

산업폐자원을 이용한 발효에 의한 영지의 항고혈압 성분의 생산

이권행 · 정 훈 · 김영일 · 김병각*
일양약품(주)중앙연구소, *서울대학교 약학대학

Production of Antihypertensive Constituents from *Ganoderma lucidum* IY005 by Fermentation Using Industrial Wastes

Kweon-Haeng Lee, Hoon Jeong, Young-Il Kim and Byong-Kak Kim
Central Institute of Research, Il Yang Pharmaceutical Co., Ltd. Yongin 449-900 and
*Department of Microbial Chemistry, College of Pharmacy,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT : Fruit bodies of *Ganoderma lucidum* have been used for most pharmacological studies, but pharmacological effects are likely variable because the habitats and strains of *Ganoderma lucidum* are different. Therefore, their fermentation is required to produce constant and reliable pharmacological constituents from *Ganoderma lucidum*. During the studies of medium for industrial application, it was found that ginseng root residues, remaining after being extracted with ethanol, were a good carbon source for a fermentation of *Ganoderma lucidum* and a corn steep liquor was also economical for the nitrogen source. Yield of the mycelial cultured in ginseng root residues and corn steep liquor was 2.5 times higher than that in glucose and peptone, known as a conventional medium of *Ganoderma lucidum*. The polysaccharide content of the extracts from the cultured mycelia was higher than that from fruit bodies, but protein content was *vice versa*. Extracts of the cultured mycelia were more effective and lasting than extracts of the fruit bodies in decreased hypertension of spontaneously hypertensive rats (SHR).

KEYWORDS : *Ganoderma lucidum*, Ginseng root residues, Corn Steep Liquor, Fermentation, Antihypertensive constituents

영지, *Ganoderma lucidum*(Fr.) Karsten는 구멍장이 버섯과(Polyporaceae)에 속하는 담자균류로 일명 만년버섯, 신초, 선초, 불사초 및 불노초라고 부른다. 중국의 가장 오래된 약물서인 신농본초경에 영지는 흑지, 적지, 청지, 자지 및 황지 등 6종으로 분류되어 있으며, 이들은 이뇨, 보간, 강장, 정신안정작용, 관절염, 해소 및 기관지염 등의 치료에 광범위하게 사용되었음을 기술하고 있다.

영지는 희귀품으로 알려져 왔으나, 1972년 중국에서 인공재배에 성공한 이래 일본 및 한국에서도 재배가 활발히 진행되었으며, 이와 병행하여 약리 실험을 통한 약효의 규명에도 많은 진전을 보았다. 1979년 有地 등이 영지의 열수 추출액이 자연발증 고혈압 쥐의 혈압을 강하시킴을 보고한 이래, 영지의

고지혈증 개선 효과(久保 등, 1980), 항암 효과(Kim 등, 1980), 혈전 억제 효과(Kubo 등, 1985), Insulin 분비 촉진 효과(木村 등, 1983; Hikono 등, 1989), 알레르기 예방 효과(Kohda 등, 1985) 및 보체계 활성화 효과(Lee 등, 1990; Jeong 등, 1990) 등에 관한 연구가 이루어져 보고되었다. 이와 같은 영지에 대한 약리 실험은 대부분 자실체를 이용하였으나, 영지의 약효는 산지에 따른 균주의 차이에 의해 변화할 수 있으므로(久保 등, 1980), 균일한 약효 성분을 얻기 위해서는 우수한 종균을 선발하여, 액체배양할 필요가 있다.

본 연구에서는 영지의 유효 성분을 경제적이면서도 단시일내에 대량 생산할 수 있는 기틀을 마련하기 위해, 산업폐자원이나 부산물을 이용한 배지에서

영지의 균사체의 배양 방법을 검토하였고, 액체배양으로 얻은 균사체와 자실체의 혈압강화 효과를 비교하였다.

材料 및 方法

자실체

영지의 자실체는 경기도 고양군 지도읍에서 자생하는 삿갓 형태의 것으로부터 균사를 분리하여, 이를 일양약품에서 인공재배하여 얻어진 삿갓 형태의 것을 사용하였다.

