

# Immune activity of purified polysaccharides extracted from fruiting body and culture broth of *Hericium erinaceus*

Jong Seok Lee, Min Su Shin and Eock Kee Hong

School of Biotechnology and Bioengineering Kangwon National University  
Tel:(033) 250-6275, FAX:(033) 243-6350

## Abstract

To find antitumor components in liquid cultured cell-free broth and the hot water extract from the fruiting body of *Hericium erinaceus*, polysaccharides were purified and fractionated by DEAE-cellulose ion exchange column chromatography and Sepharose CL-6B gel filtration chromatography. Among various crude polysaccharides and purified polysaccharides the fractions showing immune-activity were determined by NO assay.

## 1. 서론

현재 사용되고 있는 항암성 화학요법제 및 항생물질은 정상세포에 대한 독성, 암세포의 내성획득, 인체내에서의 신속한 분해와 배설등의 결점과 임파구 및 세포등을 파괴한다. 이런 화학물질의 결점을 보완하는 대안으로 사용되는 약제를 개발하기 위해 사용되는 것이 약용식물과 더불어 민간 요법이나 한방의약에 주로 쓰이는 것 중의 하나가 담자균류인 버섯이다. 일반적으로 담자균류의 버섯으로부터 생산되는 항종양 활성을 나타내는 물질이 주로 polysaccharide로 밝혀져 있으며 영지버섯 등의 버섯은 국내외 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 노루궁뎅이 버섯은 향후 고부가가치 기능성 식품원료로의 사용이 기대되고 있음에도 불구하고, 식용 및 약용으로 사용되는 중국과 일본에 비해 국내 연구는 미비한 실정이며, 액체 배양물보다는 자실체에서 추출된 다당체의 구조분석과 효능에 초점을 맞추고 있는 실정이다. 이에 본 연구에서는 *Hericium erinaceus*의 자실체에서 추출된 polysaccharides와 액체배양을 통해 생산된 polysaccharide를 이온교환 및 겔 여과법을 통해 정제하고 정제도에 따른 면역활성을 비교·검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 사용균주 및 회분배양(batch culture)

본 실험에서 사용된 균주는 담자균류의 일종인 *Hericium erinaceus*를 사용하였다. 보관용 배지로는 PDA (potato dextrose agar)를 사용하였으며 3주마다 계대배양하였다. 전배양에서 사용된 접종원은 기본 배지인 YMK medium(glucose 20g/L, yeast extract 5g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/L)이고, 본배양의 플라스크배양에서는 modified medium(sucrose 20g/L, yeast extract 10g/L, ascorbic acid 2g/L)을 사용하여 실험을 수행하였으며, 생물반응기를 이용한 배양에서는 modified medium을 사용하여 5L 생물반응기 (Korea Fermentor Co., KF-5L, Korea)에서 전배양액을 10%로 접종하여 배양온도 23°C, 200rpm, 초기 pH는 조절하지 않은 조건으로 7일간 배양하였다.

### 2.2 균체량 및 polysaccharide 분석

균체량 및 다당체의 정량은 건조중량을 이용하여 행하였다.

### 2.3 Crude polysaccharide 추출 및 분리

Crude polysaccharide의 추출 및 분리는 자실체의 경우 열수추출을 통하여 행하였으며, 열수추출은 자실체 분말 100g (dry weight)을 121 °C에서 2시간씩 3번에 걸쳐 총 3L를 추출한 후, 원심분리(500 rpm, 20 min)를 통하여 침전물을 제거하고 남은 상등액에 3배의 에탄올을 가하여 4 °C에서 24시간 동안 방치하였다. 상층에 위치하는 부유된 다당체를 filter paper (whatman #4)를 사용하여 분리하고 다시 중류수로 용해한 후 rotary vaccum evaperator(N-1000, EYELA, Japan)를 이용하여 에탄올을 제거하고 다당체를 농축하였고, 상기의 과정을 3회 반복하였다. 농축된 시료는 약 7일간 투석하고 동결건조하여 crude polysaccharide를 얻었으며, 배양여액은 3배의 에탄올을 가하는 과정부터 자실체에서의 추출과정과 동일하게 시행하였다.

### 2.4 Crude polysaccharide 정제

#### 2.4.1 Ion exchage chromatography에 의한 정제

DEAE-cellulose resin (Cl- form, Sigma Chemical Co. USA)으로 packing시킨 column(2.6 × 50 cm)에 적용하여 탈이온수로 200 mL/hr의 유속으로 10mL씩 분

취하였으며, 산성분획 구간은 0-2M로 NaCl을 농도구배로 용출하였다. 각 분획의 당 및 단백질 분석은 phenol-sulfuric acid법 및 Bradford법으로 측정하였다.

