

## 운지버섯 균사체 추출물의 항암효과에 관한 연구

이병우\* · 이명섭<sup>1</sup> · 박기문 · 김창한<sup>1</sup> · 안평옥 · 최춘언  
오뚜기 중앙연구소, <sup>1</sup>건국대학교 동물자원연구센터

### Anticancer Activities of the Extract from the Mycelia of *Coriolus versicolor*

Lee, Byung-Woo\*, Myung-Sub Lee<sup>1</sup>, Ki-Moon Park, Chang-Han Kim<sup>1</sup>,  
Peong-Ug Ahn and Chun-Un Choi

Ottogi Research Center, Anyang 430-070, Korea

<sup>1</sup>Animal Resources Research Center, Kun-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

**Abstract** — An anticancer substance was prepared by ethanol precipitation of the hot water extract of culture mycelia of *Coriolus versicolor* KFCC 30388. After 6 days of fermentation, the mycelia growth reached the peak and reducing sugar consumed almost all. HTCFA method has been employed for three human cancer cell lines, Hep-2(larynx cell), A-427 and Calu-3 (lung cell). Anticancer activities in A-427 and Calu-3 were 8.4 and 9.8% survival rate, respectively. The chemical analysis of the extract from the mycelia showed 42.2% of polysaccharide and 10.5% of protein. The polysaccharide consisted of five kinds of monosaccharides, L-glucose, D-glucose, galactose, mannose and xylose.

버섯은 분류학상으로 균류계중에서 진균류에 위치하며 대부분 담자균류에 속하나 일부는 자낭균류 그리고 드물게는 점균류 중에서도 볼수 있다. 이러한 버섯은 미세하고 실같은 균사로 되어있으며, 수많은 균사의 집합체를 균사체라 하고, 이들이 모여서 자실체를 형성한다. 이들 버섯류들은 향미성분과 약리효과 때문에 식용 및 약용으로 이용하며 최근들어 항암효과가 있는 것으로 알려진 이래 많은 연구가되고 있다. 이중 *Lentinus edodes*(1,2), *Coriolus versicolor*(3), *Ganoderma lucidum*(4), *Lepiota procera*(5), *Grifola frondosa*(6), *Lyophyllum ulmarium*(7), *Ganoderma applanatum*(8) 등으로부터 얻은 단백다당체가 항암효과가 있다고 보고되고 있으며, *Coriolus versicolor*의 단백다당체는 면역증강제(상품명: Krestin)로 판매되고 있다.

이들 단백다당체는 종양에 대한 생체고유의 방어력을 높여줌으로서 간접적으로 종양세포를 저지한다고 제시하며, 또 암세포나 병균을 직접 죽이는 중요한

역할을 담당하는 대식세포의 수를 증가시킨다고 보고하였다(1).

주로 실험동물에 P<sub>388</sub>, L<sub>1210</sub> 및 S<sub>180</sub> 등의 암세포를 이식하여 이식 암세포의 생육억제 효과나 암세포 이식동물의 연명효과로서 보고되고 있으나, 인체 암과 실험동물 암 사이의 대사작용의 차이, 장기간의 실험 및 막대한 실험비용을 요하는 단점이 있다(9). 이러한 단점을 개선하기 위하여 *in vitro*에서 직접 인간의 암세포를 이용하여 신속하게 항암효과를 측정하는 방법들이 개발되고 있으며(10, 11), 국내에서는 김 등이 human tumor colony forming assay(HTCFA)를 응용한 plate assay법의 모델을 확립하여 보고하였다(12).

본 연구는 *Coriolus versicolor*의 균사체를 배양한 후 단백다당체를 추출하여 3종의 암세포에 대한 항암활성을 조사하여 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배양방법

본 실험에 사용한 균주는 운지버섯(*Coriolus versi-*

**Key words:** Anticancer substance, HTCFA, mycelia, *Coriolus versicolor*

\*Corresponding author

Table 1. Growth medium composition

| Constituent                          | Amount (%)   |
|--------------------------------------|--------------|
| Glucose                              | 2.00         |
| Yeast extract*                       | 1.20         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0.046        |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0.10         |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.20         |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.05         |
| Sucrose                              | 2.00 /pH 4.0 |

\*조흥화학에서 구입

color KFCC 30388) 균으로 한국중균협회로부터 분양 받아 사용하였다. 사용한 배지는 Table 1과 같으며 배양방법은 Fig. 1과 같이 하였다. 배양장치는 Swiss Bioengineering fermentor(working vol. 30 liter)를 이용하여 교반속도 200 rpm, 온도 25°C에서 배양하였다.

