

## 구름버섯의 균사배양액 및 자실체로부터 얻어진 단백다당체의 수율비교

박영도·홍용기·황완균·허재두·박 신\*

광동제약(주) 중앙연구소, \*영남대학교 농축산대학 식품가공학과

### Comparisons of Protein-bound Polysaccharide Contents Obtained from Mycelial Cultured Broth and Fruit body of *Coriolus versicolor*

Young-Do Park, Yong-Ki Hong, Wan-Kyun Whang, Jae-Doo Huh and Shin Park\*

Institute of Central Research, Kwang-Dong Pharmaceutical Co. LTD, Seoul 150-053 and

\*Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Animal Science,  
Yeung-Nam University, Gyoung san 713-800, Korea.

**ABSTRACT:** This study was performed to obtain higher yield rate of protein-bound polysaccharide extracted from cultured broth and fruit body of *Coriolus versicolor*, basidiomycetes. 16002 strain produced 0.58%, the highest yield rate among four strains, and there was no significantly different yield in other three strains. The optimal liquid media were CVT-III to obtain higher yield of protein-bound polysaccharide comparing with the various culture media. Compared with several materials for substitution of medium source, the residue extract media of *Coriolus versicolor* fruit-body were yield rate similar to control, and addition of the extracts of ginseng residues increased 11.4-48%. And also compared with fruit bodies that were artificially cultured on the oak longs, 16002 strain produced the highest yield similar to the result of cultured broth. Fruit body of the prematured stage was more effective to obtain high yield rate.

**KEYWORDS:** Protein-bound Polysaccharide, Cultured broth, Fruitbody, *Coriolus versicolor*, Basidiomycetes.

오래전부터 고등균류 중 버섯에는 여러 가지 생리활성물질들이 존재하고 있음이 알려져 왔다. 특히 유효성분들 중에서도 항암성분에 대한 연구가 활발하여 *Boletus edulis* (Lucas 등, 1957), *Lentinus edodes* (Chihara 등, 1970), *Pleurotus ostreatus* (Yoshioka 등, 1972), *Flammulina velutipes* (Yoshioka 등, 1973), *Lampteromyces japonica* (Fukuda 등, 1975) *Ganoderma lucidum* (Ito 등, 1977), *Grifola frondosa* (Tizuno 등, 1986), *Lyophyllum decastes* (Lee 등, 1987) 그리고 *Agaricus bisporus* (Nanba 등, 1988) 등에서 추출된 glucan 구조를 갖는 물질들이 암세포에 대해 강한

억제작용을 나타낸다고 보고되어 왔다.

담자균류 중 다공균과 (*Polyporaceae*)에 속하는 목재부후균인 구름버섯 *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel. 은 자연에 널리 자생하고 있는데 이것은 특히 다른 담자균류에 비해 항암작용에 뛰어난 것으로 보고되어 온 이래로 (伊藤 등, 1972; Kim 등, 1982) 이에 대한 약리작용의 연구가 활발하게 진행되어 Tsukagoshi (1974) 등은 자실체를 열수 추출하여 protein-bound polysaccharide 라는 단백다당체를 얻었는데 이것이 sarcoma -180에 대하여 항암작용이 있음을 밝힌 바 있을뿐 아니라 그 외에도 많은 연구들이 실시되어 (Nomoto 등, 1975; Hirase 등, 1976) 근년

에 들어서는 이를 상품화하기에 이르렀다.

이에 본 연구는 한국산 구름버섯의 균사체 배양액과 자실체로부터 고수율의 단백다당체를 얻기 위한 기초연구로써 균주와 배지간에 있어서의 차이와 인공재배된 자실체간의 생산수율에 대하여 실험을 실시한 바 그 결과를 보고하고자 한다.

材料 및 方法

균 주

본 실험에 사용한 균주는 한국산 구름버섯인 *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel. 로써 Park 등(1989)이 보고한 균주와 동일한 균주이며, 자실체는 각각의 균주들을 참나무 원목에 인공재배하여 채집한 것을 사용하였다.

배 지

균배양 배지로는 PDA 외 4종으로 성분조성은 Table I 과 같다. 각 배지는 121°C (15 Lb)에서 15분간 멸균하여 사용하였으며, 약재추출박 첨가 배지는 증류수 대신 100°C에서 1시간 동안 추출한 약재추출박의 여액을 동일량씩 사용하였다.