#### 2.4.2 Gel chromatography에 의한 정제

상기에서 분리된 다당체를 0.5M NaCl에 용해시킨 후 Sepharose CL-6B (Sigma Chemical Co. USA)로 충진시킨 column ( $2.4 \times 80$  cm)을 이용하여 0.5M NaCl으로 100 mL/hr의 유속으로 elution하였으며 5 mL/fraction으로 분취하였다. 각 분획의 당 및 단백질 분석은 phenol-sulfuric acid법 및 Bradford법으로 측정하였다.

#### 2.5 분자량의 확인

Blue dextran(2000 kDa)과 standard dextrans(670kDa, 410 kDa, 150kDa, 12 kDa)에 대한 Sepharose CL-6B gel chromatography의 용출곡선을 이용해 standard curve를 작성하였다. 이 표준곡선에 따라 각각의 정제된 다당체의 용출부피를 이용하여 평균분자량을 계산하였다.

#### 2.6 면역학적 효능분석(NO assay)

면역세포에서 유래한 암세포들을 이용하여 *in vitro* 수준에서의 cytotoxic molecule의 분비를 통하여 면역조절제의 활성 평가에 이용되고 있다. 그러므로 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell을 10% fetal bovine serum을 함유한 DMEM 배지에서 배양하여 다양한 종류의 다당체가 cytotoxic molecule 중에 하나인 nitric oxide 생성 및 세포증식에 미치는 영향을 관찰하였다.

### 3. 결과 및 고찰

5L 생물반응기에서 배양 7일차에 1.178 g/L의 균체외 다당체를 얻었다. 배양여액과 자실체 추출 조다당체의 구성분을 분석한 결과 대부분이 당으로 이루어진 다당체임이 밝혀졌다. 이를 ion-exchange와 gel filtration chromatography를 통해 분리 정제하여 정제된 6개의 다당체를 얻었다. 이들의 분자량은 자실체 추출 다당체가 960 kDa과 720 kDa의 고분자와 14 kDa과 13 kDa의 저분자가 얻어졌으며, 배양여액 추출 다당체가 29 kDa과 49 kDa으로 나타났다. 각각의 조다당체와 중성·산성 다당체 및 분자량별 다당체의 면역활성의 결과는 Fig. 5에 나타내었다.

### 3.1 생물반응기에서의 회분배양 및 crude polysaccharide의 추출·분리

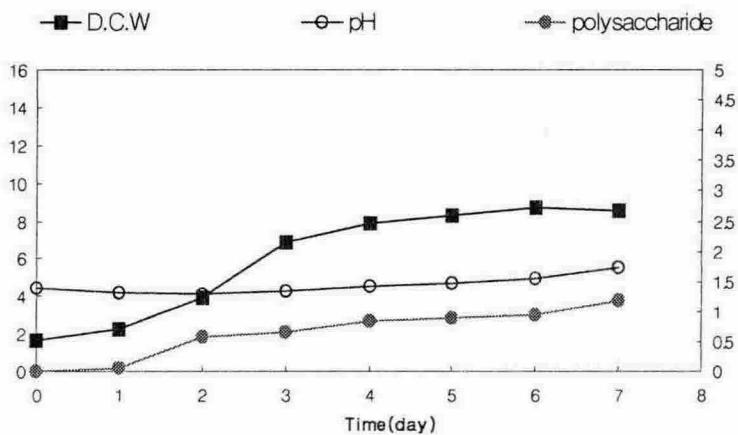


Fig. 1. Profiles of cell growth, pH and poly-saccharide production with initial pH non-control at 200 rpm and 1.0 vvm in SYA medium.

Table 1. Composition of crude polysaccharide from cell-free broth and fruiting body of *Hericium erinaceus*.

Sample	Yield(%)	Yield(g/g, %)		Content(%)			
		Insoluble	Soluble	Sugar	Protein	Hexosamine	Uronic acid
c. HEB-P	0.06	12	88	65.73	0.76	0.58	3.34
c. HEF-P	18.59	3.25	96.75	75.44	0.87	0.76	1.15

### 3.2 Crude polysaccharide의 정제

#### 3.2.1 *Hericium erinaceus*의 자실체로부터 다당체의 분리·정제

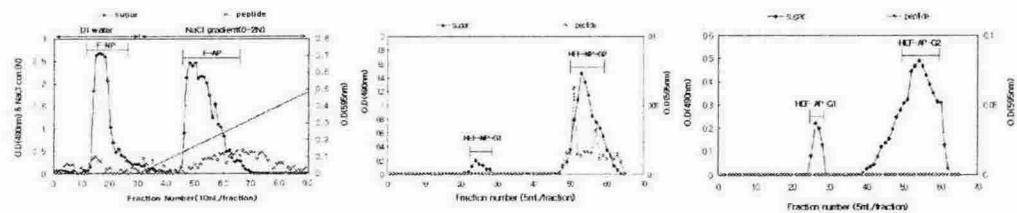


Fig. 2. Elution profile of polysaccharides extracted from fruiting body of *Hericium erinaceus* by gel filtration chromatography followed ion exchange chromatography.