균주

본 실험에 사용한 균주 *Ganoderma lucidum* IY 005는 본 실험에서 사용된 자실체로부터 분리하여 사용하였다.

배지

균주 보관을 위한 사면배지로는 potato dextrose agar(PDA)를 사용하였으며, 액체배양용 기본배지는 5%의 포도당과 2%의 펩톤에 basic mineral(BM)을 첨가시킨 것으로, BM은 배지 1/당 KH_2PO_4 870 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500 mg, CaCl_2 300 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 7 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 mg 및 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mg으로 이루어져 있다. 산업적 응용을 위한 배지 중 탄소원으로는 당밀(대한제당), 구기자박(일양약품) 및 인삼박(일양약품)을 사용하였으며, 질소원으로는 탈지대두분(동방유량)과 corn steep liquor(CSL, 두산곡산)를 사용하였다. 당밀은 3배의 물을 가해 용해시킨 후 90°C로 15분간 가열한 뒤 10시간 정지하여 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액에 소석회를 가해 10시간 정지시킨 후 상등액을 회수하여 진한 황산으로 pH 4.8로 조정하여 사용하였다. 구기자박과 인삼박은 젖은 상태의 것에 5배 무게의 물을 각각 가해 121°C에서 30분간 추출한 후 여과하여 사용하였다.

종균 배양

사면배지에서 균사체를 분리하여 소량의 액내배양용 기본배지에 가한 후 homogenizer로 균질화시켜 100 ml의 액내배양용 기본배지가 들어 있는 500 ml 배양용 플라스크에 이식하여 25°C에서 120 rpm으로 6일간 진탕배양하였다.

본 배양

조성이 다른 배지가 100 ml씩 들어 있는 500 ml

배양플라스크에 균질화된 종균 배양액 1 ml씩을 접종하여 25°C에서 6일간 진탕배양하였다.

균체의 정량

발효액을 여지(Toyo No. 2)로 여과하여 배양 여액을 제거한 후 얻어진 배양 균체를 여지와 함께 110°C에서 8시간 동안 건조시켰다. 건조 균체의 무게는 전체 무게에서 여지의 무게를 제외하여 계산하였다.

Fermentor 배양

균체를 포함한 배양액 전체를 균질화시킨 종균을 fermentor(Marubishi, MD300)에 1%(v/v)되게 접종하였으며, 이 때 working volume은 3l로 하고 교반속도는 300 rpm, 통기량은 1.0 vvm으로 하여 25°C에서 6일간 배양하였다. pH 조정액으로는 0.5 N NaOH, 소포제로는 silicone resin을 사용하였다.

항고혈압 성분의 추출 및 분리

영지 자실체에 20배의 물을 가해 121°C에서 2시간 동안 추출한 후 여과하여, 여기서 얻어진 여액을 감압 농축하고, 농축액 부피의 2배의 에탄올을 가해 4°C에서 24시간 방치한 후 6000×g에서 20분간 원심분리하여 상등액은 버리고 침전물은 소량의 증류수로 녹여 흐르는 물에 3일 동안 투석한 후 냉동 건조하였다. 발효액의 경우는 균체를 포함한 원액을 그대로 121°C에서 2시간 추출하여 여과한 후 상기와 동일한 방법으로 항고혈압 성분을 얻었다. 항고혈압 성분은 단백다당류로 이들의 당함량은 Anthrone법으로, 단백질 함량은 Lowry법으로 측정하였다.

혈압강화 실험

영지의 자실체와 발효액에서 얻어진 항고혈압 성분을 웅성의 자연발생 고혈압 쥐(SHR, 200-250g)에 200 mg/kg씩 경구투여하고, 0, 1, 3 및 5시간 후에 physiograph를 이용하여 혈압을 측정하였으며, 1군은 3마리씩으로 혈압은 평균치를 기록하였다.

