

팽나무버섯의抗癌成分에 관한 研究(第2報)

液內 培養에 의한 抗癌 成分의 生成

禹 洛 植

淑明女子大學校 藥學大學

Studies on Antitumor Components of *Flammulina velutipes* of Korea(II)

Production of Antitumor Component of *Flammulina velutipes* by Submerged Culture

Myoung Sik Woo

College of Pharmacy, Sook Myung Women's University, Seoul 140, Korea

Abstract: To investigate a possibility of producing the antitumor component by shake culture method, the mycelia of *Flammulina velutipes* were cultured in flasks on a shaker at 26~28°C at 180 rpm for seven days. The extract of the mycelia was concentrated under vacuum. The precipitate obtained by adding a three-fold volume of ethanol was centrifugated and freeze-dried after dialysis. The fraction was tested against sarcoma 180 in the mice. The inhibition ratio of the fraction against the tumor was 68.0% at the dose of 20 mg/kg/day for the period of ten days and the tumors in three of the mice were completely regressed. The results showed, therefore, that the antitumor component was produced by the shake culture method.

Keywords: *Flammulina velutipes*, *Tricholomataceae*, Basidiomycete, Antitumor components, Shake culture.

擔子菌類의 子實體의 항암성분이 보고된 후로 擔子菌類의 培養菌絲의 抗癌成分에 관하여도 연구가 활발히 진행되었다. 1966년 Gregory 등은 7,000여종의 擔子菌類의 자실체 및 培養菌絲에 대하여 sarcoma 180, mammary adenocarcinoma 755, 및 leukemia L-1210에 대한 抗癌作用의 有無를 실험하여 그 중에 50 菌株가 양성임을 확인하였다.

우리나라에서도 擔子菌類의 菌絲를 培養하여 抗癌成分을 확인한 보고가 여러편 있다. 즉 박 등(1979)은 표고버섯의 菌絲, 沈 등(1981)은 구름버섯의 菌絲, 姜 등(1981)은 靈芝의 菌絲, 鄭(1982)은 표고버섯의 10 菌株中 DMC-7 菌株, 鄭 등(1982)은 *Pluteus cervinus*의 菌絲의 培養物에서 抗癌成分을 확인하였다.

한편 저자(1983)는 팽나무버섯의 子實體에서 抗癌作用이 있는 고분자 물질을 확인 하였다.

이번 연구에서는 이 팽나무버섯의 菌絲 培養에 의해 抗癌성분이 생성됨을 확인하였으므로 보고하고자 한다.

實驗 材料 및 方法

實驗 材料

본 實驗에 使用한, 송이버섯科(the family *Tricholomataceae*)에 속하는 팽나무버섯 *Flammulina velutipes* (Fr.) Singer의 菌絲는 경기도 수원시 농촌진흥청 농업기술연구소 균이과에서 분양받았다.

液內 培養 實驗

1) 培地

種菌用 배지로는 Difco社의 감자 포도당 한천 배지(PDA)를 사용하였다.

振盪培養에 사용한 배지의 조성을 Table I에 표시하

Taale I. Compositions of the shake culture medium.

Glucose	15g
Peptone	10g
Yeast ext.	10g
KH ₂ PO ₄	0.87g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
CaCl ₂	0.3g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	7mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1mg
Distilled water	1 l
pH 5.0 before autoclaving	

였다. Peptone과 yeast extract는 Difco社의 것을 사용하였다.

2) 培養 方法

A) 種菌 培養

팽나무버섯 *Flammulina velutipes*의 균사를 무균적으로 분리하여 種菌用 사면배지에 이식하여 26 ± 1 °C에서 1주일간 배양하였다.

