

## 느타리버섯 균사체 액체배양으로부터 항보체 다당 생산에 관한 연구

송치현\* · 김재홍 · 양병근 · 김길웅  
대구대학교 생물공학과

### Studies on the anti-complementary polysaccharides produced from submerged mycelial culture of *Pleurotus sajor-caju*

Chi-Hyeun Song\*, Jae-Hong Kim, Byoung-kun Yang and Kil-Woong Kim

Department of Biotechnology, Daegu University, Kyungsan, Kyungbuk, 713-714, Korea

**ABSTRACT:** The effect of nutritional and cultural conditions for the production of anti-complementary polysaccharide from *Pleurotus sajor-caju* was studied. Maximum anti-complementary activity from its culture broth and mycelium was obtained by using lactose and maltose as a carbon source, respectively. Ammonium phosphate (monobasic) and serine were chosen for the highest activity among the inorganic nitrogen compounds and amino acids tested. Optimum temperature for the production of the anti-complementary polysaccharide was 25°C.

**KEYWORDS:** *Pleurotus sajor-caju*, anti-complementary polysaccharide, culture broth.

자연계에 존재하는 담자균류(Yamada, 1984), 곰팡이류(Saito 등, 1992), 한약재(Yamada 등, 1988) 등에서 높은 면역활성물질의 존재가 확인되고 있어 최근 이들에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 담자균류로부터 추출한 다당성분들은 항암효과(Ikekawa 등, 1969. Yoshioka 등, 1969. Park 등, 1979. Ohmori 등, 1988), 항보체 활성(Yamada 등, 1986), 인터페론 유도활성(Tsunoda and Ishida, 1970), 세포분열 유도활성(Hara 등, 1991), 혈중 콜레스테롤 강하작용(Kaneda and Tokuda, 1966. Suzuki and Oshima, 1976) 등의 많은 약리효과가 보고 되고 있다. 이중 항보체 활성은 면역계중의 보체계를(Roitt, 1988) 활성화시키거나 억제시키는 작용에 기인하는데 보체계는 혈청에 존재하는 단백질균으로서 비특이적으로 작용하여 감염된 병원체를 제거하거나, 염증, 과민반응, 마크로파지 유도 활성등에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

최근 3차 기능성식품에 대한 관심이 증가 되면서 면역증강물질의 연구가 활성화 되고있는데 그중에서도 담자균(Okuda 등, 1972)들로부터 높은 면역활성의 존재가 확인되고 정제와 구조에 대한 해석도 병행되고있다. 이들 활성에 대한 예로서 표고버섯에서 추출한 Lentinan이 항암 및 면역활성 기작 작용이 있음이 보고 되었고(Sasaki와 Takasuka, 1976), 영지버섯 및 구름버섯에서 추출한 다당도 항암 및 항보체 활성(Jeong 등, 1990) 효과가 있음이 알려졌다.

현재까지 이들과 관련된 연구는 자실체로부터 추출한 다당성분과 관련된 것이 주류를 이루고 있고 균사체로부터 생산되는 다당성분에 관한 연구는 초기단계에 있으며, 특히 균사체 액체 배양시의 culture broth로부터 면역활성 증강에 관여하는 활성 다당의 생산조건, 즉 환경 및 영양 요구조건등에 대한 연구는 극히 일부분에 지나지 않다. 따라서 본 연구에서는 우리나라에서 식용으로 기호도가 높은 느타리버섯 균주를 사용하여 균사체 액체 배양액으로부터 면역활성이 높은 다당류 생산의 최적 생리 및 환경 요구 조건에 대하여 조사하였다.