結果 및 考察

산업적 응용을 위한 액내배양용 배지의 선정

실험실적으로 영지를 배양하기 위해서는 탄소원으로서 포도당이나 전분을 사용하며, 질소원으로는 펩톤이나 yeast extract를 이용하나(Kang 등, 1981), 산업적으로 응용하기 위해서 대량 배양할 경우, 배지의 비용을 절감하기 위해 새로운 배지의 개발이

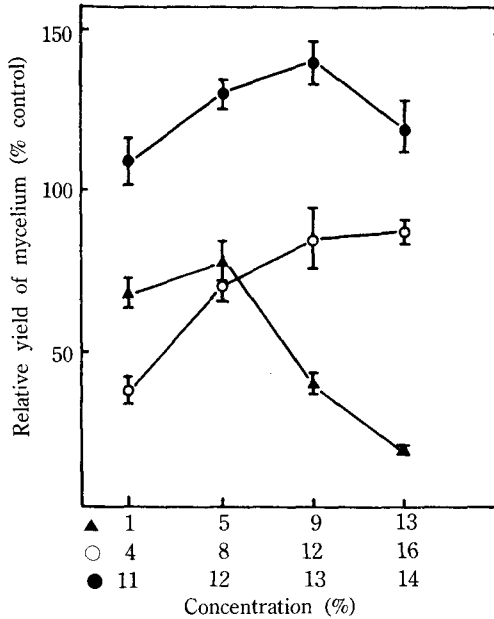


Fig. 1. Mycelial yields of *Ganoderma lucidum* IY005 dependent on concentration of the industrial wastes as carbon source.
 -●- ginseng root residues, -▲- molasses, -○- *Lycium chinense* residues.
 Mycelial yields were expressed as a relative value to the control (glucose).

필요하다. 따라서 본 연구자들은 산업폐기물이나 부산물인 당밀, 인삼박 및 구기자박을 탄소원으로, 탈지대두분과 corn steep liquor를 질소원으로 하여 영지를 배양한 후 건조균체의 양을 비교하여, 이들의 산업적 응용 가능성을 검토하였다.

탄소원 선정을 위해 당밀, 구기자박 및 인삼박의 농도에 따른 균체의 수율을 측정된 결과, Fig. 1에서와 같이 당밀의 농도가 5%일 때 대조군인 포도당의 0.77배에 지나지 않아 영지의 배양에 있어서 탄소원으로는 적당하지 못했다. 구기자박의 경우, 농도가 증가할수록 균체의 수율이 증가하여 16%에서 최대를 이루었으며, 이 때의 수율은 대조군인 포도당의 0.87배로 그 이상의 농도에서도 균체의 수율은 증가하지 않았다.

인삼박의 경우, 13%에서 균체의 수율이 최대를 나타냈으며, 이 때의 수율은 대조군인 포도당을 사용하였을 때의 1.4배였다. 이와 같은 결과는 Shim (1981)이 구름버섯의 배양에 인삼박을 생육 촉진 물질로 사용하였던 것과는 달리, 영지의 배양에서는

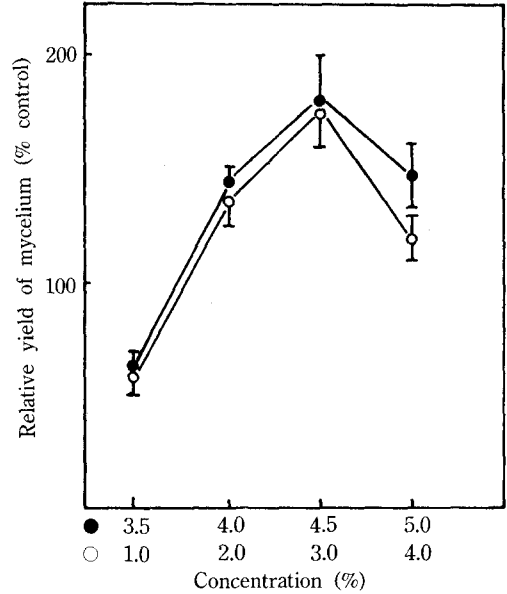


Fig. 2. Mycelial yields of *Ganoderma lucidum* IY005 dependent on coccentration of nitrogen sources, soybean flour or CSL, with glucose as carbon source.
 -●- soybean flour, -○- CSL.
 Mycelial yields were expressed as a relative value to the control (peptone).