균배양

조제한 배지를 5l Round bottom flask 에 500 ml 씩 분주하여 멸균한 다음 페트리 접시에서 5일 동안 배양된 균사체를 각각 동일량씩 접종하여 27°C의 진탕배양기에서 120 strokes/min 로 7일 간 진탕배양하였다.

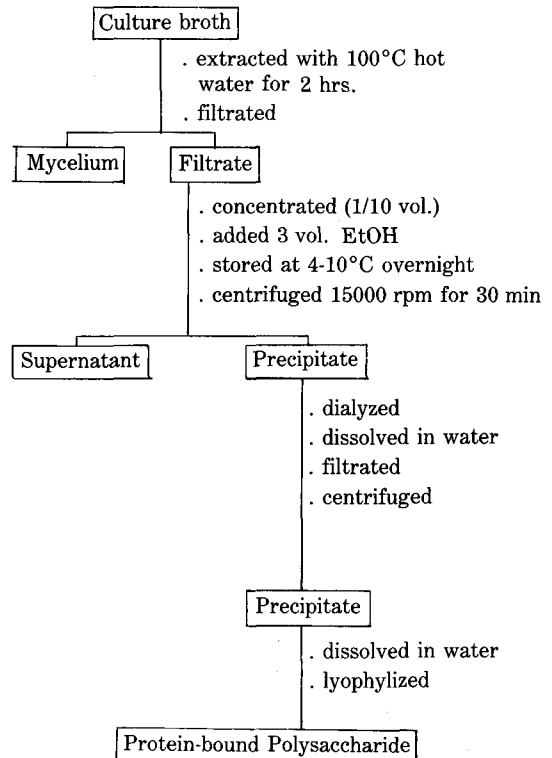
균사배양액으로부터 단백다당체의 추출

배양액에 각각 물을 동일량씩 첨가한 다음 100°C에서 2시간씩 추출하고 여과지(Whatman No.2)로 여과하여 잔사를 제거하였다. 여과액을 감압농축기로 1/10량으로 농축한 후 3배의 에탄올을 가하여 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 침전물이 형성된 후 1분당 15,000 rpm 의 원심분리기를 사용하여 30분간 원심분리하여 침전물을 수거한 다음 이를 visking tube 을 사용하여 흐르는 물에 48시간 동안 투석하고 농축하여 다시 증류수에 녹였다. 위와 같은 방법에 따라 두 번 동일한 과정을 실시한 다음 증류수에 녹인 것을 동결건조하여 protein-bound polysaccharide 를 얻었다 (Scheme 1).

Table I. Composition of used media.

Media Component	927	PDA	CVT-II	CVT-III	MCM	Hamada
Potato	10*	250				
Hyponex						2
Soy ext			50	100		
Onion powder			7	14		
Yeast ext	5				2	2
Peptone	5				2	
Dextrose	50				20	20
Sucrose 1N·HCl		20	50	100		1.6cc
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5		1	1	0.46	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>					1	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O			0.5	0.5	0.5	
MnSO <sub>4</sub>	0.5					

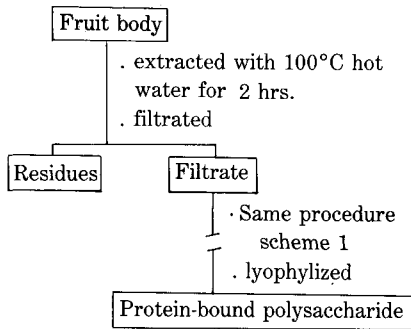
\*g/l



Scheme 1. Extraction and fractionation of the polysaccharide from the cultured broth of *Coriolus versicolor*

**자실체로부터 단백다당체의 추출**

자실체를 60°C에서 24시간 동안 열풍건조한 다음 세절하여 100g 씩 5l Round bottom flask 에 넣고 3배량의 물을 가하여 100°C에서 2시간 동안 추출하고 여과하여 그 여액을 균사배양액에서와 같은 방법으로 농축, 에탄올 침전, 원심분리, 투석, 농축한 후 동결건조하여 protein-bound polysaccharide 를 얻었다(Scheme 2).