\*Corresponding author

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 느타리 버섯(*Pleurotus sajor-caju* PL-27)균주는 홍콩대학의 S.T.Chang 교수로부터 분양받아 사용하였으며 보관용배지는 PDA (potato dextrose agar)사면 배지를 사용하였고, 액체배양의 기본배지는 Kim(1991)이 보고한 조성 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/l,  $\text{CaCl}_2$  0.6 g/l, glucose 15.0 g/l, ammonium tartrate 1.04 g/l, DL-serine 1.19 g/l, thiamine HCl  $3 \times 10^{-4}$  g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3 g/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02 g/l,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03 g/l,  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.05 g/l, pH4.5)의 배지를 사용하였다.

### 시약

양의 감작 적혈구(IgM hemolysin sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본 동결건조 연구소로부터 구입하여 사용하였으며, 5,5'-diethylbarbituric acid sodium salt는 Merk사 제품을, 정상인의 혈청(Normal human serum, NHS)은 본 실험실에서 신선한 상태로 직접 조제하여 사용하였고, 그외 기타 시약은 시판 일급 혹은 특급시약을 사용하였다.

### 배양 방법

*Pleurotus sajor-caju* 균사를 PDA배지를 함유한 petri-dish상에서 25°C, 8일간 배양한 후 직경 8 mm cork bore로 punching하여 접종원으로 사용하였고, 액체 배양시에는 기본배지를 이용하여 250 ml baffled flask에서 19일간 25°C, 120 rpm에서 배양하였다. 액체배양 균사체의 건조 무게량(dry cell weight, D.C.W)은 여과 또는 원심분리(8000 rpm, 30 min)한후 수거하여 85°C에서 24시간 건조 또는 냉동건조 하여 평량하였다.

### 항보체 활성의 측정

항보체 활성은 Mayer법(Kabat and Mayer, 1961)으로 측정하였다. NHS (normal human serum), GVB<sup>+</sup>(gelatin veronal buffered saline, pH 7.2)와 시료를 각각 50  $\mu\text{l}$ 씩 혼합하여 37°C에서 30분간 반응 시킨후 반응액에 GVB<sup>+</sup>를 350  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하고, 이를 10배에서 160배까지 연속희석하여

750  $\mu\text{l}$ 의 GVB<sup>+</sup>와 양의 감작혈구( $10^8$  cells/ml)를 250  $\mu\text{l}$ 씩 가하여 1시간동안 반응시킨다음 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)를 2.5 ml씩 가하여 원심분리후 상등액의 흡광도를 412 nm에서 측정하였다. 한편 대조구는 동일 조건에서 시료를 함유하지 않은채 측정하였으며 항보체 활성은 대조구 대비 총보체 용혈(50% of total complement hemolysis, TCH<sub>50</sub>)의 저지율(inhibition of TCH<sub>50</sub> 또는 ITCH<sub>50</sub>)로 나타내었다. 시료의 정확한 활성을 검정하기 위해 역가를 알고 있는 항보체 다당 CAP-0(TCH<sub>50</sub>=80%)를 표준물로 하였다.

$$\text{ITCH}_{50}(\%) =$$

$$\frac{\text{TCH}_{50} \text{ of control} - \text{TCH}_{50} \text{ treated with sample}}{\text{TCH}_{50} \text{ of control}}$$

× 100

### 항보체 활성 다당의 추출 및 정제

250 ml baffled flask의 100 ml 배지에 접종원으로서 punching한 disk 1개를 사용하여 25°C, 120 rpm에서 19일간 배양한 후, 원심분리하여 얻은 배양 상등액을 5배의 ethanol을 가하여 24시간 교반하였다. 이것을 8000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 침전물에 소량의 증류수를 가하여 용해 시키고 3일간 4°C 증류수에 투석한 다음, 진공 농축시켜 동결건조하여 시료로 사용하였다.