인삼박 자체가 완전한 탄소원으로서 사용될 수 있음을 보여주는 것이다. 질소원을 선정하기 위해 탄소원으로 5%의 포도당이 함유된 배지에 질소원으로 탈지대두분과 corn steep liquor를 농도별로 첨가하여 영지를 배양한 결과, Fig. 2와 같이 탈지대두분의 농도가 4.5%일 때 균체의 건조 중량이 가장 높았고, corn steep liquor의 경우는 농도가 3%일 때 균체의 건조 중량이 가장 높았으며, 이들의 수율은 질소원 대조군인 펩톤을 사용하였을 때의 각각 1.84배와 1.71배에 달하였다.

산업적 응용을 위한 탄소원과 질소원을 선택하기 위해, 상기 3종의 탄소원과 2종의 질소원을 최적 농도로 각각 조합하여 영지를 배양한 결과, Table I과 같이 인삼박과 탈지대두분을 조합하여 영지를 배양한 것의 건조 균체 중량이 1.28g/100 ml로 포도당과 펩톤을 사용한 대조군의 0.51g/100 ml보다 약 2.5배가 높았다.

질소원으로는 탈지대두분을 사용하였을 경우는 corn steep liquor보다 균체의 수율이 약간 높으나, 경제적인 측면을 고려하여 볼 때 corn steep li-

Table I. Mycelial yields of *Ganoderma lucidum* IY005 in media combined with various carbon and nitrogen sources.

Nitrogen sources	Dry weights of mycelium (g/100 ml)		
	Peptone (2%)	Soybean flour (4.5%)	CSL (3%)
Carbon sources			
Glucose (5%)	0.51	0.94	0.87
Molasses (5%)	0.39	0.95	0.89
<i>Lycium chinense</i> residues (16%)	0.45	0.79	0.78
Ginseng root residues (13%)	0.72	1.28	1.25

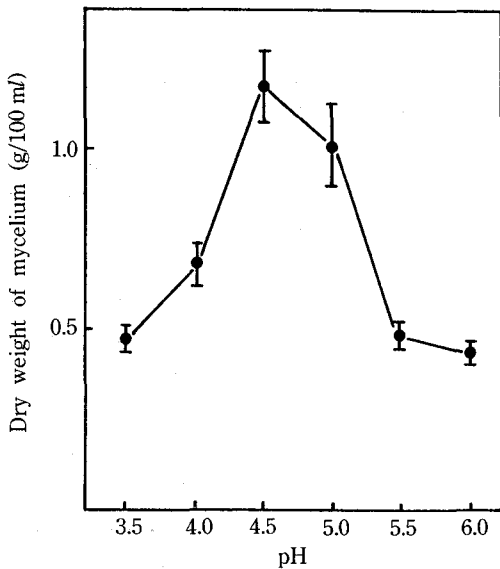


Fig. 3. Effect of pH on mycelial growth of *Ganoderma lucidum* IY005 in ginseng root residues and CSL.

quor를 사용하는 것이 유리하므로 영지의 대량 배양에서의 질소원으로는 corn steep liquor을 사용하는 것이 적절하다고 생각된다.

pH의 영향

인삼박과 corn steep liquor가 조합된 배양액의 pH를 달리하여 25°C에서 5일 동안 진탕 배양한 후 균사체의 성장을 비교한 결과, Fig. 3과 같이 pH가 4.5일 때 균체의 성장이 양호하였으며, 4.0 이하나, 5.5 이상에서는 균체의 성장이 급격히 저하되었다.

배양온도의 영향

인삼박과 corn steep liquor가 조합된 배지의

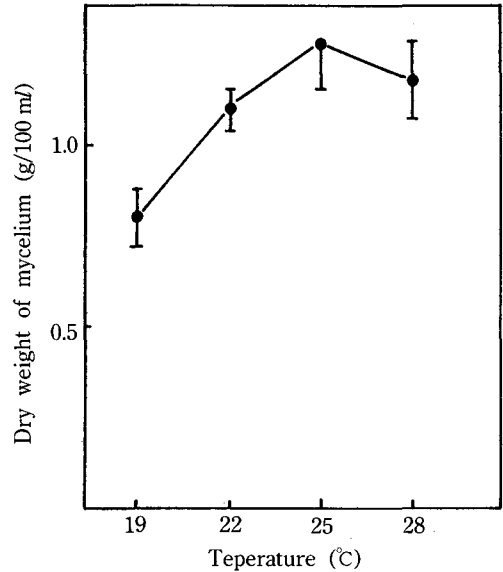


Fig. 4. Effect of temperature on mycelial growth of *Ganoderma lucidum* IY005 in ginseng root residues and CSL.

pH를 4.5로 조정하여 1%의 종균을 접종한 후 온도를 19°C에서 28°C까지 변화시키며 5일 동안 배양하였다. 그 결과 25°C에서 생육이 가장 양호하였다(Fig. 4).

