

## *Ganoderma lucidum* IY009 균사체로부터 추출된 ganoderan의 항암 및 항보체 활성화에 미치는 탄소원의 영향

한만덕\* · 이준우<sup>1</sup> · 정 훈<sup>1</sup> · 정성균<sup>1</sup> · 이승룡<sup>1</sup> · 윤경하

순천향대학교 생물학과

<sup>1</sup>일양약품 중앙연구소 생물공학연구실

### The effects of carbon sources on antitumor and anticomplementary activities of Ganoderan extracted from the mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009

Man-Deuk Han\*, June-Woo Lee<sup>1</sup>, Hoon Jeong<sup>1</sup>, Sung-Kyun Chung<sup>1</sup>,  
Seung-Yong Lee<sup>1</sup> and Kyung-Ha Yoon

Department of Biology, Soonchunhyang University, Chungnam 347-400

<sup>1</sup>Biotechnology Lab. IL Yang Pharm. Co., Ltd. Kyunggi 449-900, Korea

**ABSTRACT:** Ganoderan, antitumor  $\beta$ -glucan from *Ganoderma lucidum* was extracted from the mycelium of *G. lucidum* IY009 which was cultured in various carbon sources. The mycelium was shown to be capable of utilizing various carbon sources, e.g., soluble starch, fructose and glucose, and differs in morphology on carbon sources. In radioisotope assay, about 5.2~16% of glucose was to be incorporated in ganoderan of the mycelium. The monosugars of these ganoderan were mainly consisted of glucose, mannose, galactose. The galactose was not good carbon source for growing the mycelium but the best carbon source for producing the potentialized-ganoderan on the antitumor and anticomplementary activity. The tumor inhibition ratio of ganoderan-GAL, obtained from galactose medium, was 83.6% at the dose of 20 mg/kg/day. This crude polysaccharide was composed of five monosaccharide and the protein contained 16 amino acids. Also, ganoderan-GAL increased the anticomplementary activity than that obtained from any other media. This fact suggests that the structural differences of ganoderan influence the antitumor and anticomplementary activity.

**KEYWORDS:** *Ganoderma lucidum*, ganoderan, polysaccharide, antitumor and anticomplementary activity, carbon sources

항암활성의 잠재력을 갖고 있는 생리적 활성 다당류에 대한 연구는 효모로부터 추출된 zymosan이 sarcoma 180 고형 암의 성장을 억제한다는 보고 이래(Bradner *et al.*, 1958, Bast *et al.*, 1974), 현재 까지 지속되고 있다(Franz, 1989). 영지로부터 분리된 다당류 역시 종양에 대한 생물학적 반응 조절물질(biological response modifier, BRM)로 인식되어 있다(水野 卓, 1992). 지금까지 영지의 항암성 다당

류는 자실체 및 균사체에 따라, 혹은 분리 및 추출 조건에 따른 분획별로 정제하여 이들의 항암 활성화에 대한 연구가 주로 이루어졌다(Kim *et al.*, 1980, Usui *et al.*, 1983). 그러나 有地 등(有地 滋 등 1979)은 형태학상 동일 종으로 분류된 영지일지라도 산지에 따라 그 약리적 효과가 상이하였으며, 서식조건에 따라 활성물질의 생성에 차이를 나타낼 수 있다고 보고하였다. 1985년 Sone등(Sone *et al.*, 1985)은 영지의 다당류와 생리적 활성화에 관한 연구를 수행 하면서 탄소원에 따른 균사체와 다당류의 수율을

\*Corresponding author

검토한 결과, 유당을 첨가한 배지에서 균사체의 생육이 가장 양호하였고, 포도당을 첨가한 배지에서 다당류의 수율이 가장 높았다고 보고하였다. 그러므로 생리적 활성이 우수한 다당류를 대량 얻기 위해서는 액체배양을 통하여 균사체로부터 균일한 다당류를 대량 얻는 것이 유리하며, 균사체의 생육에 가장 큰 영향을 주는 탄소원의 선별과 이에 따른 다당류의 수율, 조성 변화 그리고 약리적 활성에 대한 연구가 필요하다. 생리적 활성 다당류의 항암 활성작용 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았으나, 주로 면역계 활성을 중심으로 연구되어 왔으며(水野 卓 등., 1992), 특히 *in vitro*에서 보체계 활성, 그리고 *in vivo*에서 면역세포 분화정도, 또는 암세포를 이식한 마우스에서 직접적인 검색방법을 주로 이용하여 왔다(이 등., 1994).

본 연구에서는 여러 가지 탄소원을 이용하여 영지 균사체를 배양하고, 배양된 균사체로부터 얻은 영지의  $\beta$ -glucan성 다당류인 ganoderan의 수율, 구성 성분의 변화 및 생리적 활성 여부를 검토하고자 한다. 생리적 활성은 *in vivo*에서 항암효과 그리고 *in vitro*에서 항보체 활성 효과 등을 통해 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 일양약품에서 보관하고 있는 *G. lucidum* IY009의 균사체이며, 보관용 배지는 potato dextrose agar(PDA) 사면 배지를 사용하였다. 배양용 배지는 yeast extract 5g,  $K_2HPO_4$  0.01g,  $KH_2PO_4$  5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1g을 물 1l에 녹여 기본배지(IYSM)로 삼았고, 여기에 탄소원으로 포도당, 과당, 말토오스, 갈락토오스, 유당, 설탕, 가용성 녹말을 각각 20g씩 첨가하여 실험배지로 사용하였다.

### 시약

보체로는 guinea pig serum(삼육축산)과 신선한 인체 혈청을 사용하였다. 적혈구는 면역적혈구(한국 메디아), 항체는 anti-sheep hemolysin(Difco Co.)를 사용하였다. 완충액 조제를 위하여 사용한 barbital은

Merck사 제품을 사용하였고, gelatin, EGTA 및  $MgCl_2$ 는 Sigma사의 것을 사용하였다. [ $U-^{14}C$ ] glucose(specific activity; 250~360 mCi, Total activity 5 mCi, NEC-042B)는 New England Nuclear사(U.S.A.)로부터 구입하였다.

### 실험동물 및 종양세포

마우스는 20~25g의 ICR계 웅성으로 삼육축산에서 구입하여 사용하였고, 암세포인 sarcoma 180은 한국세포주 은행으로부터 분양 받아 사용하였다.

### 균사체 배양

용량 500 ml 삼각 플라스크 속에 100 ml의 배지를 넣고 pH를 0.1N HCl을 사용하여 4.5로 조정한다. 다음 15 lb/15분간 고압 멸균하였다. 여기에 potato dextrose broth에서 전 배양한 *G. lucidum* IY009 균사체를 homogenizer(Nihonseiki Kaisha AM-10)에서 수초간 균질화시킨 후 균주를 10 ml씩 접종하여 27°C에서 6일간 120 rpm으로 진탕배양하였다.

### 균사체 생장 측정

배양된 균사체액을 여과지(Aldrich No.4)로 여과하여 90°C에서 12시간 동안 건조시켰다. 건조 균체의 무게는 전체무게에서 여지의 무게를 제외하여 계산하였다. Data는 탄소원마다 3개의 flask에서 얻은 수치와 2회의 독립된 시험 결과를 평균하여 산출하였다.

### 영지의 $\beta$ -glucan성 다당류, Ganoderan의 분리

6일간 배양된 균사체액에 NaOH를 가해 최종 농도가 2.0N 되게 조정하고 24시간 방치한 후, 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액은 acetic acid로 중화시킨 후, 3배량의 에탄올을 가해 4°C에서 24시간 방치했다. 에탄올에 침전된 다당류는 원심분리(3000×g)하여 침전물을 수확하고, 이에 소량의 증류수로 용해시켜 투석 막(Sigma Co.)에 넣은 후 흐르는 물에서 1주일간 투석하였다(WS+WI 분획). 투석된 ganoderan은 원심분리(5000×g)하여 수용성(WS)인 상등액과 비수용성(WI)인 침전물을 분획화 한 후, 각각을 동결건조하여 ganoderan-AS-WS와 AS-WI를 얻었다.