### 정량 방법

총당량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid방법(Dubois 등, 1956)으로, pentose함량은 arabinose를 표준물질로 하여 phloroglucinol-acetic acid방법(Dische and Borenfreund, 1957)으로 측정하였다. Uronic acid함량은 galacturonic acid를 표준물질로 사용하여 m-hydroxydiphenol방법(Blumenkronz and Asboe-Hansen, 1973)으로, 단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry법(Lowry 등, 1951)으로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

자실체, 균사체, 배양액에서의 항보체 활성 측정

*Pleurotus sajor-caju*의 항보체 활성을 측정하기 위해서 자실체와 균사체는 hot water extract하여 활성다당을 얻었고, 배양액은 기본 배지의 탄소원을 glucose로 하여 배양 후 항보체활성다당을 얻어 이들을 각각 측정하였다(Table 1). 그 결과 균사체와 배양액에서 항보체 활성이 각각  $ITCH_{50}$  85.60%와  $ITCH_{50}$  83.72%로 자실체에서의  $ITCH_{50}$  72.06%보다도 높게 나타났다. 이는 생리적으로 균사체 생장에서 세포외부에 다당류로 구성된 slime층을 형성

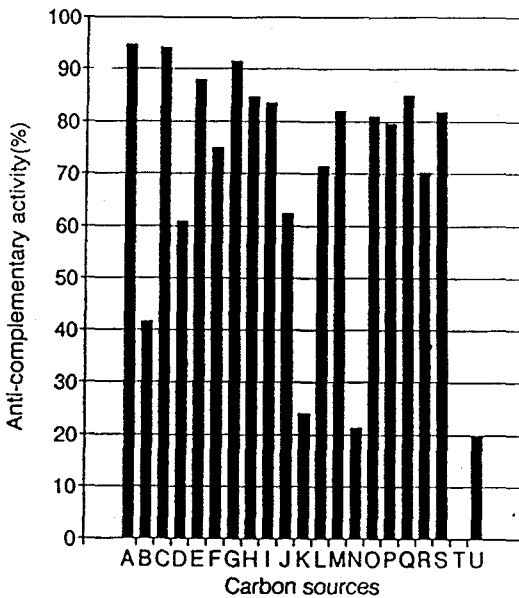
하여 자체방어기작을 높일수 있는 활성다당류 생산이 높은것 때문으로 추측된다. Okuda 등(1972)의 연구에 의하면 자실체에서 추출된 다당의 항보체 활성은 약 50%로 본연구와 비교시 20-30%정도 낮게 나타났는데 이는 다당의 성질로 볼때 자실체로부터 생산된 다당은 불용성다당이 많이 포함 되어 있는 반면 배양액으로 부터 생산된 다당은 수용성 다당이 많기 때문으로 사료된다.

**Table 1.** Anti-complementary activities of polysaccharides produced from the basidiocarp, mycelium and culture broth of *Pleurotus sajor-caju*.

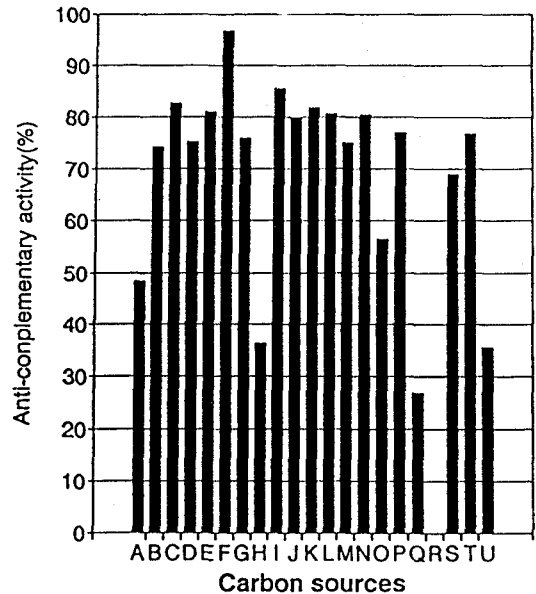
Polysaccharide	Inhibition of $TCH_{50}$ (%)
Basidiocarp	72.06
Mycelium	85.60
Culture broth	83.72