Fermentor 배양시의 발효 양상

최적 조건하에서 생육양상을 살펴보기 위해, 인삼박과 corn steep liquor가 조합된 배지를 pH 4.5로 조정하여, 온도 25°C, 교반속도 300 rpm 및 통기량을 1.0 vvm으로 고정하고 1%의 종균을 접종한 후 fermentor(Marubishi MD300)에서 배양하면서 24시간마다 균체의 건조 중량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 영지는 24시간의 잠복기를 거쳐 3일 동안 대수적으로 생육하였으며, 배양 4일 후에는 정지기에 들어갔다. 배양액의 pH는 초기 4.5에서 배양 기간이 경과함에 따라 증가하여 배양 6일 이후에는 거의 6.0에 이르렀다. 용존산소의 농도는 배양 초기 16 ppm에서 균사가 성장함에 따라 산소의 요구량이 증가하여 배양 4일째에 5 ppm 정도로 감소하였다가 그 이후 다시 증가하였다.

영지 균사체의 추출

영지 균사체의 추출 조건을 살펴보기 위해 fermentor에서 배양된 영지 발효액 100 ml/씩을 100°C 및 121°C에서 시간을 달리하며 추출한 결과, 100°C에서 추출한 것보다는 121°C에서 추출한 것이 증발잔사량,

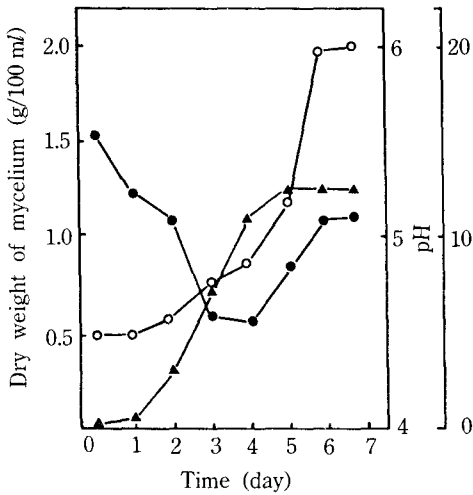


Fig. 5. Fermentation pattern of *Ganoderma lucidum* IY005 in ginseng root residues and CSL. -●- dissolved oxygen, -○- pH, -▲- dry weight of mycelium.

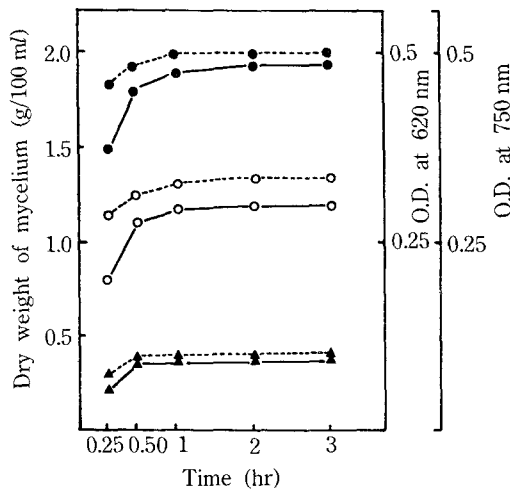


Fig. 6. Correlation of temperature and time in extraction of the fermented *Ganoderma lucidum* IY005. -●- dry weight of extract, -○- polysaccharide content, -▲- protein content, - - - 100°C, --- 121°C.

당함량 및 단백질함량이 약간 높았으나, 모두 2시간 이후 거의 평형상태에 도달하였다(Fig. 6). 이러한 결과는 발효액 중에 건조 균체 중량의 80배 정도의 수분을 함유하고 있어, 충분한 추출 용매로 이용되기 때문에 별도의 용매를 가하지 않더라도 추출 효과가 좋은 것으로 생각된다.