### <sup>14</sup>C-labelled 포도당을 이용한 ganoderan의 포도당 도입률

탄소원으로 사용된 포도당이 ganoderan 내로 도입되는 정도를 알아보기 위하여 동위원소를 이용하였다. 실험에 사용한 배지는 IYSM 배지의 성분 중 가용 전분(soluble starch) 대신에 당당류인 2%의 glucose를 넣고 [<sup>14</sup>C] 포도당을 첨가하였다. 간략히 설명하면, 포도당이 첨가된 기본배지 100 ml에 10% 균사체를 접종한 후 27.5°C, 130 rpm으로 24 시간 배양한 후 150 μCi, 1 mCi 및 10 mCi의 [<sup>14</sup>C] 포도당을 각각 첨가하였다. 6일 동안 동일한 조건으로 진탕배양한 후, 균사체 배양물에 최종 2N이 되도록 NaOH를 가하여 12시간 동안 방치하였다. 빙초산으로 중화하고 추출된 알칼리 가용성 ganoderan 액을 원심분리하였다. 원심분리된 상층액을 소량의 물에 녹여 3일간 투석하였다. 투석된 ganoderan 액을 동결건조하여 동위원소로 표지된 ganoderan을 얻었다. <sup>14</sup>C-labelled ganoderan은 scintillation counter를 이용하여 labelled 된 동위 원소량을 측정하였다. 측정방법을 간략하면, 5 mg의 <sup>14</sup>C-labelled ganoderan과 10 ml의 liquid scintillation cocktail(Beckman)을 잘 혼합한 다음, scintillation counter(Beckman LS 6000TA)의 <sup>14</sup>C channel에서 측정하였다. Ganoderan 속으로 <sup>14</sup>C-포도당의 incorporation rate는 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{Incorporation rate} = \frac{\text{total radioactivity of the product}}{\text{total radioactivity of the precursor}} \times 100(\%)$$

### 시료의 당 및 단백질 분석

당의 함량은 phenol-sulfuric acid법(Chaplin *et al.*, 1986)에 의해 측정하였으며, 단백질의 함량을 측정하기 위해서는 BCA protein assay reagent를 사용하였다(Smith *et al.*, 1985). 구성 당을 분석하기 위하여 시료 10 mg을 0.1N HCl에 용해시켜 질소를 충전시킨 후 100°C에서 5시간 동안 가수분해시켰다. 여기에 3배량의 에탄올을 가해 4°C에서 하루밤 동안 방치한 후 원심분리하여 얻은 상층액을 vial에 넣어 50°C에서 감압농축하여 완전히 수분을 제거했다. 샘플에 100 μl의 포화 pyridine에 용해시켰다. 대조 단당의 경우, α-포도당, β-포도당, arabinose, 과당,

갈락토오스, 만노오스, 리보오스, 크실로오스를 5 ml 용 vial에 10 mg을 넣고, 1 ml pyridine을 가해 용해시켰다. 각각의 vial에서 100 μl의 표준 당당류를 취하고, 여기에 20 μl의 hexamethyl disilazane과 10 μl의 trimethyl chlorosilane 가하여 혼합시켰다. 80°C에서 30분간 반응시킨 후, 반응액을 1 μl를 취하여 G.L.C(Shimadzu GL 9A)로 분석하였다.

분석조건은 다음과 같다. Column; 3% OV-17 (80~100 mesh Shimalite) 3 mm(D)×3 m(L)borosilicate glass column, column temperature; 150~180°C gradient, Detector temperature; 240°C, Injection temperature; 240°C, Carrier gas; He, Flow rate; H<sub>2</sub>-60 ml/min, He-60 ml/min, air-600 ml/min, Detector; FID, Attenuation; 10<sup>2</sup>×2<sup>1</sup> a.f.s.

시료중의 아미노산은 Beckman system 6300 amino acid analyzer를 이용하여 분석하였다. 시료 4 mg을 1 ml의 6N HCl에 용해시켜, 질소를 충전한 후 밀봉하여 110°C에서 24시간 동안 가수분해시킨 후 여과하여 침전물을 제거한 후 감압농축하여 건조된 시료를 0.08M sodium citrate와 0.2N HCl이 함유된 완충용액 2 ml에 용해시켜 이중 50 μl를 아래의 조건하에서 분석하였다. Column ;Beckman 2.6 mm(D)×200 mm(L), ion exchange resin No. 338 076, Flow rate; buffer solution 0.33 ml/min, ninhydrin 0.17 ml/min, Analysis cycle time; 60 min, Column pressure; 147 kg/cm<sup>2</sup>, Ninhydrin pressure; 7 kg/cm<sup>2</sup>, Column Temperature; 50~70°C gradient, N<sub>2</sub> Pressure; 2.8 kg/cm<sup>2</sup>, Reaction bath temperature; 130°C, Wavelength; 440 nm, 540 nm, Detector; tungsten.

### Hexosamine의 함량

각각의 탄소원을 이용하여 추출, 분리된 ganoderan 내의 hexosamine 함량은 Elson-Morgan 방법(Chapline *et al.*, 1986)을 다음과 같이 약간 변형하여 측정하였다. 각 시료 5 mg에 3N HCl 1 ml을 넣고 질소 gas로 충전시킨 후 100에서 15시간 가수분해시킨 후, 여과 감압농축하여 건조시켰다. 건조된 시료에 1 ml의 증류수를 가하여 완전히 녹인 후 0.5 ml를 취하여 시험관에 넣고, 시료에 대한 시약 A(1.5 ml의 acethyl acetone과 50 ml의 1.25N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 혼합액)와 표준 glucosamine에 대한 시약 B(1.5 ml의

acetyl acetone과 50 ml의 0.5N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 혼합액을 ganoderan과 표준 glucosamine이 들어있는 시험관에 각각 1 ml씩 넣어 96°C에서 1시간동안 반응시킨다. 반응액을 상온에서 식힌 다음, 10 ml의 96% 에탄올과 1 ml의 시약 C(진한 염산 30 ml에 *p*-dimethylamino-benzaldehyde 1.6 g를 녹이고 95% 에탄올 30 ml를 첨가한 용액)를 가하여 1시간 동안 방치한 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료내의 총 hexosamine의 함량은 표준 glucosamine을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

#### LAL Kit를 이용한 $\beta$ -glucan 확인

그람 음성 세균의 세포벽 성분인 LPS(lipopolysaccharide)가 *Limulus* ameocyte lysate(LAL)를 gel화 시킨다는 보고 이래(Levin *et al.*, 1968), 내독소의 검정과 정량을 위한 실험법으로 이용되고 있다(FDA, 1983). 그러나 *Limulus* test는 LPS 뿐만 아니라(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan에 의해서도 특징적으로 gel화가 일어난다(Kakinuma *et al.*, 1981). 본 실험에서는 영지 균사체로부터 얻은 ganoderan 내의(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan의 양을 추정하고자 LAL kit(Kinetic-QCL™, 192 Test Kit, Biowhittaker Co.)를 이용하여 측정하였다. 각각의 ganoderan을 무균적으로 pyrogen-free 증류수에 최종 2  $\mu$ g/ml이 되도록 하여 녹인 후, Toxidometer를 이용하여 측정하였다.

#### IR Spectrum

소량의 ganoderan에 400배의 potassium bromide를 첨가하여 잘 분쇄시킨 후, disc를 만들고 FT-IR(Bruker, IFS-48)를 통하여 측정하였다. 각 시료당 8번의 scanning하여 IR spectrum을 측정하였다.

#### 분자량 분포

시료 10 mg을 1 ml의 0.3N NaOH에 용해시켜 sepharose CL-4B column에서 용출시켰다. 이때 column size는 16 mm(D) $\times$ 530 mm(L)였고, flow rate는 6 ml/hr, fraction volume을 2 ml로 설정하였다. 각각의 column chromatography에서 얻은 elute는 phenol-sulfuric acid 방법을 이용하여 반응시킨 후 490 nm에서 absorbance를 측정하였다. Standard dextran의 molecular weight는 2,000,000/124,000/70,000 그리고 9,300의 Sigma dextran를

사용하였다.

#### 항보체활성의 측정

항보체활성(anticomplementary activity)은 Yamada등(Yamada *et al.*, 1984)의 방법을 변형하여 측정하였다. 10 ml 시험관에 150  $\mu$ l의 GVB<sup>2+</sup> 완충용액(gelatin veronal buffered saline: 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM sodium barbital, 3.1 mM babiluric acid, 141 mM NaCl 및 0.1% gelatin, pH 7.4)과 250  $\mu$ g/ml 농도의 각 시료 50  $\mu$ l를 가한 다음, 여기에 50  $\mu$ l(100 U/ml)의 guinea pig serum을 complement로써 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 4.75 ml의 GVB<sup>2+</sup> 완충용액을 가하여 보체의 최종 농도를 1 unit/ml로 조정한다. 조정된 complement 혼합물을 1.0 unit, 1.2 unit 및 1.6 unit가 되게 각 시험관에 분주한 다음, anti-sheep hemolysin(2 MHU/ml)과 동량의 SRBC(5 $\times$ 10<sup>8</sup> cells/ml)를 혼합하여 실온에서 30분간 감작한 후, 감작된 SRBC 2 ml를 시험관에 첨가하고 최종 5 ml이 되도록 GVB<sup>2+</sup> 완충용액으로 조정했다. 각각의 시험관을 vortex한 후 37°C에서 60분간 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위하여 70  $\mu$ l의 0.5M EDTA 용액을 가하여 혼합한 후, 400 $\times$ g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액의 흡광도를 541 nm에서 측정하였다. 항보체활성은 대조군 대비 총 보체 용혈(50% of total complement hemolysis, TCH<sub>50</sub>)의 저지율(inhibition of TCH<sub>50</sub>, ITCH<sub>50</sub>)로 나타내었다.

$$ITCH_{50} (\%) = \frac{TCH_{50} \text{ of control} - TCH_{50} \text{ treated with sample}}{TCH_{50} \text{ of control}} \times 100$$

#### 항암실험

ICR계 마우스의 복강내에 일주일간 간격으로 이식하여 보존하고 있는 sarcoma 180 세포를 실험용 종양세포로 사용하였다. 실험동물의 복강 내에서 7일간 배양된 sarcoma 180 세포를 복수와 함께 취하여 빙냉, 멸균한 생리식염수를 가하여 400 $\times$ g로 3분간 원심분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포를 빙냉, 멸균생리수로 3회 세척한 후 1 $\times$ 10<sup>7</sup> cell/ml가 되도록 희석하였다. 이 부유액 0.1 ml씩(1 $\times$ 10<sup>6</sup> cell/mouse)을 실험동물의 왼쪽 서혜부에