**Scheme 2** Extraction and fractionation of the polysaccharide from fruit body of *Coriolus versicolor*.

**結果 및 考察**

**균주별 단백다당체의 수율비교**

각각의 균주를 CVT- II 배지에 동일량씩 접종한 후 배양하여 7일 후에 추출된 각 균주별 단백다당체의 생산수율을 비교한 결과 Table II에서와 같이 16002가 0.58%로 가장 양호하였으며, 나머지 3균주간에는 CVT-80이 0.38%, 16001이 0.32%, KD 88001이 0.31%로 큰 차이는 보이지 않았다. 이와 같이 높은 수율의 단백다당체를 얻기 위해서는 우선 균주의 선택이 매우 중요한 것으로 나타났다.

**배지에 따른 단백다당체의 수율비교**

1) 공시배지별 비교

대체적으로 평판배지상에서 균사의 생장이 양호했던 공시배지 PDA 의 4종에 대해 CVT-80균주를 동일량씩 접종하여 액내 배양한 후 단백다당체의 생산수율을 비교한 결과 배지에 따라 큰 차이를 보였다(Table III). CVT-III 배지는 0.51%의 높은 수율을 보인 반면에 PDA 는 0.15%의 낮은

**Table II.** Comparison of polysaccharide contents obtained from cultured broth of different strains

Strains	Yield of polysaccharide* (%)
16001	0.32
16002	0.58
KD88001	0.31
CVT-80	0.38

\*Expressed as the amounts of weight %

**Table III.** Polysaccharide contents obtained from cultured broth of *C. versicolor* in several cultured media

Media	Yield of polysaccharide (%)
927	0.40
PDA	0.15
MCM	0.32
Hamada	0.25
CVT-III	0.51

수율을 보임으로써 각각의 배지성분에 따라 균사체가 생성하는 단백다당체의 수율에는 큰 차이가 있음을 보였다.

2) 산업적 응용을 위한 배지개발

CVT-III 배지는 균사배양 배지로는 적합하나 이를 산업적으로 이용하기에는 비용이 너무 높아 이를 개선하여 낮은 원가의 배지를 개발하기 위하여 CVT-III의 배지성분 중 탄소원이나 질소원을 산업폐기물로 대체하고자 약재추출박이나 구름버섯 자실체추출박 및 인삼추출박을 사용하였으며, 이들을 재추출하여 그 여액을 배지로 조제한 다음 균사를 배양하여 단백다당체를 추출해 수율을 비교한 결과는 Table IV, V와 같다.

Table IV에서 약재추출박 중 다소 목질성이 많은 감초, 작약과 여러 가지가 혼합된 추출박 및 구름버섯의 자실체추출박을 재추출하여 CVT-III 배지성분 중 Soy exts.를 제외하고 동일량의 추출액을 넣어 균사를 배양한 다음 단백다당체의 수율을 비교한 결과 구름버섯추출박을 이용한 배지는 0.45%로 대조군인 CVT-III 배지의 0.48%와 비슷한 수율이 얻어졌다. 그러나 다른 약재추출박

**Table IV.** Polysaccharide contents obtained from cultured broth of *C. versicolor* in the several herb extract media.

Materials of media	Yield of Polysaccharide (%)
Glycyrrhizae radix exts.	0.18
Paeoniae radix exts.	0.16
<i>Coriolus versicolor</i> fruit body exts.	0.45
Mixed herb exts.	0.28
CVT-III (control)	0.48

Herb materials are residues of extracted with hot water for 8 hrs.

배지에서는 감초가 0.18%, 작약이 0.16%, 혼합한 것이 0.28%로 오히려 감소하였으며, 균사의 성장도 억제시키는 현상을 보였다. 따라서 구름버섯 추출액 추출액은 CVT-III 배지성분 중 Soy ext.를 대체할 수 있어 산업적으로 활용할 수 있는 가능성을 확인하였다. 이와 같이 미생물을 배양하는데 있어 폐기물내지 값이 싼 물질을 배지로 이용하기 위한 시도는 Block 등(1953)이 orange juice와 꿀겉질의 즙을 *Agaricus blazei* 배양에 사용했을 때 탁월한 버섯균사의 생산수율을 증가시켰다고 보고했으며, 심(1984)은 구름버섯의 균사체 배양에 있어 질소원으로 면실박과 생장촉진인자로 인삼사포닌이나 인삼박을 첨가하면 항암성 다당류의 생성량이 현저히 증가함을 보고한 바 있다.