#### 단백다당체의 분리

배양액을 100°C에서 3시간 추출한 다음 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 감압농축하고, ethanol을 가하여 4°C에서 24시간 방치하였다. 침전물을 회수하여 증류수로 녹인 후 같은 조작을 2회 실시한 후 동결건조하여 단백다당체를 분리하였다.

#### 균사체량의 측정

배양액을 여과하여 얻은 균사체를 동결건조하여 건조균사체량을 조사하였다.

#### Economic yield coefficient

Economic yield coefficient는 yield of product(g/l) /total substrate (carbon source)로 표시하였다.

#### Cancer cell lines 및 cancer cell의 배양

실험에 사용한 암세포는 Hep-2, A-427 및 Calu-3이며 이들 암세포는 미국 Texas San Antonio 소재 University of Texas Health Science Center의 D.D. Von Hoff 교수의 암학 연구실에서 분양 받았으며, 암세포의 배양은 다음과 같은 배지로 25 cm<sup>2</sup> flask로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하였다.

이들 암세포의 배양배지는 다음과 같다. Hep-2 후두암세포는 Eagle's MEM 배지에 10% fetal bovine serum을 첨가하였고, A-427 폐암세포는 Eagle's MEM 배지에 10% fetal bovine serum, 1% sodium

Mycelia grown on PDA slant

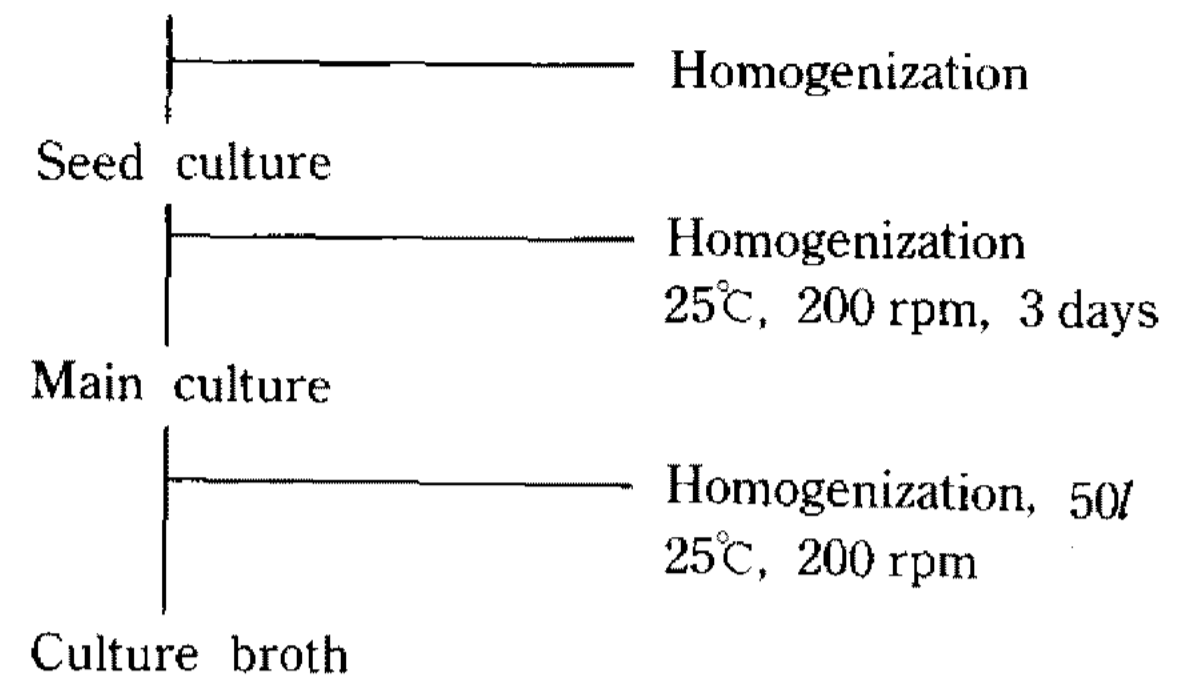


Fig. 1. Culture method of *Coriolus versicolor*.

pyruvate 및 1% mem non-essential amino acid를 첨가하였다 그리고 Calu-3 폐암세포는 Eagle's MEM 배지에 10% fetal bovine serum, 1% sodium pyruvate, 1% mem non-essential amino acid, 1% penicillin/streptomycin(10,000 ng/ml), 1% glutamine 및 1% mem vitamin을 첨가하여 사용하였다.