피하 이식하였다. 종양세포를 시료 당 10마리씩 군 분리된 마우스에 각각 이식하고 72시간 후 약물투여를 시작하되, 매일 1회씩 10일간 연속하여 복강내 주사하였다. 대조군에는 생리식염수를, 처치군에는 생리식염수에 용해시킨 시료를 20 mg/kg씩 주사하였으며 주사용량은 0.1 ml로 하였다. 종양세포를 이식한지 30일째 되는 날 실험동물을 치사시켜 유발된 고형암을 적출한 후 그 중량을 측정하여 평균 종양 중량을 얻고, 증식저지율은 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 종양저지백분율(Percent inhibition ratio=I.R., %)을 계산하였다.

$$I.R.(%) = \frac{C_w - T_w}{C_w} \times 100$$

$C_w$  = 대조군의 평균 종양 무게

$T_w$  = 처치군의 평균 종양 무게

## 결 과

### 탄소원에 따른 균사체 성장 및 다당류의 수율

IYSM 배지의 조성 가운데 가용성 녹말 대신 여러 탄소원을 각각 첨가하여 균사체를 배양하였다. 7일간 배양 후 균사체의 건중량과 ganoderan의 수율을 조사한 결과, Table 1과 같이 영지 균사체의 생장은 가용성 녹말, 말토오스, 과당 및 포도당에서 우수하

였다. 특히 과당이 포도당보다 균사체의 생장이 우수하였다. 탄소원에 따라 균사체의 형태적 차이를 볼 수 있었으며, 생장이 우수한 균사체일 수록 균사체의 크기는 증가했고, septa의 수, 그리고 분지의 정도는 적었다. 탄소원에 따라 배양된 균사체로부터 ganoderan을 얻기 위하여 배양된 균사체를 최종 2 N이 되도록 알칼리 처리하여 알칼리 가용성 ganoderan(AS)을 얻고, 이것을 에탄올 침전을 통해 수용성(WS)과 비수용성(WI)으로 분획화하였다. Ganoderan의 이화학적 특성과 생리적 활성과의 관계를 알아보기 위하여 두개의 분획으로 분리한 결과, 균사체의 생장이 우수한 가용성 녹말배지에서 92 mg/100 ml의 ganoderan-WS와 188 mg/100 ml의 ganoderan-WI를 얻었다. 반면에 탄소원을 사용하지 않은 배지에서는 균사체의 생장이 거의 이루어지지 않았으며, 15.8 mg/100 ml의 WS과 3 mg/100 ml의 WI로 극히 적은 량의 ganoderan이 수획되었다. 균사체의 생장이 우수한 탄소원의 경우 WI 분획이 WS분획보다 2~3배 양적으로 더 많았고, 균사체의 생장이 낮은 설탕 및 갈락토오스를 탄소원으로 이용한 배지에서 성장한 균사체로부터 수획된 ganoderan은 WS분획이 WI분획보다 3~8배까지 수획량이 많았다. 탄소원에 따른 ganoderan의 수율은 가용성 녹말, 포도당, 말토오스 순으로 많은 양을 수획하였다.

**Table 1.** Yields of ganoderan obtained from *Ganoderma lucidum* IY009

Carbon sources (2%)	Mycelial dry Weight (mg/ml)	Ganoderan (mg/100 ml)		Total Ganoderan (mg/100 ml)	Yield (%)
		WS Fraction	WI Fraction		
Carbon free	1.37	15.8	3.0	18.8	0.02
Glucose	12.87	87.3	186.0	273.3	0.27
Fructose	13.08	41.6	142.3	183.9	0.18
Mannose	11.48	57.8	103.0	160.8	0.16
Galactose	3.32	33.3	4.3	37.6	0.04
Lactose	11.78	45.9	128.4	174.3	0.17
Maltose	13.07	82.3	155.7	238.0	0.23
Sucrose	2.77	26.7	8.4	35.1	0.04
Starch	13.67	92.0	188.0	280.0	0.28

Abbreviation: WS; Water soluble, WI; Water insoluble

Values represent the mean of two independent experiment done in triplicate

### Ganoderan의 총 탄수화물, 총 단백질 및 hexosamine 함량

각각의 탄소원을 이용하여 영지 균사체를 배양하

**Table 2.** Total carbohydrate, protein and hexosamine of the ganoderan obtained from the mycelium of *G. lucidum* IY009 which was cultured in various carbon sources.

Ganoderan	Solubility	Total carbohydrate (%)	Total protein (%)	Hexosamine (%)
G-C	AS-WS	82.9	2.3	0.2
	-WI	86.2	4.1	0.7
G-GLU	AS-WS	76.7	3.6	0.9
	-WI	80.1	4.7	0.9
G-FRU	AS-WS	82.6	2.4	5.2
	-WI	91.8	2.9	1.3
G-MAN	AS-WS	77.3	3.2	1.3
	-WI	90.1	5.8	1.1
G-GAL	AS-WS	91.2	4.9	0.2
	-WI	90.2	5.0	0.8
G-LAC	AS-WS	79.5	3.5	0.7
	-WI	84.8	4.5	0.1
G-MAL	AS-WS	78.5	5.4	1.7
	-WI	75.2	4.1	0.4
G-SUC	AS-WS	87.1	3.4	0.1
	-WI	89.7	4.5	1.0
G-STA	AS-WS	84.6	4.0	1.0
	-WI	85.8	4.7	2.1

Abbreviations: G-C; Ganoderan obtained from carbon free medium. GLU; glucose GAL; galactose, FRU; fructose, LAC; lactose, MAL; maltose, MAN; manose, SUC; sucrose, STA; soluble starch

고, 알칼리 및 에탄올 침전법에 의해 추출 및 분리한 ganoderan의 탄수화물, 단백질 및 hexosamine의 총 함량은 Table 2에서 보는 바와 같이 각각의 탄소원에 따라 주요 구성 물질의 함량에 차이가 있었다. 즉, 총 탄수화물은 75~91%, 단백질은 .2~5%, 그리고 hexosamine은 0.1~5% 이내로 포함되어 있다. 추출과정에서 에탄올 침전시 구분된 WI는 WS분획보다 대체로 탄수화물의 함량이 많았다. WI분획은 75~91.8%의 탄수화물로 구성되어 있었으며, WS분획은 보통 77~91%의 탄수화물로 구성된 다당류였다. 알칼리로 추출된 ganoderan 내의 hexosamine의 함량은 대부분이 1% 이하였으나, 과당을 탄소원으로 하여 분리된 G-FRU-AS-WS분획의 경우 5.2%를 포함하고 있었다. 여러 수용성 ganoderan 가운데 총 탄수화물의 함량이 가장 높은 것은 G-GAL으로써 91.2%를 차지하였다.

### <sup>14</sup>C-labelled 포도당의 ganoderan 도입율

포도당을 탄소원으로 한 IYSM 배지에서 균사체를 1일간 배양하고 uniform <sup>14</sup>C-labelled 포도당을 첨가하였을 때, ganoderan 내로 동위원소의 도입율(incorporation rate)을 알아 본 결과, Table 3과 같이 알칼리 가용성 ganoderan은 100 ml의 배지에서 200~600 mg을 수확하였고, 150  $\mu$ Ci를 첨가한 배양액에서 추출된 ganoderan은 0.04  $\mu$ Ci/mg의 고유활성도(specific activity)를 보였고, 동위원소의 농도가 강할수록 고유활성도는 증가하였다. 10 mCi를 첨가한 배지의 균사체로부터 수확된 ganoderan의 고유활성도는 mg당 2.6  $\mu$ Ci였으며, 전체 평균적으로 볼 때 D-[U-<sup>14</sup>C] 포도당의 도입율은 약 5~15%였다. 이와 같은 결과로 볼 때, 포도당을 영지 균사체 배양시 탄소원으로 이용할 경우, 첨가된 포도당 가운데 5.2~16%가 알칼리 가용성 ganoderan(AS)을 구성

**Table 3.** Radioactivity of D-[U-<sup>14</sup>C] glucose incorporated into ganoderan in the mycelium of *G. lucidum* IY009.

D-[U- <sup>14</sup> C] glucose ( $\mu$ Ci/100 ml)	Ganoderan (mg/100 ml)	DPM ( $10^4$ /mg)	Specific activity ( $\mu$ Ci/mg)	Total <sup>14</sup> C-labelled Ganoderan ( $\mu$ Ci)	I.R (%)
150	600	6.7	0.04	24	16.0
1000	250	88.0	0.4	100	10.0
10000	200	570.0	2.6	520	5.2

\*I.R.; Incorporation rate

**Table 4.** Monosaccharide content (%) of ganoderan obtained from the mycelium of *G. lucidum* IY009 which was cultured in various carbon sources.