B) 1次 振盪 培養

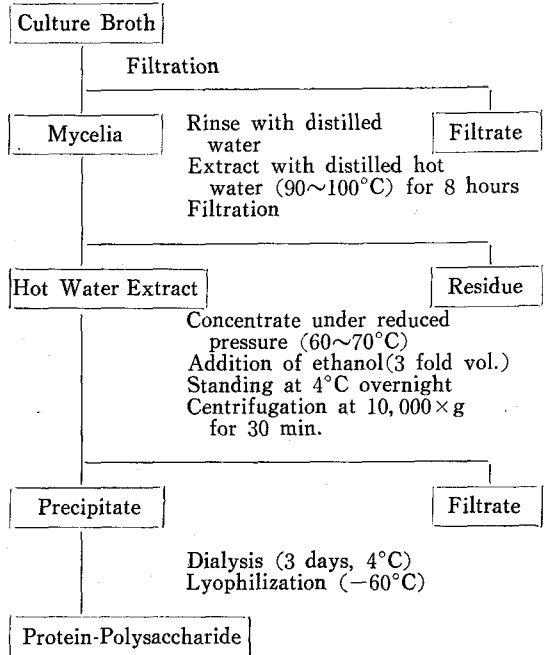
사면 배지의 菌絲體를 무균적으로 분리하여 振盪 培養用 培地 소량을 加하여 무균적으로 blender로서 균질화 하고 100 ml의 振盪 培養用 培地를 加한 500 ml 삼각프라스크에 이식하여 26 ± 1 °C에서 180 rpm의 속도로 orbital shaker incubator (Gallenkamp)에서 7 일간 배양하였다.

C) 2次 振盪 培養

菌絲體를 포함한 1次 振盪 培養液 全體를 무균적으로 blender로서 10초간 균질화하고 무균 pipet로 10 ml 씩 취하여 振盪 培養用 培地 100 ml를 加한 500 ml용 삼각 프라스크에 이식하여 26 ± 1 °C에서 180 rpm의 속도로 7 일간 배양하였다.

抽出 및 分離

培養液을 감압여과하고 菌絲體를 증류수로 세척한후 증류수를 넣어 blender에서 균질화하였다. 이 菌絲體를 수욕상에서 (90~100 °C) 8시간 抽出하고 여과하였다. 잔사를 2回 同一한 方法으로 抽出여과하여 그 여액을 합하여 감압농축하고 농축액의 3배량의 96 % ethanol을 加하여 沈澱 시켰다. 침전을 완결시키기 위하여 4 °C에서 1 일간 방치한 후 원심분리기(Beckman Co. Model J-21)를 使用하여 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 취하고 증류수로서 沈澱物을



(Pale brownish powder)

Scheme I. Preparation of the protein-polysaccharide from the cultured mycelia of *Flammulina velutipes*.

녹였다. 그 용액을 Visking Tube (Visking Co.)로서 4 °C에서 3 일간 투석 하였다. 이 液을 냉동 건조 (-65 °C)하여 담갈색의 분말을 얻었다. 이상의 과정을 Scheme I에 요약하였다.

抗癌 實驗

(1) 實驗 動物 : 서울대학교 動物 사육장에서 구입한 ICR-마우스 웅성(體重 20~25 g)을 사용하였다.

(2) 腫瘍細胞 : 마우스의 복강내에 sarcoma-180 세포 현탁액 0.1 ml (1×10⁷ cells/ml)를 移植하였다. 1주일간 계대배양한 후 암세포의 회석액 0.1 ml (1 × 10⁷ cells/ml)씩을 30 마리의 마우스의 오른쪽 겨드랑이에皮下注射하여 고형암을 유발시켰다.

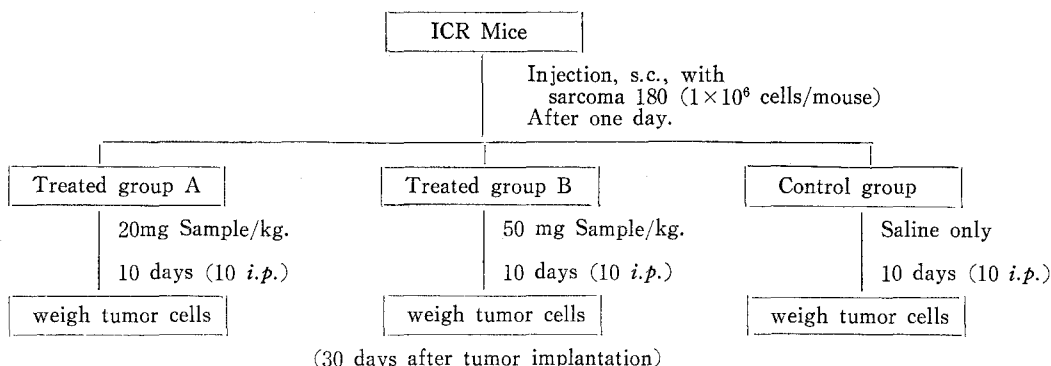
(3) 實驗液의 調製

*Flammulina velutipes*의 菌絲體 抽出物로부터 분리한 건조분말을 使用하여 다음과 같이 실험주사액을 조제하였다.