Table V에서는 구름버섯의 추출액 추출액에 인삼추출액 추출액을 첨가했을 때 단백질다당체의 생성률을 비교한 결과인데 구름버섯의 추출액 배지에서는 43-48%, CVT-III에서는 11.4%의 수율 증가를 보여 인삼추출액은 균사배양에 있어 촉진인자로 작용함을 확인하였으며, 이는 심이 보고한 결과와 일치함을 보였다.

#### 자실체에 있어 균주별에 따른 단백질다당체의 수율비교

각 균주를 각각 동일 환경하에서 참나무원목에 인공재배하고 채집하여 이들로부터 각각 추출된 단백질다당체의 수율을 비교했을 때 균사배양액에서 가장 양호한 생산수율을 보였던 16002균주가 자실

**Table V.** Polysaccharide contents obtained from cultured broth of *C. versicolor* in media containing ginseng extracts

Materials of media (g/l)	Yield of polysaccharide (%)
*CVF 100	0.25
CVF 100+GS** 10	0.37
CVF 200	0.30
CVF 200+GS 20	0.40
CVF 200+GS 40	0.43
CVT-III +GS 40	0.49
CVT-III (Control)	0.44

\*CVF media are substitute *Coriolus versicolor* extracts for soy extracts same quantity from CVT-III.

\*\*GS indicates ginseng. CVF and GS are residues extracted with hot water for 8 hrs.

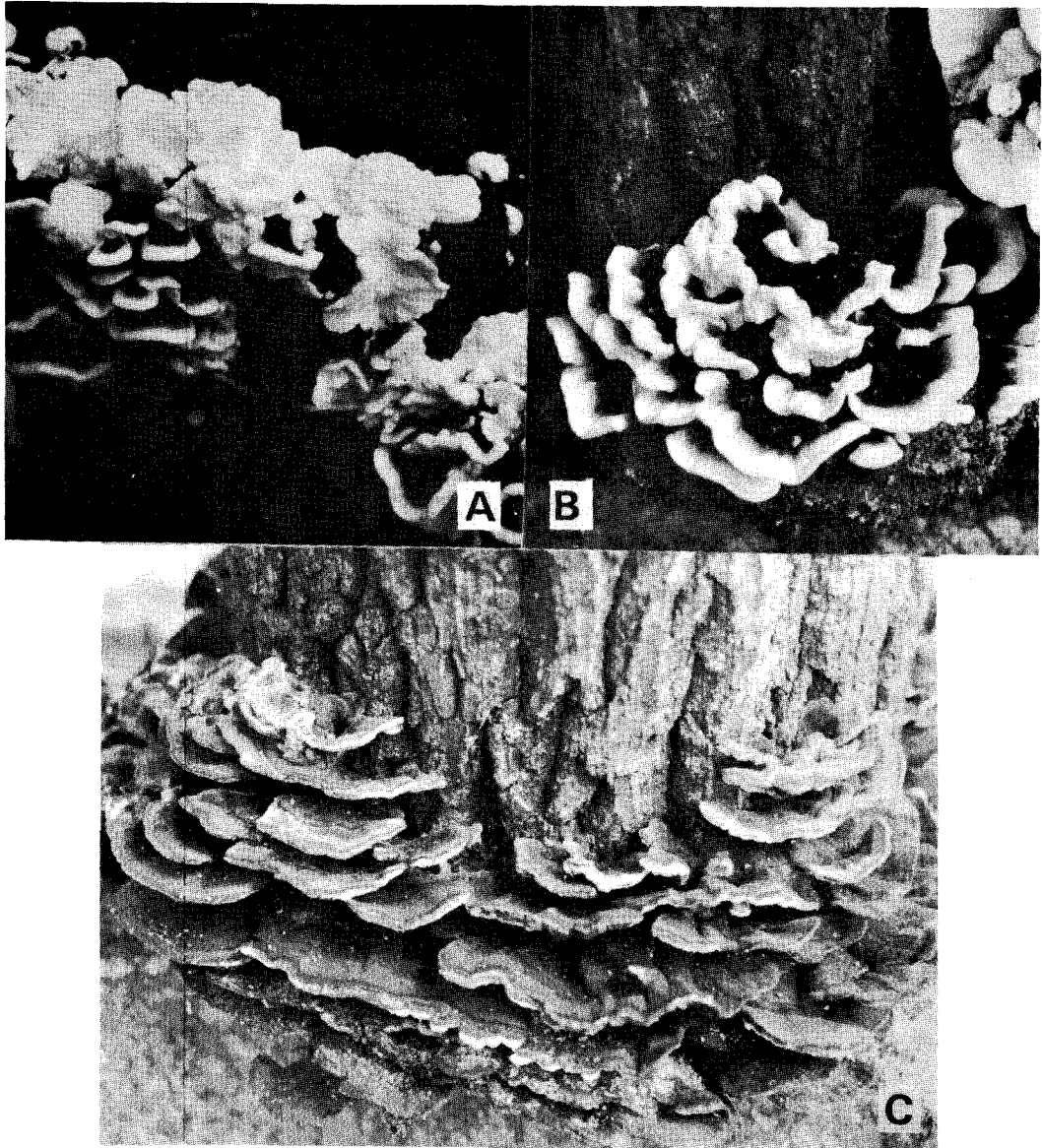
**Table VI.** Polysaccharide contents obtained from of *Coriolus versicolor* fruit body collected in different stages.