Ganoderan	Solubility	Monosaccharides contents (%)							
		Ara	Rib	Xyl	Fru	Man	Gal	$\alpha$ -Glu	$\beta$ -Glu
G-C	AS-WS	—	—	3.7	9.5	35.9	5.2	23.3	22.5
	-WI	1.9	0.9	10.3	18.2	0.3	1.0	27.0	40.4
G-GLU	AS-WS	—	1.4	5.3	10.3	21.0	9.9	26.6	25.6
	-WI	—	—	1.0	2.1	2.5	1.7	36.0	56.7
G-FRU	AS-WS	—	1.1	7.5	12.6	0.2	5.0	29.7	43.9
	-WI	—	0.4	4.5	8.5	6.0	2.2	29.1	49.4
G-MAN	AS-WS	—	0.4	3.3	9.0	18.1	9.7	28.5	31.1
	-WI	—	0.9	8.0	15.2	7.2	2.4	25.2	41.1
G-GAL	AS-WS	—	1.4	7.9	12.1	13.6	9.7	29.9	25.4
	-WI	—	1.2	11.4	21.2	8.1	4.5	22.8	30.8
G-LAC	AS-WS	—	0.8	4.3	2.1	21.5	8.9	30.2	32.2
	-WI	—	0.7	3.1	2.2	1.4	1.5	37.1	53.9
G-MAL	AS-WS	—	0.7	3.0	2.9	12.6	11.8	35.4	33.6
	-WI	—	0.2	1.5	3.4	1.8	2.2	37.3	53.6
G-SUC	AS-WS	—	4.0	7.5	13.9	22.2	5.7	23.7	23.0
	-WI	—	1.4	10.3	17.7	6.6	1.8	26.9	35.4
G-STA	AS-WS	—	0.2	1.2	4.1	8.6	3.7	32.3	50.0
	-WI	—	0.1	0.7	2.0	1.3	2.2	38.4	55.2

Abbreviations: G-C; Ganoderan obtained from carbon free medium. GLU; glucose GAL; galactose, FRU; fructose, LAC; lactose, MAL; maltose, MAN; mannose, SUC; sucrose, STA; soluble starch, AS; alkali soluble, AI; alkali insoluble, WS; water soluble, WI; water insoluble ganoderan

하는데 직접적으로 이용되어짐을 알 수 있다.

#### Ganoderan의 구성당 분석

구성당을 분석하기 위해서 각각의 탄소원을 사용한 배지로부터 수확한 ganoderan 10 mg을 0.1N HCl에 가수분해시킨 후 trimethylsilyl화 하여 G.C (Gas Chromatography)를 행한 결과, Table 4와 같이 ganoderan은 주로 포도당, 만노오스, 과당 그리고 갈락토오스 등으로 구성되어 있으며(Fig. 1, 2), 포도당이 대부분이기 때문에 ganoderan은 glucan성 다당류로 볼 수 있었다. 또한 G-C, G-GLU, G-MAN, G-LAC 그리고 G-SUC와 같은 ganoderan의 WS분획은 만노오스가 다량으로 포함되어 있어 glucomannan성으로 볼 수 있었다. 당의 함량이 분석된 모든 ganoderan의 경우에서, WS보다 WI분획이 포도당의

함량이 높았다. 즉 AS-WS는 포도당의 함량이 40~50%였고, WI분획은 60~90%를 차지하였다. 대부분의 ganoderan에서  $\beta$ -glucose가  $\alpha$ -glucose보다 많았으나, G-C의 AS-WS, G-GLU의 AS-WS, G-GAL의 AS-WS등은  $\beta$ -glucan과  $\alpha$ -glucan이 양적으로 대등하게 존재하였다. 그러나 표준 물질로 사용한  $\beta$ -glucan(Sigma Co.)의 경우에서도 54%의  $\beta$ -glucose, 38%의  $\alpha$ -glucose였으므로, ganoderan의 주요 구조는  $\beta$ -glucan임을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로 볼 때, 영지 균사체를 알칼리 처리하여 추출되는 다당류는  $\beta$ -glucan성이며, 배지 조성에 따라 구성 당의 함량이 약간은 상이하게 나타났다. 균사체의 생장이 양호한 포도당, 가용성 녹말 및 말토오스와 같은 탄소원에서 얻은 WI분획은 포도당의 함량이 90% 이상으로써, 이는 영지 균사체 생장에

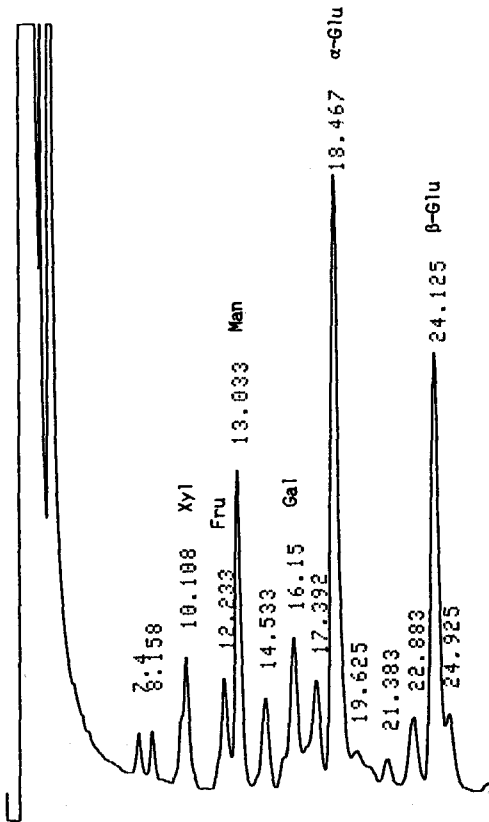


Fig. 1. G.L.C. pattern and monosaccharide composition of the ganoderan-GAL-AS-WS fraction. This ganoderan was obtained from *G. lucidum* IY009 cultured in galactose medium.

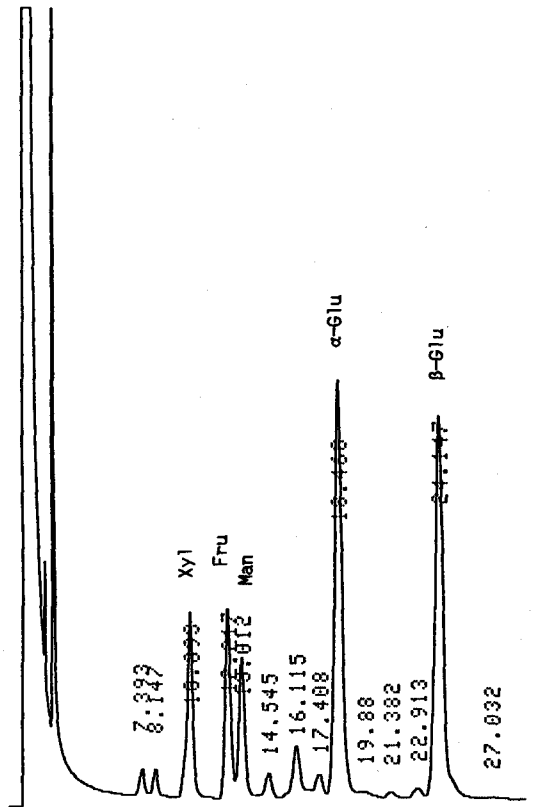


Fig. 2. G.L.C. pattern and monosaccharide composition of the ganoderan-GAL-AS-WI fraction. This ganoderan was obtained from *G. lucidum* IY009 cultured in galactose medium.

최적의 탄소원이 추가되면 세포벽합성을 포함한 물질대사가 활발해져 세포골격 및 분비성 다당류의 배출이 증가되며, 이와 같은 다당류의 조성은 포도당임을 알 수 있다. 반면에 균사체의 탄소 기질로써 그 이용률이 낮은 탄소원은 균사체성 다당류 형성시, heteropolysaccharide로 되는 경향을 볼 수 있었다. 이와 같은 예로써, 배지내 탄소원이 결합된 균사체로부터 얻은 ganoderan G-C는 WS분획에서 만노오스의 양이 35.9%로 그 함량이 급격히 증가하였고 상대적으로 포도당의 양은 감소하였다. G-C의 WI분획은 만노오스가 거의 함유되지 않았으나, 과당과 xylose의 양이 증가하였다. 알칼리 가용성 ganoderan의 경우, WS는 WI보다 이종의 다당류들이 더 많이 포함된 것으로 보아 이종의 여러 다당류들은 ganoderan의 용해성에 크게 관여하는 것으로 보인다.

다.