**항보체 활성다당생산에 영양원 및 배양조건이 미치는 영향**

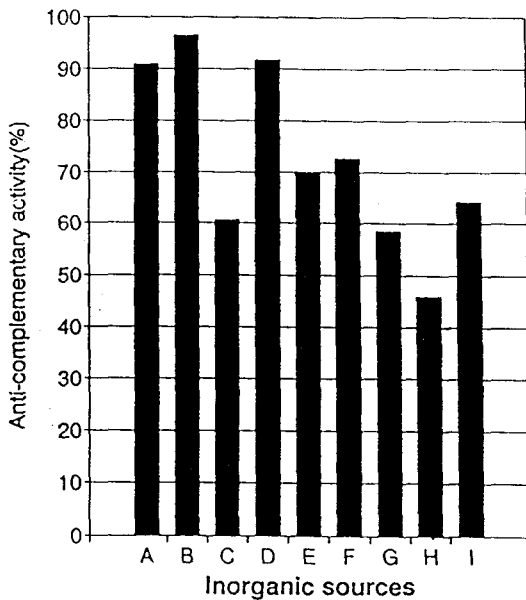
**탄소원의 영향** 버섯류의 균사생장에 단당류, 이당류 또는 다당류등의 다양한 탄소원(Elizabeth, 1982)을 이용하는데 본 실험에서는 *Pleurotus sajor-caju*가 이용할 수 있는 탄소원중 21가지를 배지의 탄소원으로 사용하여 각각 배양한 후 배양액과 균사체에서 분리한 다당의 항보체 활성을 측정



**Fig. 1.** Anti-complementary activity of the polysaccharide from the cultured broth of *Pleurotus sajor-caju* grown in various carbon sources. A: Lactose, B: Salicin, C: Glycerol, D: Cellobiose, E: Ribose, F: Maltose, G: Adonitol, H: Xylose, I: Glucose, J: Fructose, K: Dextrin, L: Mannose, M: Arabinose, N: Inulin, O: Inositol, P: Sorbitol, Q: Galactose, R: Sucrose, S: Mannitol, T: CMC, U: Starch



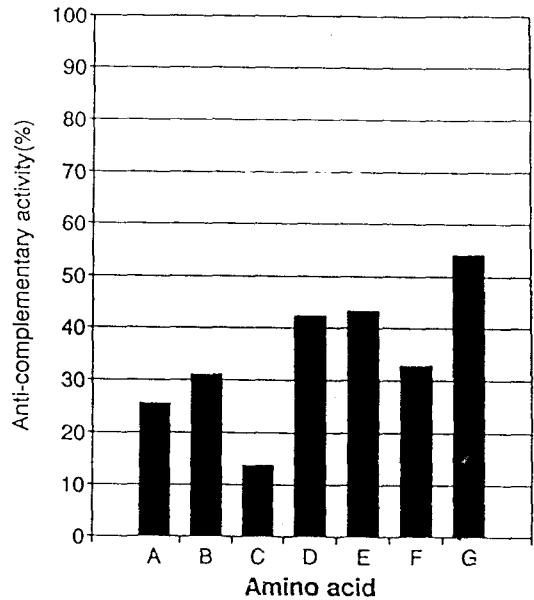
**Fig. 2.** Anti-complementary activity of the polysaccharide from the mycelium of *Pleurotus sajor-caju* grown in various carbon sources. A: Lactose, B: Salicin, C: Glycerol, D: Cellobiose, E: Ribose, F: Maltose, G: Adonitol, H: Xylose, I: Glucose, J: Fructose, K: Dextrin, L: Mannose, M: Arabinose, N: Inulin, O: Inositol, P: Sorbitol, Q: Galactose, R: Sucrose, S: Mannitol, T: CMC, U: Starch



**Fig. 3.** Anti-complementary activity of the polysaccharide from the cultured broth of *Pleurotus sajor-caju* grown in various inorganic nitrogen sources. A:  $KNO_3$ , B:  $NH_4H_2PO_4$ , C:  $NaNO_3$ , D:  $NH_4HCO_3$ , E:  $NH_4Cl$ , F:  $(NH_4)_2HC_6H_5O_7$ , G:  $(NH_4)_2SO_4$ , H:  $NH_4NO_3$ , I:  $(NH_4)_2C_4H_4O_6$ .