20 mg/kg 실험액은 분말 40 mg을 10 ml의 saline에 녹이고, 50 mg/kg 실험액은 분말 100 mg을 10 ml의 saline에 各各 용해하였다.

대조액은 saline만을 使用하였으며 실험액들은 멸균하여 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

(4) 動物 實驗



Scheme II. Antitumor test of the protein-polysaccharide from the cultured mycelia of *F. velutipes*.

30 마리의 마우스를 3 그룹으로 나누어서 하나는 대조군, 다른 2 그룹은 처치군으로 하고, 20 mg/kg, 50 mg/kg의 실험액을 각각 투여 하였다.

癌을 移植하고 1 일 지난후 대조군에는 saline만을, 처치군에는 20 mg/kg, 50 mg/kg 의 실험액을 매일 1 회 0.1 ml씩 10 일간 주사하였다. 암이식후 30 일만에 마우스를 모두 처사 시켜 고품암을 적출하고 종양의 무게를 측정하여 그 평균치를 얻었다. 항암작용의 지표로서의 종양의 저지 백분율은 前述한 禹 등(1983)의 항암실험 方法에 따라서 계산하였다(Scheme II).

Table II에 表示하였다.

이 表에서 보는바와 같이 20 mg/kg 투여시 68.4%, 그리고 50 mg/kg 투여시 44.8 %의 종양 저지율을 나타냈다.

이러한 저지율은 팽나무버섯 子實體로부터 추출한 抗癌成分과 유사하였으므로 菌사체의 浸出液 방법으로 그 抗癌成分을 生成시킬 수 있음을 알았다.

한편 종양의 完全退行이 관찰된 마우스는 20 mg/kg 투여시 세마리, 그리고 50 mg/kg 투여시 두마리였다.

結 果

振盪培養에 의한 菌絲의 成長

팽나무버섯 *Flammulina velutipes*의 菌絲를 浸出液 배양 하였을때 菌絲 成長이 양호하여 액내 浸出 배양이 가능하였다.

抗癌 效果

菌絲體로부터 추출 분리한 成分의 抗癌實驗 결과는

Table II. Antitumor activity of the protein-polysaccharide obtained from the cultured mycelia of *F. velutipes*.

Group	Average tumor weight(g)	Inhibition ratio(%)	Complete regression
Control	5.54±0.92 ^a	—	—
20mg/kg/day	1.7 ±0.72 ^b	68.4	3 ^c /10 ^d
50mg/kg/day	3.04±0.72	44.8	2 /10

a : Mean ± S.E.

b : P<0.001

c : The number of mice in which 100% regression of the tumor was observed.

d : The number of mice used.

考 察

팽나무버섯은 腐生菌이므로 발효된 볏짚 등의 유기 물질에서 그 菌絲가 잘 成長할 뿐 만 아니라, 子實體도 비교적 잘 形成한다. 이러한 성질때문에 人工 栽培가 가능하여 대량 생산하고 있다. 그러나 인공 재배법으로 子實體를 생산할 경우, 人力이 많이 필요할 뿐만 아니라 재배솥을 浸洗해야 하고 原料가 대량 소요됨과 아울러 재배기간이 길다는 경제적 결점이 있다.

그런데 팽나무버섯의 子實體를 야채로 食用하는 이외에, 팽나무버섯의 맛과 향기를 주목적으로 하는 수율을 제조할 경우, 子實體를 반드시 만들지 않고 菌絲만을 대량 생산하여도 수율의 제조 原料로 이용할 수 있다.

더 나아가서 팽나무버섯의 抗腫瘍 成分만을 대량 생산코자 할 때는 비경제적인 子實體 재배법에 의존하지 않고, 그 菌絲를 대량 成長시킨 후 그 成分을 추출하는 법이 더 능률적인 공업적 生産법이 될 수 있다.