혈압강하 실험

영지 자실체와 균사체로부터 열수로 추출된 단백

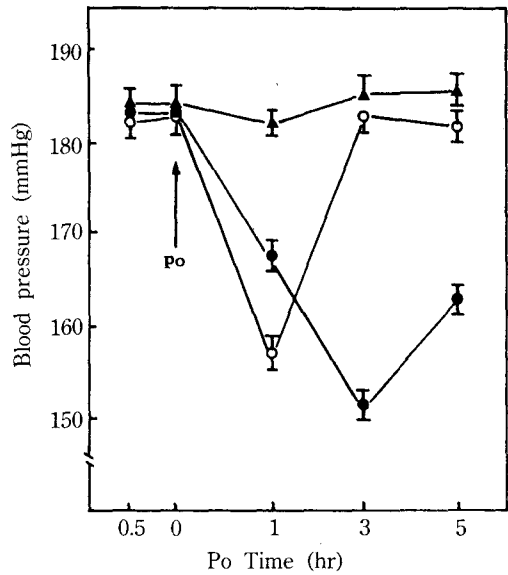


Fig. 7. Effect of protein-bound polysaccharide from *Ganoderma lucidum* IY005 on blood pressure of SHR. -▲- Control (saline), -●- 200 mg/kg of protein bound polysaccharide from cultured mycelium -○- 200 mg/g of protein-bound polysaccharide from fruit body.

다당류를 자연발증 고혈압 쥐(SHR)에 200 mg/kg씩 경구투여하고 혈압을 측정하였다. 시료가 함유되지 않은 생리식염수를 투여한 대조군의 혈압은 유의할 만한 변화가 없었으나, 자실체의 단백다당류를 투여한 군은 약물투여 1시간 후에 최저 혈압을 나타냈으며, 이 때의 혈압강하치는 26.3 mmHg였다. 균사체의 단백다당류를 투여한 군은 자실체의 것보다 약물의 흡수가 느려 약물 투여 3시간 이후 최저 혈압을 나타냈으며, 이 때의 혈압강하치는 31.6 mmHg로 자실체의 경우보다 우수하였고, 혈압강하 작용도 자실체보다 지속적으로 나타났다(Fig. 7).

영지 발효액과 자실체의 함량비 추정

영지의 발효액과 자실체의 함량비 추정은 영지에서 얻어지는 단백다당류와 당의 함량을 기준으로 하여 각각 환산하였다. 이러한 환산 근거는 혈압 강하 실험(有地 등, 1979) 및 항암 실험(Kim 등, 1980) 등의 약리 실험에서 단백다당류 성분이 시료로 사용되었으며, 특히 약리 활성을 강하게 나타내는 분획이 당류로 추정되고 있기 때문이다(水野 등, 1984, 1985). 영지자실체의 단백다당류 수율 및 당함량은 각각 2.6% 및 14.8%이고 균사체의 경우는

Table II. Protein-bound polysaccharide yields of the mycelium and the fruit body of *Ganoderma lucidum* IY005

Samples	Yields of protein bound polysaccharide (%)	Polysaccharide contents (%)	Protein contents (%)
Fruit body	2.60	14.8	44.6
Mycelium	0.75	38.1	12.8

각각 0.75%와 38.1%이므로(Table II), 자실체 1g에 상당하는 발효액의 양은 단백질당류의 수율만을 기준으로 하였을 경우는 3.47 ml이었고, 단백질당류의 수율과 함량을 복합적으로 고려하였을 경우는 1.35 ml였다. 그러나 이러한 환산근거는 보다 많은 약리 실험을 통해 보완되어야 할 것으로 생각된다.