하였다. Kim(1991)에 의하면 starch가 *Pleurotus sajor-caju* 균사 생장에 가장 좋은 탄소원이었으나 starch를 탄소원으로 사용한 배양액에서 분리한 다당에서는 낮은 항보체 활성(ITCH 19.94%)을 나타내었다. 그러나 탄소원중 lactose를 사용하였을 때 균사체 생장은 적었지만 항보체 활성은 ITCH<sub>50</sub> 94.70%로 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1). 또한 균사체로부터 추출한 다당의 항보체 활성은 탄소원으로 maltose를 사용하였을 때 ITCH<sub>50</sub> 96.77%로 가장 높게 나타났다(Fig. 2). 따라서 intracellular polysaccharide와 extracellular polysaccharide는 구조와 성질면에서 다른 것으로 사료된다.

**질소원의 영향** 탄소원으로 glucose를 사용한 기본배지에서 다양한 질소원을 배지에 첨가하여 배양한 후 배양액으로부터 활성다당을 분리하여 항보체 활성을 측정된 결과 ammonium tartrate를 질소원으로 사용하였을 때 가장 높은 균사체 생장을 얻을 수 있었지만(Kim, 1991), 그 배양액에서 분리한 다당의 항보체 활성은 낮았다(Fig. 3). 그러



**Fig. 4.** Anti-complementary activity of the polysaccharide from the cultured broth of *Pleurotus sajor-caju* grown in various amino acid sources. A: Leucine, B: Glycine, C: Asparagine, D: Glutamic acid, E: Alanine, F: Aspartic acid, G: Serine

나 균사체생장이 비교적 저조한(Kim, 1991) ammonium phosphate(monobasic)를 질소원으로 사용하였을때 가장 높은 항보체 활성 다당(ITCH<sub>50</sub> 96.43%)를 얻을 수 있었다. 또한 질소원으로 amino acids 중에 serine(Fig. 4)을 사용하였을 때 높은 항보체 활성다당(ITCH<sub>50</sub> 54.18%)를 얻을 수 있었다. 따라서 질소원에 따라서도 구조나 성질이 다른 다당류가 생산되는 것으로 추정되며, 생산된 다당류가 단백질을 축재로 가지는 peptidoglycan으로 추측된다.

**온도의 영향** *Pleurotus sajor-caju*의 균사체 최적 배양온도는 25°C로 보고되었는데(Kim, 1991), 항보체 활성도 같은 온도에서 ITCH<sub>50</sub> 85.60%로 가장 높은 항보체 활성 다당이 생산되었다(Fig. 5). *Flammulina velutipes*의 경우에서도 이와 비슷한 결과(Lee 등, 1994)가 나타났는데 이로 미루어 보아 온도는 항보체 활성다당의 성질에 큰 영향을 미치지 않고 균체의 생장에만 영향을 주는 것으로 사료된다. 이상의 결과들을 종합하여 최적 항보체 활성 다당 생산배지의 조성을 Table 2에 나타내었으며 이