#### 항암효과 측정

항암효과 측정은 김 등(12)이 확립한 model에 의하여 실시하였다. 즉 직경 35 mm 조직배양용 petri dish에 0.5% agar를 함유하는 McCoy's-5A 배지 1 ml를 주입하여 하층을 만들고, 0.3% agar를 함유하는 double-enriched CMRL-1066 배지에 균사체 추출물과 암세포를 섞어 상층을 조제하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 14일 후 형성된 colony를 계수하였다.

#### 단백다당체의 화학적 분석

당의 함량은 페놀-황산법(13)으로 측정하였으며, 단백질 함량은 Kjeldahl 법으로 측정하였다. 구성당의 분석은 0.1 N-HCl로 가수분해한 다음 동결건조한 분말시료에 pyridine 50 µl, hexamethyl disilazane 45 µl, trifluoroacetic acid 5 µl을 가하여 35°C에서 30분간 반응시켰다. 이때 column은 Dexil-300, injection temperature 350°C, detection temperature 130~330°C, 5°C/min으로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

#### 질소원 배지에 대한 영향

Mushroom 등을 배양할때 여러가지 질소원중 yeast extract와 peptone을 가장 많이 사용하며 또한 균사체 생산도 우수하다는 보고가 있다(3, 14). 이미 박등(14)이 보고한 *Coriolus versicolor*의 영양배지 조성에

**Table 2. Growth of *Coriolus versicolor* with and without peptone in media**

|                      | Total mycelia<br>(dry wt., g/l) | Economic yield<br>coefficient |
|----------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Media-1 <sup>a</sup> | 17.8                            | 0.445                         |
| Media-2 <sup>b</sup> | 17.2                            | 0.430                         |

<sup>a</sup>Growth medium (table 1)+0.4% peptone

<sup>b</sup>Growth medium (table 1)

서 CVM(*Coriolus versicolor* medium) 배지와 MCM (mushroom complete medium) 고체배지에서 균사체 생성이 가장 양호하였다. 이들배지의 질소원은 yeast extract 0.6%에 peptone을 각각 0.4%, 0.2%를 사용하였다. 따라서 본실험에서는 yeast extract(조흥화학 제품)를 2배로한 기본배지에 peptone 0.4%를 첨가한 배지(media-1)와 기본배지(media-2)를 사용하여 기질 carbon이 조직 carbon으로 전환시키는 economic coefficient를 조사한 결과 Table 2와 같이 Media-1에서는 0.445, Media-2에서는 0.430으로 peptone 0.4%를 사용하였을때 economic coefficient가 0.015 높지만 media의 경제성을 고려할 때 Media-2가 바람직하다.