摘 要

영지의 유효 성분을 공업적으로 대량 생산하기 위해서는 탄소원으로 인삼박을 질소원으로 corn steep liquor를 배지로 사용하는 것이 좋았으며, 이때의 균사체 건조 중량은 1.25g/100 ml로 탄소원으로 포도당, 질소원으로 펩톤을 사용한 대조군보다 2.5배가 높았다. 균사체의 추출은 발효액을 그대로 121 °C(1 kg/cm²)에서 2시간 정도 추출하는 것이 적당하였으며, 이런 조건으로 추출하였을 때 발효액의 단백질당류의 수율은 0.75%로 동일 조건하에서 자실체의 수율인 2.6%의 0.29배였다. 균사체에서 얻어진 단백질당류의 당함량은 38.1%로 자실체에서 얻어진 것의 당함량인 14.8%의 2.6배였다. 영지에서 추출된 단백질당류로 고혈압 쥐를 이용한 혈압 강하 실험에서 자실체의 경우 최대 혈압 강하치는 26.3 mmHg였으며, 균사체의 경우는 31.6 mmHg로 균사체가 자실체보다 혈압 강하 효과가 우수하고 지속적이었다. 자실체 1g에 상당하는 발효액의 양은 단백질당류의 수율을 기준으로 하면 3.5 ml였고, 단백질당류의 수율과 당함량을 고려할 경우는 1.4 ml였다.

參考文獻

Hikono, H., Ishiyama, M., Suzuki, Y. and Konno, C. (1989) : Mechanism of hypoglycemic activity of ga-

noderan B : A glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med.* 55 : 423-428.

Jeong, H., Lee, J.W. and Lee, K.H. (1990) : Studies on anticomplementary activity of Korean higher fungi. *Kor. J. Mycol.* 18 : 145-148.

Kang, C.Y., Shim, M.J., Choi, E.C., Lee Y.N. and Kim, B.K. (1981) : Studies on antineoplastic components of Korean basidiomycetes, mycelial culture and antineoplastic component of *Ganoderma lucidum*. *Kor. Biochem. J.* 14 : 101-112.

Kim, B.K., Chung, H.S. and Yang, M.S. (1980) : Studies on the antineoplastic components of Korean basidiomycetes. *Kor. J. Mycol.* 8 : 107-113.

Kohoda, H., Tokumato, W., Sakamoto, K., Fuji, M., Hirai, Y., Yamasaki, K., Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S. and Ushida, M. (1985) : The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr) Karst., histamine release inhibitory triterpenes. *Chem. Pharm. Bull.* 33 : 1367-1374.

Kubo, M., Tatsuda, H., Nogami, M., Arichi, S. and Takahashi, T. (1983) : Studies on *Ganoderma lucidum* (IV), effects on the disseminated intravascular coagulation. *Yakugaku Zasshi* 103 : 871-877.

Lee, J.W., Chung, C.H., Jeong, H., Lee, K.H. (1990) : Effects of alkali extract of *Ganoderma lucidum* IY007 on complement and reticuloendothelial system. *Kor. J. Mycol.* 18 : 137-144.

Shim, M. J. (1981) : Studies on constituents and culture of the higher fungi of Korea. *Kor. J. Mycol.* 9 : 49-66.

久保道徳, 松田秀秋, 田中基晴, 木村善行, 谿忠人, 有地滋, 奥田拓道, 桐ヶ谷紀昌 (1980) : 영지 (*Ganoderma lucidum*, 자실체)의 연구 (제 3보), 만년버섯 열수추출액기스의 실험적 고지혈증에 대한 작용. 기초와 임상 14 : 2455-2460.

木村善行, 奥田拓道, 有地子, 高橋猛 (1983) : 영지의 당대사에 미치는 영향. 기초와 임상 17 : 17-20.

水野卓, 加藤尚美, 戸塚蕉史, 竹中一秀, 新海健吉, 清水雅子 (1984) : 영지의 수용성 다당류 분획, 구조, 항종양 활성에 대하여. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 58 : 861-870.

水野卓, 鈴木繪理, 牧浩司, 田牧秀男 (1985) : 영지의 수불용성 다당류 분획, 구조, 화학수식, 항종양 활성에 대하여. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 59 : 1143-1151.

有地滋, 谿忠人, 久保道徳, 松田秀忠, 吉村成年, 桐ヶ谷紀昌 (1979) : 영지 (*Ganoderma lucidum*)의 연구 (제 1보), 만년버섯 열수추출액기스의 혈압강하 작용. 기초와 임상 13 : 4239-4244.

Accepted for Publication on January 8, 1991