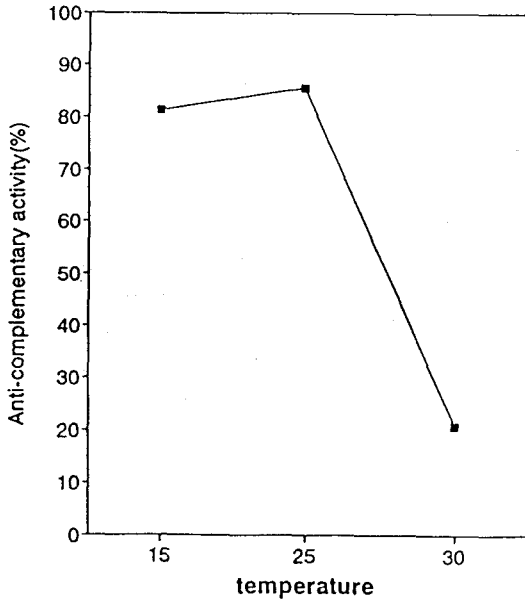


Fig. 5. Anti-complementary activity of the polysaccharide from the cultured broth of *Pleurotus sajor-caju* grown in various temperatures.

Table 2. Medium composition for the maximum production of anti-complementary polysaccharide by *Pleurotus sajor-caju*

Medium composition	Content(g/l)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5
CaCl <sub>2</sub>	0.6
Lactose	15.0
Ammonium phosphate	1.0
DL-Serine	1.19
Thiamin HCl	3 × 10 <sup>-4</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3.0
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.03
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.05

와 같은 조건에서 생산된 다당의 항보체 활성은 ITCH<sub>50</sub> 98.7%로 최대치를 나타내었다.

**다당의 정량**

배양액으로부터 생산된 다당의 total sugar 함량 (Table 3)을 조사하고, 배양액에서 추출한 시료중의 당의 조성을 측정된 결과, 산성당(uronic acid 기준)이 약 20%이상인 경우와 단백질 함량이 약 140 µg/mg인 당단백질 성질을 가진 다당류가 항보

Table 3. Total sugar, uronic acid and protein contents of the polysaccharide produced from *Pleurotus sajor-caju* grown in various carbon sources

Carbon source	Total sugar (%)	Uronic acid (µg/mg)	Protein (µg/mg)
Sorbitol	18.61	6.43	23.77
Maltose	36.58	26.58	100.45
Glucose	38.54	39.27	39.10
Lactose	26.68	19.87	144.40
Adonitol	19.35	16.13	91.24
Ribose	18.93	19.12	84.09
Mannose	32.06	7.18	49.33
Arabinose	32.06	30.31	33.99

체활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 따라서 *Pleurotus sajor-caju*가 분비하는 항보체 활성 다당이 peptidoglycan으로 추정된다.

**적 요**

*Pleurotus sajor-caju*를 각각 다른 영양원과 배양조건에 따라 배양했을 때 항보체 활성 다당 생산에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 탄소원으로는 배양액에서는 lactose를 탄소원으로, 균사체로부터의 열수 추출시에는 탄소원을 maltose로 사용했을 때 가장 높은 항보체 활성 다당을 얻을 수 있었다. 질소원으로는 ammonium phosphate (monobasic), amino acid로는 serine을 배양원으로 하였을 때 활성이 최대치를 나타내었다. 온도조건에서는 25°C에서 최대활성을 나타내었으며 생산된 다당의 조성을 분석한 결과 *Pleurotus sajor-caju*의 배양액에서 분리한 다당은 peptidoglycan으로 나타났다.

**감사의 글**

본 연구는 대구대학교 1995년도 학술 연구비 지원에 의한 결과이며, 이에 감사드립니다.

**참고문헌**

Blumenkronz, N. and G. Asboe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Annal.*