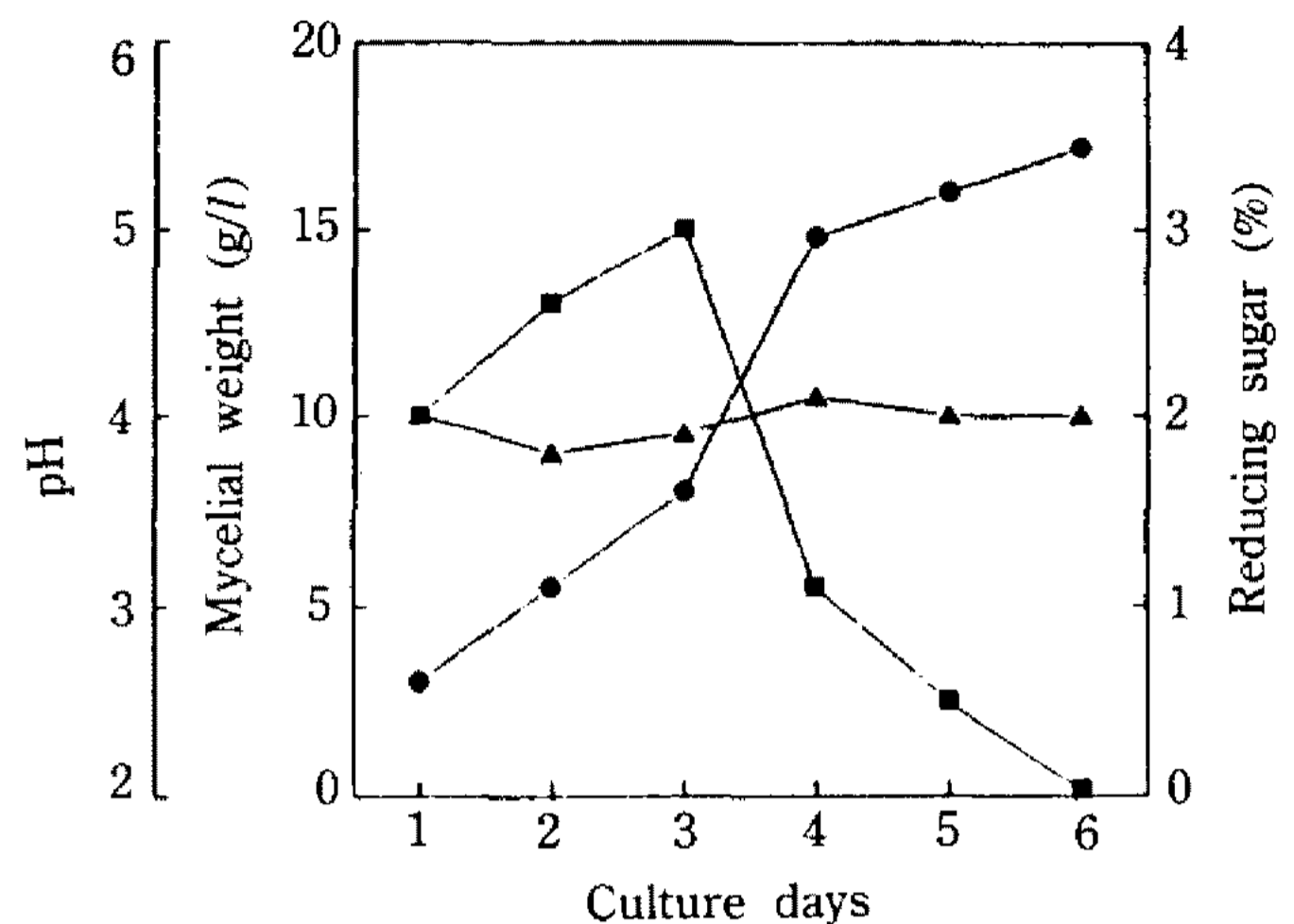
**발효중 균사체 함량 및 환원당의 변화**

균체량 및 환원당의 변화는 Fig.2와 같았다. 즉 발효시간이 경과함에 따라 균체량은 증가하여 배양 6일째 17.2 g/l이었으며, 이후 배양일수가 경과하여도 균사체의 함량 변화는 거의 없었다. 또 환원당의 변화는 배양 3일째 까지 증가하다가 4일째 부터 급격히 감소하여 배양 6일째 환원당의 함량은 0.03%로 거의 소비되었다. 3일째 까지 환원당의 증가는 배지중의 sucrose가 먼저 분해된 것으로 추정된다.

**항암 실험**

*Coriolus versicolor* 균사체 추출물의 항암 활성 검정은 김 등(12)이 보고한 plate assay의 model에 따라 plate의 colony수는 Hep-2 및 A-427 등의 cell lines은 plate(ml)당 3,000 cells, Calu-3은 plate(ml)당 5,000 cell 수준으로 하였다. 균사체 추출물의 농도는 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml로 처리하여 항암활성을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

균사체 추출물의 농도를 0.01 mg/ml로 처리하였을 때 3종류의 cell lines에 대해서 survival rate가 약



**Fig. 2. Changes in mycelial growth and reducing sugar contents.**

—●— mycelial weight, —■— reducing sugar, —▲— pH

**Table 3. Percent survival of human cancer cell lines against extract from mycelia**

| Cell line     | Cell type | Concentration of the extract from mycelia(mg/ml) |      |
|---------------|-----------|--|------|
|               |           | 0.1  | 0.01 |
| Hep-2(P-368)* | larynx    | 70.0   | 78.0 |
| A-427(P-89)   | lung      | 8.4**  | 82.4 |
| Calu-3-(P-64) | lung      | 9.8**  | 81.8 |

\*Number in parenthesis equals passage number of cell lines

\*\*Means sensitive, i.e., % survival ≤ 30%

80%의 수준으로 내성을 나타내었으나, 0.1 mg/ml의 농도로 처리하였을때 lung cell type인 A-427 및 Calu-3에 대해서 각각 8.4, 9.8% 수준의 survival rate를 나타내어 항암성을 확인할 수 있었다.