탄소원에 따른 ganoderan의 아미노산 분석

영지 균사체로부터 ganoderan을 알칼리 추출 및 에탄올 침전법을 통하여 분리할 경우, 약 2~5% 내외의 단백질이 다당류에 결합 또는 혼재되어 있다. Ganoderan 내의 결합성 단백질의 구성 아미노산을 분석하기 위해 아미노산 자동분석 측정기를 이용한 결과, Table 5에서 보는 바와 같이 16개의 아미노산으로 구성되었으며, 특히 글루탐산, 아스파르트산과 같은 산성 아미노산 그리고 비극성인 알라닌 함량이 가장 많았다(Fig. 3, 4). 일반적으로 알칼리 가용성 ganoderan의 구성 아미노산은 탄소원과는 큰 관계없이 유사한 양상의 아미노산 조성을 보였다. 그러나 탄소원이 결합된 배지로부터 수획한 G-C



Table 5. Amino acid composition of the ganoderan obtained from *G. lucidum* IY009 which was cultured in various carbon sources

Gnoderans	Asp	The	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Try	Phe	His	Lys	Arg
G-C	12.8	3.0	6.4	13.8	3.2	8.2	6.1	3.9	ND	4.3	6.0	ND	2.9	1.0	4.2	24.4
WI	8.8	4.1	6.3	8.6	3.6	9.0	6.6	5.4	2.5	5.6	10.2	1.1	2.6	0.9	4.0	20.7
G-GLU	11.2	4.8	4.9	14.1	4.4	7.4	8.8	5.9	0.4	4.6	7.3	1.7	3.1	1.7	6.9	13.0
WI	10.1	4.7	4.8	11.4	4.4	7.7	9.7	6.7	0.4	5.1	7.9	2.3	3.5	2.0	8.4	11.0
G-FRU	10.2	4.5	5.3	11.3	4.4	9.2	9.1	6.2	0.7	4.6	6.5	1.8	2.9	1.6	6.7	14.9
WI	9.5	4.4	5.2	10.7	4.4	8.4	8.1	6.4	1.3	6.2	8.7	1.7	3.7	1.2	5.1	15.2
G-MAN	13.2	4.2	4.6	15.1	4.1	9.1	7.7	5.0	1.2	5.9	6.0	1.4	2.4	0.5	5.8	13.6
WI	9.5	4.5	5.3	11.1	4.8	8.4	8.9	6.1	0.8	9.5	8.9	2.2	3.7	0.4	6.5	9.4
G-GAL	12.6	4.9	5.3	14.1	4.6	8.4	8.8	6.8	0.8	6.2	8.9	1.4	3.8	1.0	6.0	6.5
WI	10.0	4.7	5.9	11.3	4.7	8.6	9.3	7.3	1.0	6.5	9.8	2.5	4.5	1.3	6.0	6.5
G-LAC	12.4	5.5	4.8	12.6	4.2	8.0	8.8	6.6	0.2	4.9	7.0	2.3	5.0	1.4	7.5	8.8
WI	9.9	4.6	4.8	12.2	4.9	7.7	9.1	6.3	1.3	5.7	8.2	2.4	3.7	0.6	7.1	11.7
G-MAL	13.8	4.9	4.8	16.4	4.9	7.9	9.4	6.3	0.5	4.6	7.1	2.1	3.4	1.1	6.7	6.0
WI	10.4	4.7	5.0	12.4	5.1	7.5	9.7	6.6	1.0	5.0	8.1	2.4	3.5	0.9	7.1	10.5
G-SUC	12.4	4.3	4.8	12.6	4.5	8.5	8.7	6.2	1.0	6.0	7.1	1.6	3.2	0.9	6.3	11.9
WI	10.2	3.3	6.4	10.0	4.8	9.8	9.6	2.6	ND	9.8	7.6	2.2	3.1	0.4	5.0	15.0
G-STA	11.4	5.0	5.1	12.2	4.0	8.9	9.0	6.0	0.6	4.4	6.0	1.9	2.7	0.9	6.9	15.1
WI	9.9	4.3	5.3	12.1	5.0	8.0	9.4	5.5	1.0	6.9	8.0	2.3	3.6	0.8	6.6	11.5

Abbreviations: G-C; Ganoderan obtained from carbon free medium. GLU; glucose GAL; galactose, FRU; fructose, LAC; lactose, MAL; maltose, MAN; mannose, SUC; sucrose, STA; soluble starch, AS; alkali soluble, AI; alkali insoluble, WS; water soluble, WI; water insoluble ganoderan

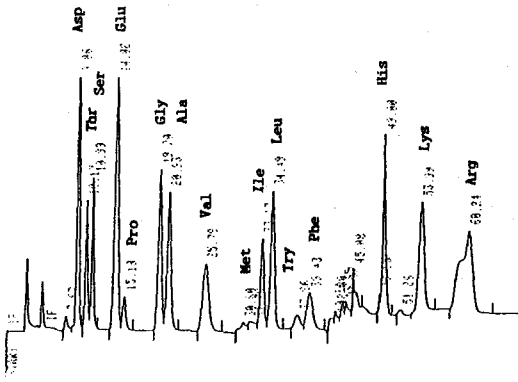


Fig. 3. Amino acid composition of the ganoderan-GAL-AS-WS. This ganoderan was obtained from *G. lucidum* IY009 cultured in galactose medium.

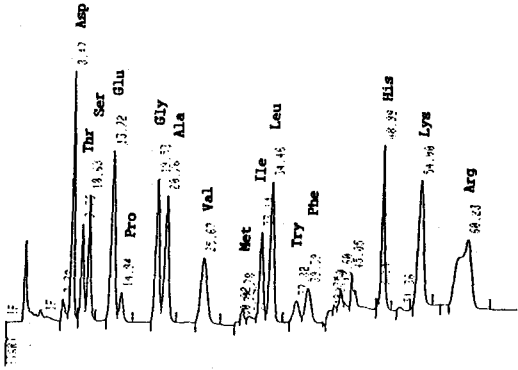


Fig. 4. Amino acid composition of the ganoderan-GAL-AS-WI. This ganoderan was obtained from *G. lucidum* IY009 cultured in galactose medium.

분획은 아르기닌의 함량이 24.4%(WS), 20.7%(WI)로써 다른 탄소원을 사용한 배지에서 분리한 분획보다 많은 함량을 보였다. Ganoderan-WS와 WI분획의 아미노산 조성을 비교해 볼 때 Pro, Gly, Ala, Val, Met, Ileu, Try, Phe과 같은 비극성이며 중성인 아미노산의 전체 함량은 거의 동일하였으나, Leu, Ile, Ala, Tyr 등과 같은 아미노산은 ganoderan-WI가 WS보다 약간 많았다. 반면에 ganoderan-WS는 WI보다 Asp, Glu이 상대적으로 많이 포함되어 있었다.

**β-glucan 확인**

LAL kit( Kinetic-QCL, 192 Test kit, Biowhit-

Table 6. Estimation of the β-glucan by Toxidometer

Ganoderans	Solubility	Reaction time (Sec.)	Glucan Unit (2 μg/ml)
G-C	AS-WS	1219	0.696
	-WI	1288	0.546
G-GLU	AS-WS	1543	0.246
	-WI	729	>5.0
G-FRU	AS-WS	1211	0.717
	-WI	1045	1.374
G-MAN	AS-WS	1615	0.201
	-WI	1400	0.378
G-GAL	AS-WS	1007	1.618
	-WI	1091	1.136
G-LAC	AS-WS	356	>5.0
	-WI	1477	0.298
G-MAL	AS-WS	1018	1.542
	-WI	1095	1.118
G-SUC	AS-WS	907	2.566
	-WI	1221	0.691
G-STA	AS-WS	882	2.902
	-WI	1153	0.890
Mannan(Sigma Co.)		779	>5.0
Laminarin(Sigma Co.)		844	3.525

Abbreviations: G-C; Ganoderan obtained from carbon free medium. GLU; glucose GAL; galactose, FRU; fructose, LAC; lactose, MAL; maltose, MAN; mannose, SUC; sucrose, STA; soluble starch, AS; alkali soluble, AI; alkali insoluble, WS; water soluble, WI; water insoluble ganoderan

ker Co.) 통해 ganoderan의 β-(1→3)-D-glucan의 함량을 측정된 결과, Table 6과 같이 모든 시료는 LAL을 gel화 하였다. Ganoderan 농도가 2 μg/ml에서 반응시간이 350~1600초 이내에 반응이 이루어 졌다. 특히 G-GLU의 AS-WI, G-LAC의 WS와 같은 fraction은 β-glucan unit가 5.0 GU( 2 μg/ml) 이상을 보였다.

**Ganoderan의 적외선 spectrum**

탄소원에 따라 수획된 ganoderan을 IR spectrum을 측정하여, Baker 등의 분석방법을 통하여

**Table 7.** I.R. spectrum of the ganoderan obtained from the mycelia of *G.lucidum* IY009 which was cultured in various carbon sources

Ganoderan		Frequencies (cm <sup>-1</sup> ) of absorption peaks									
G-C	AS-WS	3421	2348	1720	1708	1691	1656	1648	1631	1612	1571
		1550	1529	1460	1078	896					
	-WI	3414	2927	1720	1708	1687	1656	1631	1571	1550	1460
		1369	1043								
G-GLU	AS-WS	3428	2929	1720	1708	1691	1656	1648	1631	1612	1571
		1550	1529	1460	1265	1082	883				
	-WI	3414	2920	1720	1702	1691	1656	1648	1631	1571	1550
		1535	1460	1370	1073	893					
G-FRU	AS-WS	3428	2919	1708	1687	1656	1648	1631	1612	1571	1550
		1535	1460	1370	1272	1080	861				
	-WI	3436	1725	1691	1678	1656	1648	1639	1631	1612	1571
		1467	1444	1432	1077	883					
G-MAN	AS-WS	3413	2926	1733	1717	1695	1694	1652	1635	1616	1576
		1559	1535	1521	1506	1456	1271	1081	882		
	-WI	3421	2921	1733	1699	1684	1652	1635	1558	1539	1506
		1456	1074	884							
G-GAL	AS-WS	3423	2924	1652	1263	1083	894	707			
	-WI	3414	1630	1368	1043	887					
G-LAC	AS-WS	3415	2927	1653	1279	1080	885				
	-WI	3398	3398	2921	1653	1635	1521	1506	1373	1161	1073
		1040	890								
G-MAL	AS-WS	3394	2929	1652	1272	1083	888				
	-WI	3406	2921	1695	1652	1635	1576	1559	1539	1506	1456
		1373	1078	887							
G-SUC	AS-WS	3394	2930	1652	1550	1539	1506	1264	1079	897	
	-WI	3420	2926	1631	1378	1045					
G-STA	AS-WS	3412	2923	1652	1272	1077	888				
	-WI	3427	2920	1635	1376	1261	1075	887			
β-Glucan		3408	2919	1659	1625	1551	1079				
Mannan		3408	1439	1421	1059	975	825				
Laminarin		3432	1631	1144	1122	1088	1054	1042	1020		
Zyimosan A		3416	2924	1656	1631	1546	1528	1383	1083	1039	878