- Biochem.* **54**: 484.
- Dische, Z and E. Borenfreund. 1957. A new color reaction for the determination of aldopentose in presence of other saccharides. *Biochem. Biophys. Acta.*, **23**: 639
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annal. Chem.* **28**: 350
- Elizabeth, M. L. 1982. *Nutritional Requirements for Growth in Fundamentals of the fungi*. 2nd edition, Prentice-Hall, Inc., N. J., p.281.
- Hara, C. Y. Kumazawa, K. Inagak, M. Kaneko, T. Kiho and S. Ukai. 1991. Mitogenic and colony-stimulating factor-inducing activities of polysaccharide fractions from the fruit bodies of *Dictyophora indusiata*. *FISCH. Chem. Pharm. Bull.* **39**: 1615-1616.
- Ikekawa, T., N. Vehara, Y. Maeda, M. Nakamishi and F. Fukuoka. 1969. Anti-tumor activity of aqueous extracts of some edible mushrooms. *Cancer Res.* **29**: 734-735.
- Jeong, H., J. W. Lee and K. H. Lee 1990. Studies on the anti-complementary activity of Korean higher fungi. *Kor. J. Mycol.* **18**(3): 145-148.
- Kabat, E. A. and M. M. Mayer. 1961. *Complement and complement fixation in Experimental Immunochimistry*, 2nd edition, Charles. C. Thomas publisher, Springfield. p459.
- Kaneda, T. and S. Tokuda. 1966. Effect of various mushroom preparations of cholesterol levels in rats. *J. Nutri.* **90**: 371-376.
- Kim, S. J. 1991. Studies on the mycelial and sporophore growth in *pleurotus sajor-caju*. *Master thesis*. Korea Univ.
- Lee, H. K., K. S. Shin, C. H. Song, H. C. Sung and H. C. Yang. 1994. The effect of nutrient on the prduction of anti-complementary polysaccharide by *Flammulina velutipes*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**(4): 360-367.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, L. Farr and R. J. Rindall 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
- Ohmori, T., K. Tamura, A. Wakaiki, G. Kawanishi, S. Tsuru, T. Yadomae and K. Nomoto. 1988. Dissociation of a glucan fraction(CO-1) from protein-bound polysaccharide of *Cordyceps ophioglossoides* and analysis of its antitumor effect. *Chem. Pharm. Bull.* **36**(11): 4512-4518.
- Okuda, T., Y. Yoshioka, T. Ikekawa, G. Chihara and K. Nishioka 1972. Anti-complementary activity of anti-tumor polysaccharides. *Nature New Biol.*, **238**: 59.
- Park, D.W., M. J. Shim and B. K. Kim. 1979. Studies on the constituents of the higher fungi of Korea(XVII). *Seoul Univ. J. of Pharm. Sci.* **4**: 19.
- Roitt, I. 1988. *The basic of immunology in Essential Immunology*, 6th edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford. p.7
- Saito, K., M. Nishijima, N. Ohno, T. Yadomae and T. Miyazaki. 1992. Activation of complement and Limulus coagulation systems by an alkali-soluble glucan isolated from *Omphilia lapidescens* and its less-branched derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**(5): 1227-1230.
- Sasaki, T. and N. Takasuka. 1976. Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Cabohydr. Res.* **47**: 99-104.
- Suzuki, S. and S. Oshima. 1976. Influence of shiitake(*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol. *Mushroom Sci.* **9**(1): 463-467.
- Tsunoda, A. and N. Ishida 1970. A mushroom extract as an interferon inducer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **173**: 719-726.
- Yamada, H., 1984. Structure and antitumor activity of an alkali-soluble polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides*. *Carbohydrate Research* **124**: 107-115.

- Yamada, H., T. Nagai, J. C. Cyong, Y. Otsuka, M. Tomoda, N. Shimizu and R. Gonda. 1986. Relationship between chemical structure and activating potencies of complement by an acidic polysaccharide, plantago-mucilage A from the seed of *Plantago asiatica*, *Carbohydrate Research* **156**: 137.
- Yamada, H, K. S. Ra, H. Kiyohara, J. C. Cyong and H. C. Yang and Y. Otsuka. 1988. Characterization of anti-complementary neutral polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum*. *Phytochem.* **27**: 3163.
- Yoshioka, P., T. Ikekawa, M. Noda and F. Fukuoka. 1969. Studies on anti-tumor activity of some fraction from basidiomycetes. I. An antitumor acidic polysaccharide fraction from *P. ostreatus*(Fe.), *Quel. Chem. Pharm. Bull.* **20**: 1175-1180.