**화학적 분석**

균사체에서 추출한 단백다당체의 화학적 분석결과 polysaccharide 42.2%, protein 10.5%로 구성되어 있었다. 또 polysaccharide를 구성하고 있는 단당류는 GC로 분석한 결과 Fig.3과 같이 D-glucose, L-glucose, galatose, mannose, xylose등으로 구성되어 있다. 한편 이등(2)이 보고한 표고버섯 균사체에서 추출한 단백다당체의 조성은 polysaccharide 17%, protein 42%로 구성되었으며, 구성단당류는 xylose, fructose, mannose, galactose, glucose로 구성되었으며, 김 등(5)이 보고한 갯버섯에서 추출한 단백다당체는 polysaccharide 60%, protein 21%로 구성되어 있으며,

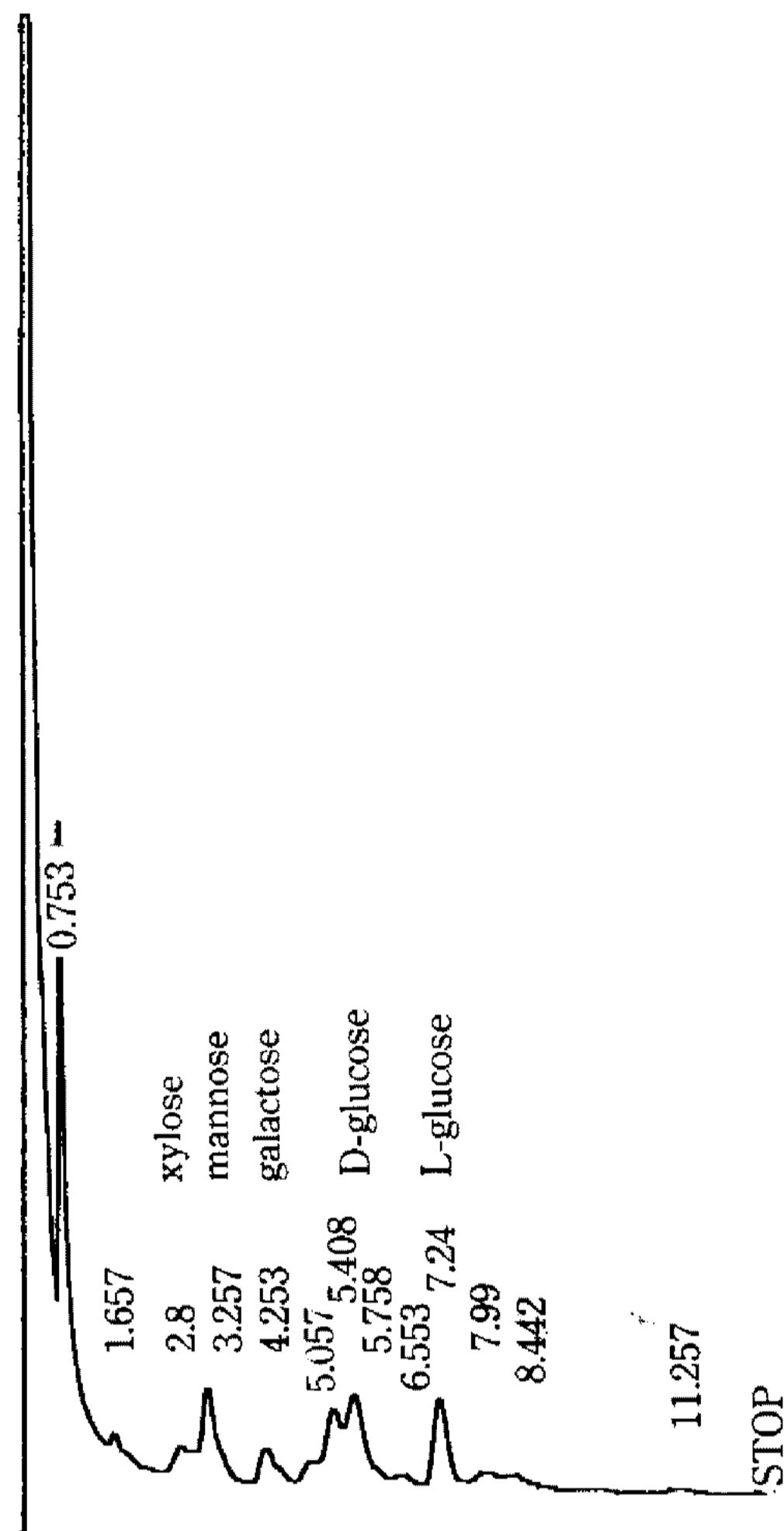


Fig. 3. GC pattern of monosaccharides of the extract from mycelia.

이들의 구성 단당류는 glucose, mannose, fucose 등으로 구성되었다. 따라서 항암성을 나타내는 단백질의 조성은 버섯의 종류에 따라 약간의 차이를 나타내었다.

## 요 약

*Coriolus versicolor* KFCC 30388 균을 액체배양하여 배양 6일째 균사체 생성이 가장 우수하였으며, 건조 균사체량은 17.2 g/l을 얻었다. 균사체로부터 항암성 단백당체를 분리하여 *in vitro*에서 plate assay 방법으로 human cancer cell lines 3종에 대한 항암성을 조사한 결과, 0.1 mg/ml의 농도로 처리하였을 때 lung cell type인 A-427 및 Calu-3에서 각각 8.4, 9.8%의 survival rate를 나타내어 항암성을 확인하였다. 화학적 분석 결과 단백당체는 polysaccharide 42.2%, protein 10.5%로 이루어졌으며, 구성 단당류는

D-glucose, L-glucose, galactose, mannose, xylose 등으로 되어 있었다.

## 참고문헌

1. Fuji, T., H. Maeda and N. Ishida. 1978. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiot.* **31**: 1079-1090.
2. Lee, J.W., C.H. Chung, H.J. Jeong and K.H. Lee. 1990. Anticomplementary and antitumor activities of the lkal, extract from the mycelia of *Lentinus edodes* IY-105. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 571-577.
3. Park, Y.D., Y.K. Hong, W.K. Whang, J.D. Huh and S. Park. 1989. Comparisons of protein-bound polysaccharide contents obtained from mycelia cultured broth and fruit body of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Appl. Mycol.* **17**: 223-228.