Abbreviations: G-C; Ganoderan obtained from carbon free medium. GLU; glucose GAL; galactose, FRU; fructose, LAC; lactose, MAL; maltose, MAN; mannose, SUC; sucrose, STA; soluble starch, AS; alkali soluble, AI; alkali insoluble, WS; water soluble, WI; water insoluble ganoderan

구조를 추정하였다. 일반적으로  $\alpha$ -anomer 탄수화물은 811~855  $\text{cm}^{-1}$ 에서 흡수파장이 나타나며,  $\beta$ -anomer 등은 895 $\pm$ 9  $\text{cm}^{-1}$ 의 부근에서 나타낸다. 본 실험에서 측정된 대부분의 ganoderan은 Table 8에서와 같이 대부분 890  $\text{cm}^{-1}$  부근에서 흡수 파장을 나타냄으로써 확실한  $\beta$ -결합을 갖는 다당류임을 확인하였다. 그러나 ganoderan G-C-WI 및 G-SUC-WI는 890  $\text{cm}^{-1}$  전후의 부근에서 흡수파장이 나타나지 않았으나, peak는 확인할 수 있었으므로 상대적인 양이 적어 수치상으로는 검출되지 않은 것으로 본다(Fig. 5). 탄수화물 가운데 carbonyl group(C=O)은 1725~49  $\text{cm}^{-1}$ , acetamido group은 1648  $\text{cm}^{-1}$  부근에서 흡수파장을 보이는데, ganoderan의 경우 이러한 파장에서 모두 peak를 나타내었다. 고리 형태의 단당류는 제 1번 탄소와 5번 탄소는 ether linkage(C-O-C)를 이룬다. 이러한 구조는 1150~1080  $\text{cm}^{-1}$ (ring form), 1150~1060  $\text{cm}^{-1}$ (alkyl ether)에서 흡수파장을 나타내는데, 대부분의 시료는 이와 같은 범위의 파장에서 peak를 보였다.

**Ganoderan의 분자량 분포**

여러 탄소원을 이용하여 균사체를 배양하고 분리된 ganoderan의 평균 분자량을 확인하기 위하여 Sepharose CL-4B를 이용한 column chromatography를 실행하였다. 각각의 시료를 용출시킨 결과 Fig. 6과 같은 chromatogram을 얻었다. 모든 ganoderan의 AS-WS분획은 분획 번호 45~50에서 최대 peak를 보임으로써, 이들의 평균 분자량은 27~60 kD의 다당류인 것으로 나타났다. AS-WI분획은 건

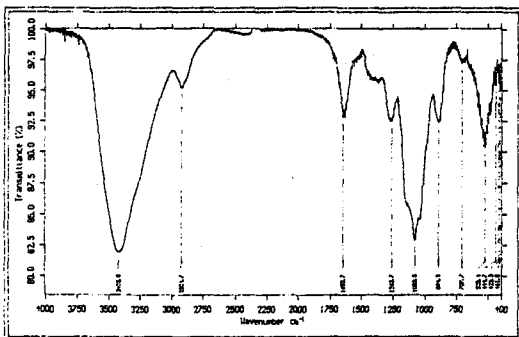


Fig. 5. I.R spectrum of the ganoderan-GAL-AS-WS. This ganoderan was obtained from *G. lucidum* IY009 cultured in galactose medium.

고한 결합성 때문에 불규칙한 chromatogram을 나타냈으나, 보편적으로 fraction No.20~30에서 주 피크가 나타나 평균 분자량이 900~3000 kD인 다당류로 볼 수 있다.

**보체계 활성**

알칼리 가용성 ganoderan(WS+WI)이 *in vitro*에서 보체계에 미치는 영향을 살펴본 결과, Fig. 7에서와 같이 양성 대조군으로 사용한 Krestin의 ITCH

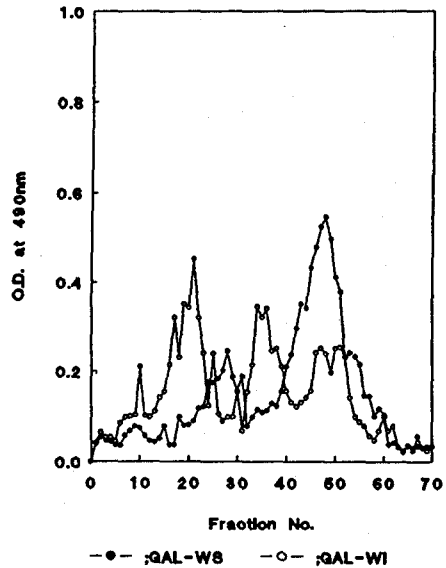


Fig. 6. Gel filtration patterns of ganoderan-GAL. This ganoderan was extracted from the mycelium of *G. lucidum* IY009 which was cultured in galactose medium.

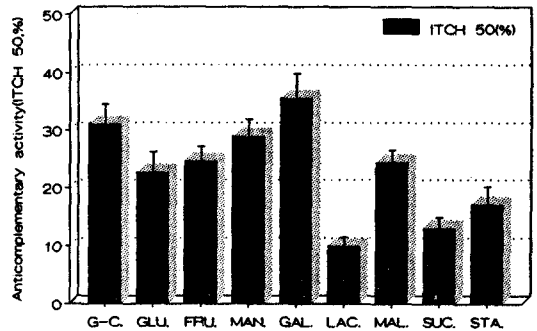


Fig. 7. Anticomplementary activity of the ganoderan (WS+WI). These ganoderan were extracted from the mycelia of *G. lucidum* IY009 cultured in various carbon sources.

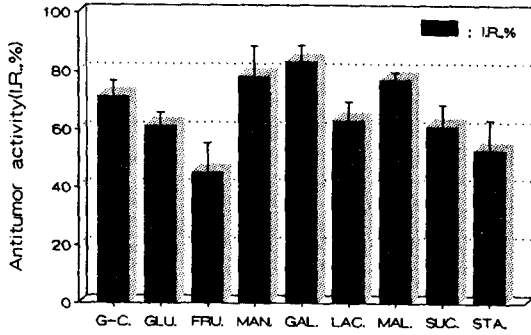


Fig. 8. Antitumor activity of the ganoderan (WS+WI). These ganoderans were extracted from the mycelia of *G. lucidum* IY009 cultured in various carbon sources.

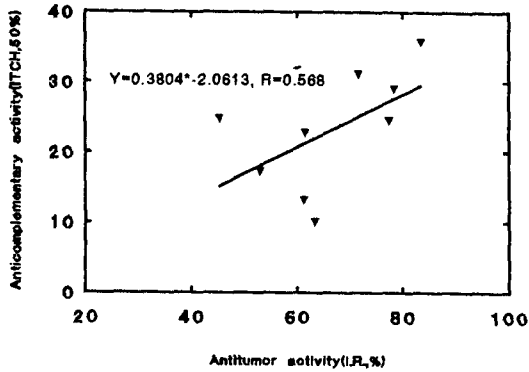


Fig. 9. Correlation between anticomplementary activity and antitumor activity of the ganoderan.

50%)인 20.9%보다 높게 나타낸 것은 control, 포도당, 과당, 만노오스, 갈락토오스, 그리고 말토오스를 탄소원으로 사용한 배지에서 추출한 ganoderan이었다. 탄소원에 따른 보체 활성도가 가장 높게 나타난 것은 갈락토오스 배지에서 성장한 균사체로부터 얻은 G-GAL이 35.7%였고, G-C가 31.1%, G-MAN은 29%의 항보체 활성을 각각 나타내었다.

#### 항암 효과

여러 탄소원을 사용한 배지에서 성장한 균사체로부터 분리된 ganoderan을 sarcoma 180이 피하이식된 mouse에 20 mg/kg씩 복강 투여하여 항암 활성을 검사한 결과, Fig. 8과 같이 만노오스, 말토오스, 갈락토오스를 탄소원으로 이용한 배지로부터 수확된 ganoderan(WS+WI)이 항암활성이 우수하였으며,

특히 galactose 배지에서 추출한 G-GAL은 83.6%의 암 저지율을 보여 가장 높은 항암활성을 보였다. 가용성 전분과 과당을 이용한 배지의 경우 균사체의 생장은 높았으나, 항암활성은 50% 내외로 가장 낮은 생리적 활성을 보였다. 그리고 갈락토오스, 설탕 및 carbon free의 배지에서 분리된 ganoderan이 높은 항암 활성을 보였다.