이번 연구에서는 팽나무버섯의 子實體로부터 분리한 菌絲를 적절한 영양소가 알맞게 함유된 액체 배지에서 배양하여 菌絲를 成長시킬 수 있음을 실제 증명하였다. 뿐만 아니라 이와같이 배양된 菌사체로부터 추출해낸 단백질 당단류가 역시 흰귀의 육종 180호에

대하여 현저한 종양 억제율을 발현하였음을 실증하였다. 더우기 이 단백질 다당류 투여군 10 마리중 세마리에서 육종의 完全 退行을 관찰하였다. 그러므로 子實體중에 함유되어 있는 항종양성 단백질 다당류를 팽나무버섯의 균사를 액내 진탕 배양법으로 대량 생산할 수 있음을 입증하였다.

結 論

팽나무 버섯의 菌絲를 진탕배양 하였을 때 菌絲體의 성장이 양호하였으며 이 菌絲體로 부터 추출된 단백질 다당류는 sarcoma 180에 대해 抗癌作用을 나타내었다. 즉 菌絲 培養法으로 그 항암성분을 생산할 수 있었다.

감사의 말씀

이 研究를 지도하여 주신 魯一協 教授님께 감사를 드립니다. 助言과 協助를 해주신 서울大學校 藥學大學 金炳珪 教授님과 崔應七 助教授 그리고 도움을 준 鄭敬壽 博士, 姜昌律 碩士 및 金淑姬 碩士에게 감사하느니 바입니다.

參 考 文 獻

Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T., and Fukuoka, F. (1919): *Nature* 222, 687.

Chung, K.S., Shim, M.J., and Kim, B.K. (1978): *Arch. Pharm. Res.* 1, 33.

Chung, K.S. (1979): *Arch. Pharm. Res.* 2, 25.

Chung, K.S. (1982): *Kor. J. Mycol.* 10, 33.

Chung, K.S., Choi, E.C., Kim, B.K., Kim, Y.S., and Park, Y.H. (1982): *Arch. Pharm. Res.* 5, 17.

Gregory, F.J., Healy, E.M., Agersborg, H.P. K., Jr., and Warren, G.H. (1966): *Mycologia* 58, 80.

Ikakawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G., and Fukuoka, F. (1968): *Gann* 59, 155.

Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M., and Fuktoka, F. (1969): *Cancer Res.* 29, 734.

Kang, C.Y., Shim, M.J., Chol, E.C., Lee, Y.N., and Kim, B.K. (1981): *Korean Biochem. J.* 14, 101.

Kim, B.K., Lee, D.K., Lee, C.O., and Han, S.S. (1979): *Kor. J. Mycol.* 7, 83.

Kim, B.K., Park, E.K., and Shim, M.J. (1979): *Arch. Pharm. Res.* 2, 145.

Kim, B.K., Chung, H.S., Chung, K.S., and Yang, M.S. (1980): *Kor. J. Mycol.* 8, 107.

Kim, B.K., Choi, E.C., Chung, K.S., Kang, C.Y., Kim, S.H., Kim, J.S., Kim, Y.J., Lee, K.L., and Lee, C.K. (1982): *Arch. Pharm. Res.* 5, 21.

Kim, B.K., Robbers, J.E., Chung, K.S., Chung, H.S., and Choi, E.C. (1982): *Kor. J. Mycol.* 10, 111.

Komatsu, N., Okubo, S., Kimura, S., Kimura, K., Saito, G., and Sakai, S. (1969): *Gann* 60, 137.

Min, H.K., Choi, E.C., and Kim, B.K. (1980): *Kor. J. Mycol.* 8, 13.

Park, E.K., Choi, E.C., and Kim, B.K. (1979): *Arch. Pharm. Res.* 2, 153.

Park, D.W., Shim, M.J., and Kim, B.K. (1979): *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* 4, 19.

Shibata, S., Nishikawa, Y., Cheng, F.M., Fukuoka, F., and Nakanishi, M. (1968): *Gann* 59, 159.

Shim, M.J. (1981): *Kor. J. Mycol.* 9, 49.

Woo, M.S. (1983): *Kor. J. Mycol.* 11, 69.

<Received August 30, 1983>