### 3.2.2 *Hericium erinaceus*의 배양액으로부터 다당체의 분리·정제

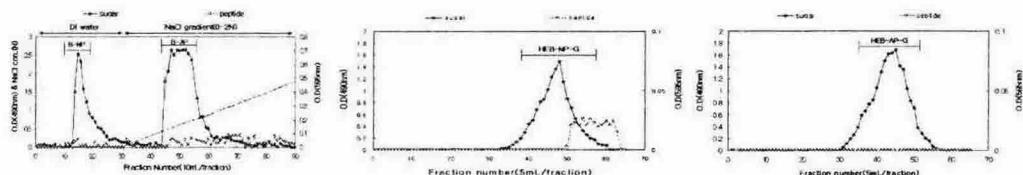


Fig. 3. Elution profile of polysaccharides extracted from cell-free broth of *Hericium erinaceus* by gel filtration chromatography followed ion exchange chromatography.

### 3.3 정제된 다당체의 수율 및 분자량 결정

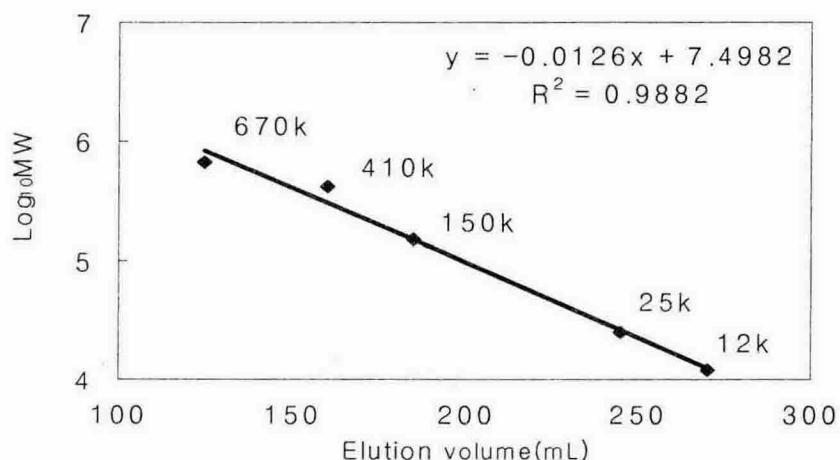


Fig. 4. The molecular weight curve of standard dextran on Sepharose CL-6B.

Table 2. Sepharose CL-6B elution volume and corresponding average molecular weight of purified polysaccharides extracted from fruiting body and cell-free broth of *Hericium erinaceus*.

Sample	Yield(%)	Elution volume(mL)	Average MW
HEB-NP-G	88.0	240	29 kDa
HEB-AP-G	90.0	225	46 kDa
HEF-NP-G1	12.2	120	960 kDa
HEF-NP-G2	52.2	265	14 kDa
HEF-AP-G1	18.5	130	720 kDa
HEF-AP-G2	35.4	270	13 kDa

### 3.4 면역학적 활성 평가

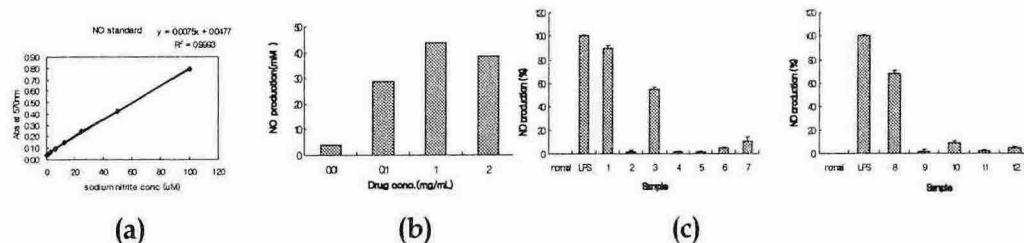


Fig. 5. (a) NO standard curve.

(b) Effect of various crude HEF-P concentrations on nitrate secretion.  
 (C) Effect of lipopolysaccharide(LPS) and various polysaccharides on nitrate secretion. 100% refer the results of LPS(control) which was treated with LPS.

where, 1, c. HEF-P ; 2, HEF-NP ; 3, HEF-AP ; 4, HEF-NP-G1 ; 5, HEF-NP-G2 ; 6, HEF-AP-G1 ; 7, HEF-AP-G2 ; 8, c. HEB-P ; 9, HEB-NP ; 10, HEB-AP ; 11, HEB-NP-G ; 12, HEB-AP-G

### References

- Mizuno, T. (1999), Bioactive substances in *Hericium erinaceus* (Bull.:Fr.) Pers. (Yamabushitake), and its medical utilization, *Int. J. Med. Mushrooms*, **1**, 105-119.