#### 탄소원에 따른 ganoderan의 항암활성과 항보체 활성간의 상관 관계

각각의 탄소원에 따라 성장한 *G. lucidum* 배양 균사체로부터 얻은 ganoderan의 항보체 활성 및 항암 활성간의 상관관계를 알아 보기 위하여 각각의 탄소원에 따른 수확된 ganoderan의 항보체 활성과 암저지율을 plot 하였다. Fig. 9와 같이 대체로 항보체 활성이 높은 것이 항암효과도 우수한 것으로 나타났으며, 갈락토오스를 탄소원으로 사용한 배지에서 얻은 ganoderan이 가장 우수한 항암 및 항보체 활성을 나타내었다.

#### 고 찰

담자균류에 속하는 영지 버섯은 항종양 면역 효과가 있는 단백다당류를 포함하고 있다(Kim *et al.*, 1980, Sone *et al.*, 1985). 이와 같은 영지의 다당류는  $\beta$ -glucan성 다당류로서 ganoderan으로 명명하였다. Ganoderan은 영지 균사체로부터 다량 합성되므로 균사체 성장에 큰 영향을 주는 적절한 탄소원의 선택과 균사체를 구성하는 다당류의 특성 및 항종양 면역 기작이 규명되어야 한다. 본 연구는 이와 같은 문제점을 밝히고자, 탄소원에 따라 균사체를 배양하여 ganoderan를 추출하고, 이들의 성분 분석과 항암 활성 및 항보체 활성에 대하여 알아보려고 하였다.

여러 가지 탄소원을 이용하여 영지 균사체를 배양한 결과, 탄소원 중에서는 가용성 녹말과 과당 및 포도당을 탄소원으로 이용하였을 때 생장이 우수하였다. 다당류 가운데 과당은 포도당 보다 균사체의 생장이 약간 우수하였는데 이는 균사체내의 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성이 낮아(John *et al.*, 1977), 포도당을 이용하는 것보다 더 효율적이기 때문이라 여겨진다. 배양된 균사체를 알칼리 처리

하여 얻은 알칼리 가용성(AS) ganoderan은 에탄올 침전 과정에서 수용성(WS)과 비수용성(WI)으로 분류할 수 있다. 이와 같은 현상은 Larriba 등(Larriba *et al.*, 1981)이 *Saccharomyces cerevisiae*를 통하여 규명하였는데, *S. cerevisiae*의 cell-free extract 내에 존재하는 glucan synthase를 이용하여 UDP 포도당과 효소적 반응을 통하여 microfibril을 합성한 결과, 이는 물, 에탄올 및 acid에는 비가용 성이었지만 알칼리에는 가용성이 있는  $\beta$ -glucan임을 밝혔다. 보통 alkali 비용해성 다당류는  $\beta$ -glucan이 치밀하게 packing 되어 있는 형태이다. 이와 같은 비가용성  $\beta$ -glucan은 endo- 및 exo-1,3- $\beta$ -glucanase에 의해 효소적 분해가 가능하고 최종 반응산물 역시 포도당이었다.

본 연구에서도 알칼리 추출물을 중화하여 다당류를 분리하는 과정에서 ethanol를 사용하면 예외 없이 비가용성 다당류가 생성되었는데, 이는 ethanol 및 물 분자에 의해  $\beta$ -glucan의 packing 그리고 chitin과의 공유적 결합등에 의해서 일어나는 것으로 추정되며(Sanchez-Hernandez *et al.*, 1990), 배양 영양원(특히, 탄소원)에 따라 그리고 균사체의 성장 정도에 따라 다른 수율로 분리되었다. 총 ganoderan의 수율은 균사체의 건중량과 비례적으로 증가되었으나, 탄소원에 따라 현저한 차이를 보였다. 용해성에 따른 ganoderan의 수율은 균사체의 생육이 우수하면 비수용성 분획이 더 많이 생산되었고, 생육이 낮은 탄소원의 경우 수용성 분획의 비율이 더 높았다. 이와 같은 결과는 생육이 우수한 탄소원의 경우, 균체외성 및 세포벽 외각의 glucan 축적이 상대적으로 많아지며, 에탄올 침전시 강한 packing 현상으로 비수용성 다당류를 형성하는 것으로 여겨진다. 탄소원에 따라 수확된 ganoderan의 이화학적 특성은 75~91%의 총 탄수화물, 1~7%의 단백질, 그리고 0.1~5%의 hexosamine이 포함되어 있었다. WS분획은 WI보다 탄수화물의 함량이 적었고, WI는 75~92% 정도의 탄수화물로 구성되어 있었으며, WS는 77~91% 내외의 탄수화물로 구성되어 있었다. Ganoderan의 구성에 포도당의 도입율을 알아보기 위해 D-[U- $^{14}$ C] 포도당을 0.15, 1 및 10 mCi를 첨가한 배지의 균사체로부터 수확된 ganoderan의 specific activity는 mg당 0.04~2.6  $\mu$ Ci이었다. 동위원소의 첨가량이 많아질 경우 ganoderan의 수율이

감소하였는데 이는 D-[U- $^{14}$ C] 포도당이 methanol에 용해되어 있어 균사체의 성장을 저해했기 때문이라 여겨진다.

이와 같은 결과로 볼 때, 포도당을 영지 균사체 배양시 탄소원으로 이용할 경우, 첨가된 포도당의 5.2~16%가 알칼리 가용성 ganoderan(AS)을 구성하는데 직접적으로 이용되어짐을 알 수 있었다. ganoderan의 주요 구성당은 주로 포도당, 만노오스, 리보오스, 과당 그리고 갈락토오스등으로 구성되어 있었으며, 구성당 함량중 대부분 포도당이 가장 많이 포함되어 있어 ganoderan은 glucan으로 볼 수 있었으나 G-C, G-GLU, G-MAN, G-LAC 그리고 G-SUC와 같은 ganoderan의 WS분획은 만노오스가 다량으로 포함되어 있어 glucomannan성의 다당류이었으므로 다당류의 용해성 차이에 이종의 당이 관여하는 것으로 볼 수 있다. 또한 WI는 WS보다 포도당의 함량이 20~40%가 많이 포함되어 있는 것으로 보아 ganoderan을 에탄올 추출시 중합체를 형성하는 것이 주로 포도당의 polymer인 것으로 여겨진다. 대부분의 ganoderan에서  $\beta$ -glucose이  $\alpha$ -glucose보다 많았으며, 영지 균사체를 알칼리 처리하여 추출되는 다당류는  $\beta$ -glucan성이며, 배지 조성에 따라 구성 당의 함량은 약간 상이하게 나타났다. 또한 균사체의 생장이 양호한 포도당, 가용성 녹말 및 말토오스와 같은 탄소원에서 배양된 균사체의 WI분획은 포도당의 함량이 90% 이상으로 나타났다는데, 이는 영지 균사체 성장에 최적의 탄소원이 부가되면 세포벽합성을 포함한 세포골격 및 분비성 다당류의 배출이 증가되며, 이와 같은 다당류의 구성당은 포도당임을 알 수 있다. 반면에 균사체의 탄소 기질로서 그 이용률이 낮은 탄소원은 균사체성 다당류 형성시 헤테로 다당류를 형성하는 경향을 나타내었다.

이와 같은 예로써, 배지내 탄소원이 결핍된 상태에서 성장된 균사체의 ganoderan G-C는 WS분획에서 만노오스의 양이 35.9%로 그 함량이 급격히 증가하였고 상대적으로 포도당의 양은 감소하였다. Ganoderan에 소량으로 결합되어 있는 아미노산을 분석한 결과 약 16개의 아미노산으로 구성되어있음이 확인되었으며, 특히 글루탐산, 아스파르트산과 같은 산성 아미노산과 그리고 비극성인 알라닌 함량이 가장 많았다. 보편적으로 탄소원에 따른 알칼리 가

용성 ganoderan(WS, WI)의 구성 아미노산은 탄소원과는 큰 관계없이 동일한 양상을 보였다. 그러나 탄소원이 결핍된 배지로부터 수획한 G-C 분획은 아르기닌의 함량이 24.4%(WS)와 20.7%(WI)로써 다른 탄소원보다 많은 함량을 포함하는 것으로 보아 영지 균사체가 ganoderan를 합성할 때 단백질이 관여하며(Andaluz *et al.*, 1988), 영양원에 따라서 ganoderan에 결합된 구성 아미노산의 양적 그리고 구성적 차이에 영향을 줄 수 있다는 것을 시사해 준다. Ganoderan-AS-WS와 AS-WI분획의 아미노산 조성을 비교해 볼 때 Pro, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Try, Phe과 같은 비극성이며 중성인 아미노산의 전체 함량은 거의 동일하였으나, Leu, ILue, Ala, Tyr 등과 같은 아미노산은 WI가 WS보다 약간 많았다. 반면에 WS는 WI보다 Asp, Glu이 상대적으로 많이 포함되어 있었다. 당 분석 실험 결과에 따르면, WS는 WI보다 heteroglucan의 특성을 나타냈으므로, 아마도 이종의 당을 구성하는데 Asp 및 Glu과 같은 아미노산이 직접적 관여가 있는 것으로 추정된다. 그러나 전반적인 구성아미노산 함량은 *Neurospora crassa*의 glycoprotein에서 보이는 amino acid 조성 과 유사한 결과를 보였다(Wrathall *et al.*, 1973).