Stage of collection	Yield of polysaccharide (%)
Yong ages	19.25
Middle ages	16.25
Old ages	12.25

체에 있어서도 19.25%로 가장 높은 수율을 보였으며, CVT-80과 16001이 각각 18.25, 16.25%를 나타내 균사배양액에서와 비슷한 경향을 보였다(Table VI). 따라서 배양산물에 대한 단백질다당체의 생성능력은 모균주의 생성능력과 밀접한 관계가 있음을 나타냈다.

#### 자실체의 채집시기별 단백질다당체의 수율비교

원목에서 인공재배를 실시하면서 plate 1에서와 같이 자실체의 생육시기에 따라 3단계로 구분하여 수율을 비교한 결과 자실체의 갓면에 갈색의 환무늬가 형성되기 이전(A)과 갓면에 흑갈색의 무늬가 형성되고 갓의 가장자리 부분에 성장이 계속되고 있을 때(B) 그리고 갓의 전면이 회갈색으로 변하고 성장이 정지된 때(C)에 채집하여 추출한 것에서 각각 19.25, 16.25, 12.75% 수율을 보여 높은 수율의 단백질다당체를 얻기 위해서는 자실체를 갓



**Plate 1.** Fruit bodies of *Coriolus versicolor* from artificial cultivation.  
A: young state B: middle state C: old state.

면에 환무늬가 나타나기 이전에 채집하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 자실체가 성숙할수록 세포벽이 두꺼워져 목질화내지 각질화됨으로써 세포를 구성하고 있는 다당체가 쉽게 용출되어 나오지 못할 뿐만 아니라 생성된 다당체도 버섯 자체의 생리대사물질로 사용되어 다른 성분으로 변성되기 때문인 것으로 사료되나 이

에 대한 연구는 앞으로 더 수행되어야 할 것이다.

### 摘 要

구름버섯의 균사체배양액과 자실체로부터 높은 수율의 단백다당체를 얻기 위하여 균주 및 배지별에 따른 차이와 폐기물을 이용한 균배양에 대하여 실

험을 실시한 결과를 요약하면 다음과 같다.

계통이 다른 4종의 균주 중에서 16002 균주가 0.58%로 가장 높은 수율을 보였으며 나머지 3균주 간에는 큰 차이가 없었다.

평판배지에서 균사의 생장이 양호했던 배지들 중 액내 배양하여 단백다당체를 추출한 결과 CVT-III가 0.51%로 가장 양호했으며 각 배지간에는 큰 차이를 보였다.