4. Some, Y., R. Okuda, N. Wade, E. Kishida and A. Misaki. 1989. Comparisons of protein-bound polysaccharide contents obtained from mycelia cultured broth and fruit body of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Appl. Mycol.* **17**: 223-228.
5. Kim, B.K., M.J. Shin, O.N. Kim, H.W. Kim and E.C. Choi. 1989. Antitumor components of the cultured mycelia of *Lepiota procera*. *Kor. J. Food Hygiene* **4**: 109-118.
6. Mizuno, T., K. Ohsawa, N. Hagiware and R. Kuboyama. 1986. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 1679-1688.
7. Kazun, C., M. Nishijima, H. Miura and I. Kamoi. 1990. Structural examination of water-soluble glycans from fruit body of *Lyophyllum ulmarium*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **37**: 765-772.
8. Usui, T., Y. Iwasaki and T. Mizuno. 1983. Isolation and characterization of antitumor  $\beta$ -D-glucans the fruit body of *Ganoderma applanatum*. *Carbohydr. Res.* **115**: 273-280.
9. Anne, P.W. 1986. Cytotoxicity and viability assays. In R. I. Freshney (ed.), *Animal Culture, A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, Washington, D.C.
10. Michael, C.A. and A.S. Dominic. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* **48**: 589-601.
11. Robert, H., M.K. Shoemaker and D. Wolpert. 1985. Application of a human tumor colony-forming assay to new drug screening. *Cancer Resea-*

- rch* **45**: 2145-2153.
12. Kim, C.H., M.S. Lee and Y.J. Baek. 1991. Plate assay for screening new antitumor agents. *J. Anim. Sci. Tech.* **16**: 33-37.
13. Michel, D., K. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colormetric method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
14. Park, K.S. and J.S. Lee. 1991. Optimization of media composition and culture conditions for the mycelial growth of *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **6**:91-98.

**(Received March 2, 1992)**