$\beta$ -glucan성 다당류인지를 확인하는 방법으로 LAL test 및 IR spectrum을 알아본 결과, 모든 ganoderan이 LAL을 gel화하여  $\beta$ -1,3-glucan성이었고, IR spectrum를 측정하여 Baker등의 분석방법(Baker *et al.*, 1956)에 따라 확인한 결과, 대부분의 ganoderan은  $890\text{ cm}^{-1}$  부근에서 흡수 파장을 나타냄으로써  $\beta$ -결합을 갖는 다당류임을 확인하였다. 여러 탄소원을 이용하여 균사체를 배양하고 분리된 ganoderan의 평균 분자량을 확인하기 위하여 Sepharose CL 4B를 이용한 column chromatography를 실행한 결과, WS분획의 평균 분자량은 27~60 kD의 다당류였고, WI분획은 견고한 결합성 때문에 불규칙한 chromatogram을 나타냈으나, 평균 분자량이 900~3000 kD인 다당류로 볼 수 있었다. 즉 AS분획은 탄소원에 관계없이 단일 피크의 평균 분자량으로 가졌으나, WI는 주 피크가 2~3개의 분절된 분자량 분포를 갖고 있었다. 여러 분자량의 ganoderan의 생리적 활성 여부를 확인하기 위하여 항암 효과 및 항 보체 활성을 측정된 결과 보체 활성도가 가장 높게 나타난 것은 갈락토오스 배지에서 성장한 균

사체로부터 얻은 ganoderan-GAL로서 ITCH 50(%)치가 35.7%를 보였다. 특히 균사체의 생장이 낮은 탄소원에서 수획한 ganoderan이 항 보체 활성이 높게 나타났다. Sarcoma 180이 피하이식된 mouse에 20 mg/kg씩 복강 투여하여 항암 활성을 검토한 결과, 항 보체 활성실험에서와 마찬가지로 ganoderan G-GAL이 83.6%의 암 저지율을 보여 가장 높은 항암활성을 보였다.

1972년 Okuda 등(Okuda *et al.*, 1972)은 다당류에 의한 보체 활성화와 항암활성이 밀접한 관계가 있다고 보고하였는데 본 실험에서 알칼리 추출된 ganoderan의 경우 항 보체 활성이 우수한 ganoderan이 항암 활성도 높게 나타나 서로 부분적 상관 관계를 갖는 것으로 나타났다.

결과적으로 볼 때 항암 및 항보체활성에 우수한 잠재력을 갖는 ganoderan은 여러 탄소원 가운데 갈락토오스를 사용한 배지에서 성장한 균사체로부터 추출된 ganoderan-GAL로서, 이는 약 5%의 단백질이 결합된  $\beta$ -glucan성 다당류로 55%의 포도당, 13%의 만노오스 및 12%의 과당으로 구성된 분자량 30 kD의 다당류이다.

## 적 요

영지 균사체로부터 중앙 면역 활성이 우수한 다당류를 얻기 위하여 여러 탄소원을 이용하여 균사체를 배양하였다. 배양된 균사체로부터 ganoderan을 추출하고 이들의 조성과 항암 및 항보체 활성능을 알아보았다.

여러 탄소원은 영지 균사체에 의해 기질로 이용될 수 있으나  $\beta$ -glucan성 다당류인 ganoderan의 생성에는 상당한 차이를 보였다. 균사체 생육이 우수한 탄소원에서 배양된 균사체의 경우, 비수용성(WI) 다당류의 생성이 증가하였고, 생육이 저하된 탄소원에서는 수용성(WS) ganoderan이 상대적으로 증가하였으며, 포도당을 탄소원으로 사용할 경우 약 5.2~16%가 알칼리 가용성 ganoderan으로 도입되었다.

탄소원에 따라 수획된 ganoderan은 포도당을 주구성당으로 이루어진  $\beta$ -glucan성 다당류이며 만노오스, 과당 등이 포함되어 있었으나, 비수용성 ganoderan의 경우 수용성보다 포도당의 함량이 약 20~

40% 더 많이 포함되었으며 약 16개의 아미노산으로 구성된 소량의 단백질이 결합되어 있었다. WI은 glucose가 주 구성당이었으나 WS는 여러 당들이 상대적으로 많이 포함되어 있는 heteroglucan의 성격을 보였다.

탄소원에 따라 배양된 균사체의 알칼리 추출된 ganoderan 가운데 항암 및 항 보체 활성이 가장 우수한 것은 갈락토오스를 탄소원으로 이용한 ganoderan이었으며 항보체 활성(ITCH 50%)치가 35.7%였고, 특히 균사체의 생장이 낮은 탄소원에서 수확한 ganoderan이 항보체 활성이 높게 나타났다. Sarcoma 180이 피하이식된 마우스에 20 mg/kg씩 복강 투여하여 항암 활성을 검토한 결과, 항보체 활성 실험에서와 마찬가지로 갈락토오스를 탄소원으로 이용한 ganoderan-GAL이 83.6%의 암 저지율을 보여 항암 활성이 가장 높았으며, 이는 약 5%의 단백질이 결합된  $\beta$ -glucan성 다당류로 55%의 포도당, 13%의 만노오스, 12%의 과당 및 소량의 galactose, xylose, ribose등으로 구성된 분자량 30 kD의 다당류이다.

### 參考文獻

- Andaluz, E., Redruejo, J.C., Ramirez, M., Ruiz-Herrera, J. and Larriba, G. 1988. Initiation of glucan synthesis in yeast. *FEMS Microbiol. Letters*. **49**: 251-255.
- Baker, S.A., Bourne, E.J. and Whiffen, D.H. 1956. Use of infrared analysis in the determination of carbohydrate structure. *Methods Biochem. Anal.* **3**: 213-245.
- Bast, R.C., Zbar, B., Borsos, T. and Rapp, H.J. 1974. BCG and Cancer. *New Engl. J. Med.* **290**(25): 1413.
- Bradner, W.T., Clarke, D.A. and Stock, C.C. 1958. Stimulation of host defense against Experimental Cancer. I. Zymosan and Sarcoma 180. *Cancer Res.* **18**: 347-351.
- Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. 1986. Carbohydrate analysis, IRL Press, Oxford, Washington DC. Pp. 4-5.
- FDA. 1983. Draft guideline for validation of the *Limulus* ameobocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. *Pharmaceutical Forum.* **9**: 3012-3021.
- Franz, G. 1989. Polysaccharides in pharmacy: Current applications and future concepts. *Planta Medica.* **55**: 493-497.
- John, B. and Hammond, W. 1977. Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus*: Oxidative pathways in mycelium and sporophore. *J. Gen. Microbiol.* **102**: 245-248.
- Kakinuma, A., Asano, T., Torii, H. and Sugino, Y. 1981. Gelation of *Limulus* ameobocyte by antitumor (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**: 434-439.
- Kim, B.K., Chung, H.S., Chung, K.S. and Yang, M.S. 1980. Studies on the antineoplastic components of Korean basidiomycetes, mycelial culture and antineoplastic component of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* **8**: 107-113.
- Larriba, G., Morales, M. and Ruiz-Herrera, J. 1981. Biosynthesis of  $\beta$ -glucan microfibrils by cell-free extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **124**: 375-383.
- Levin, J. and Bang, F.B. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **19**: 186-197, 1968.
- Okuda, T., Yoshioka, Y., Ikekawa, T., Chihara, G. and Nishioka, K. 1972. Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature New Biol.* **238**: 59-60.
- Sanchez-Hernandez, E., Garcia-Mendoza, C. and Novas-Ledieu, M. 1990. Chemical characterization of the hyphal wall of the basidiomycetes *Armillaria mellea*. *Exp. Mycol.* **14**: 178-183.
- Smith, P.K., Krohn, R.L., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E. K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A. 1985. Structure and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 2641-2653.
- Ushi, T., Iwasaki, Y. and Mizuno, T. 1983. Isolation and characterization of antitumor active  $\beta$ -D-glucan from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum*. *Carbohydrate Res.* **115**: 273-280.
- Wrathall, C.R. and Tatum, E.F. 1973. The peptide of cell wall of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **78**: 139-153.
- Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Kojima, Y., Ku-



- mazawa, Y. and Otsuka, Y. 1984. Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. *Planta Med.* **50**: 163-167.
- 水野 卓, 川合正允 キノコの 化学・生化学 新 日本印刷株式会社, 1992. 東京. 日本. pp. 35-87.
- 有地 滋, 谿 忠人, 久保 道德, 松田 秀秋, 吉村 成年, 桐ヶ谷紀昌, 1979. 靈芝(*Ganoderma lucidum*, 子實體)の研究: 基礎 の 臨床. **13**: 175-180.
- 이권형, 정훈, 이준우, 한만덕, 김영일, 오두환. 1994. *G. lucidum* IY009 다당 분획들의 항암활성과 항 보체 활성간의 상관관계. 한국산업미생물학회지 **22**(1): 45-51.