약재추출박과 구름버섯의 자실체 추출박을 배지의 성분으로 이용했을 때 구름버섯의 추출박을 이용한 배지에서는 대조군에 비해 대등한 수율을 나타냈으며 인삼추출박을 첨가했을 때는 11.4-48%의 수율증가를 보였다.

인공재배를 한 자실체간에 있어 단백다당체의 수율을 비교했을 때 균사배양액에서와 같은 경향을 보였으며 높은 수율의 단백다당체를 얻기 위해서는 어린시기에 자실체를 수확하는 것이 효과적이었다.

### 參考文獻

- Block, S.S., Stearns, T.W., Stephens, R.L. and Mccandless, R.F. J. (1953): Mushroom mycelium, experiments with submerged culture. *J. Agr. Food Chem.* 1: 890-893.
- Cihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. (1970): Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.* 30: 2776-2781.
- Fukuda, K., Uematsu, T., Hamada, A., Akiya S., Komatsu, N. and Okubo, S. (1975): The polysaccharide from *Lampteromyces japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.* 23: 1955-1959.
- Hirase, S., Nakai, S., Akatsu, T., Kobayashi, A., Ohara, M., Matsunaga, K., Fujii, M., Kodaira, S., Fujii, T., Furusho, T., Ohmura, Y., Wada, T., Yoshikumi, C., Ueno, S. and Ohtsuka, S. (1976): Structural studies on the antitumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes). II. Structures of -D-glucan moieties of fractionated polysaccharides. *Yakugaku Zasshi* 96: 419-424.
- Ito, H., Naruse, S. and Shicura, K. (1977): Studies on antitumor activity of basidiomycete polysaccharides. *Mie. Med. J.* 26: 147-152.
- Kim, B.K., Choi, E.C, Chung, K.S., Kang, C.Y., Kim, S.H., Kim, Y.J., Lee, K.L. and Lee, J.K. (1982): Studies on the constituents of higher fungi of Korea. *Arch. Pharm. Res.* 5(1): 21-23.
- Lee, C.O., Choi, E.C. and Kim, B.K. (1987): Immunological studies on antitumor component of *Lyophyllum decastes*(I). *Yakhak Hoeji* 31(2): 70-81.
- Lucas, E.H. Ringler, R.U., Clarke, D.A., Reilly, H.C., Stevens, J.A. and Stock, C.C. (1957): Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other Holobasidiomycetes. *Antibiot. Chemotherapy* 7: 1-4.
- Nanba, H. and Kuroda, H. (1988): Potentiation of host-mediated antitumor activity by orally administered mushroom (*Agaricus bisporus*) Fruit bodies. *Chem. Pharm. Bull.* 36(4): 1437-1444.
- Nomoto, K., Yoshikumi, C., Matsunaga, K., Fujii, T. and Takeya, K. (1975): Restoration of antibody-forming capacities by PS-K in tumor-bearing mice. *Gann.* 66: 365-374.
- Park, Y.D., Whang, W.K., Huh, J.D., Kim, S.H. and Park, W.M. (1989): Comparisons of Physiological Characteristics in *Coriolus versicolor* Interstrain Specific Strains. *Kor. J. Mycol.* 17(1): 7-13.
- Tizuno, T., Ohsawa, W., Hagiwara, N. and Kuboyama, R. (1986): Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from maizetake, *Grifola frondosa*. *Agric. Biolo. Chem.* 50 (7): 1679-1688.
- Tsukagoshi, S. and Ohashi F. (1974): Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann.* 65:557-558.
- Yoshioka, P., Ikekawa, T., Noda, M. and Fukuoka, F. (1972): Studies on antitumor activity of some fractions from basidiomycetes. I. An antitumor acidic polysaccharide fraction from *P. ostreatus* (Fr.) Quel. *Chem. Pharm. Bull.* 20: 1175-1180.
- Yoshioka, Y., Sano, T. and Ikekawa, T. (1973): Studies on antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes* (Curt. ex. Fr.) Sing. *Chem. Pharm. Bull.* 21: 1772-1776.
- 심미자(1984) : 항암성 다당류의 제조방법. 대한민국 특허공보. 84-505.
- 伊藤 均, 成瀬 千助, 藤井喜一郎(1972) : 担子菌類の抗腫瘍作用について. 日薬理誌 68: 429-441.