 586-593.
3. Takaku, T., Yoshiyuki Kimura, and Hiromichi Okuda, Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* murill and Its Mechanism of Action(2001), *J. Nutr.*, 131, 1409-1413.
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.