Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 24, No. 4, 459-464 (1996)

영지(*Ganoderma lucidum*)균사체의 액체배양에 의한 세포외 수용성 다당류의 분획 및 항암활성

이신영* · 강태수[1] · 문순옥[2] · 류인덕[3] · 이명열[3]
강원대학교 환경·생물공학부, [1]강원대학교 산업기술연구소, [2]수원대학교 유전공학과
[3]충주산업대학교 식품공학과, 연세대학교 생물산업소재연구센터

Fractionation and Antitumor Activity of the Water Soluble Exo-polysaccharide by Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum* Mycelium. **Shin-Young Lee*, Tae-Su Kang[1], Soon-Ok Moon[2], In-Deok Lew[3] and Myong-Yul Lee[3].** *Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea, [1]The Institute of Industrial Technology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea, [2]Department of Genetic Engineering, University of Suwon, Suwon 445-743, Korea, [3]Department of Food Engineering, Chungju National University, Chungju 380-702, Korea, Bioproducts Research Center of Yonsei University, Seoul 120-749, Korea* — Exo-polysaccharide (BWS) obtained from submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium was fractionated. Antitumor activity of their fractions was investigated in comparison with the mycelial polysaccharide fractions. Eight kinds (BWS-DN, BWS-DA, BWS-DN-GI, BWS-DA-GI, MWS-DN, MWS-DA, MWS-DN-GI and MWS-DA-GI) of polysaccharide fractions were obtained by DEAE-cellulose ion exchange chromatography and Sepharose CL-4B gel chromatography from BWS and MWS, which were isolated from culture fluid and mycelial cell, respectively. The anticomplementary activities ($ITCH_{50}$, %) of the exo-polysaccharide fractions showing 15% to 30% were lower than those of mycelial polysaccharide fractions showing 15% to 70%. The acidic fractions of BWS-DA and BWS-DA-GI fractionated from BWS, showed the highest activity of 30%. In the MTT assay, BWS-DN and MWS against mouse leukemia L1210 exhibited high inhibition ratio of 86 and 89%, respectively at the concentration of 600 μg/ml. High inhibition ratio of 50% (IC_{50}) was achieved for BWS, BWS-DA and MWS-DA fractions against human colon adenocarcinoma COLO-205 and for BWS-DA, BWS-DN and MWS-DN fractions against human leukemia HL-60 at the concentration of 300 μg/ml among the six polysaccharide fractions, respectively.

지금까지 영지를 비롯한 버섯유래의 다당류 및 이의 유도체들은 영지버섯의 자실체나 액체배양에 의한 균사체를 대상으로 하여 얻어졌으며, 이들은 독성이나 부작용이 거의 없는 항암 또는 면역증강제로서의 작용을 포함한 각종 생리기능을 나타내므로 최근 새로운 의약품이나 건강식품소재로서 주목받고 있다(1, 2).

한편, 이들 버섯의 다당류에 대한 성분, 구조 및 생물활성에 대해서도 이미 잘 알려져 있는데, 액체배양에 의한 균사체 유래의 다당류는 자실체 유래의 다당과 유사한 구조적 특성 및 생물활성을 갖는 것으로 밝혀졌다(3).

그동안 저자 등(4)은 새로운 생물산업소재의 탐색·개발연구의 일환으로 영지(*Ganoderma lucidum*) 균사체의 액체배양으로 다량의 세포외 다당을 얻었으며, 이의 배양조건 및 배지조성을 검토, 보고한 바 있는데, 지금까지 이들 영지 균사체의 액체배양에 의한 세포외 다당의 생산에 관한 연구는 거의 이루어진 바 없었다.

따라서 세포외 다당에 대한 분리·정제나 생물활성에 대해서는 자실체나 균사체 추출물에 대한 연구보고에 비해 많이 알려져 있지 않은데, 영지버섯의 경우 Sone 등(5) 및 Tseng 등(6)이 액체배양의 배양여액중에 균사체 유래 다당과 유사한 특성을 갖는 다당이 존재함을 보고하였고, 최근 한 등(7)도 영지균사체의 액체배양에 의하여 항보체활성이 우수한 균체외성 수용성 다당류에 대하여 보고한 바 있다.

본 연구에서는 영지 균사체의 액체배양을 통하여 얻은 세포외 다당을 분획하고, 이들 각 분획의 항암활성을 균사체 추출물의 다당분획과 비교하면서 조사하였다.

*Corresponding author.
Key words: *Ganoderma lucidum*, submerged cultivation, exo-polysaccharide, antitumor activity

재료 및 방법

균주 및 배양

본 연구에 사용한 균주는 *Ganoderma lucidum*(영지 1호)으로, P.D.A. 배지(8)에서 보존하였다. 10L 용량의 Jar-fermentor(Bioengineering, L1523, Swiss)를 이용하여 접종량 5%(v/v), pH 5.0, 온도 30℃, 교반속도 100 rpm 및 통기량 0.5 vvm으로 7일간 배양하였으며, 이때 배지는 glucose 5%, yeast extract 0.5%, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.1% 및 KH_2PO_4 0.05%(w/v)의 조성으로 제조하여 사용하였다(4).

다당의 분리

배양액을 2,500×g에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거하고 배양여액을 얻었다. 이 배양여액을 배제분자량이 100,000인 한외여과장치(Sartocon Mini SM 17521, Germany)에서 농축하여 얻은 농축액에 2배량의 acetone을 가하였고, 생성된 침전물을 투석 및 동결건조하여 세포외 조다당(EBP)으로 하였다. 세포외 조다당은 다시 실온의 증류수로 24시간 동안 교반 용해하여 상등액을 농축, 동결 건조하였으며, 이를 수용성의 세포외 다당(BWS)으로 하였다.

한편, 수용성의 균사체 다당(MWS)은 전보(4)와 동일한 방법으로 동결건조한 다음 얻어진 균사체 분말을 열수로 추출하였다.

다당의 분획

조다당은 Fig. 1에서와 같이 DEAE-cellulose 이온교환 및 겔 크로마토그라피하여 분획하였다. 이온교환 chromatography의 경우는 DEAE-cellulose를 4×35 cm의 column에 충진하고 48 ml/hr의 유속으로 용출하여 8 ml씩 분획하였다. 증류수로 용출하여 비흡착구로부터 중성분획을 얻었으며, 흡착구로부터는 NaCl(0 → 2M) 용액으로 농도구배용출하여 산성분획을 얻었다.

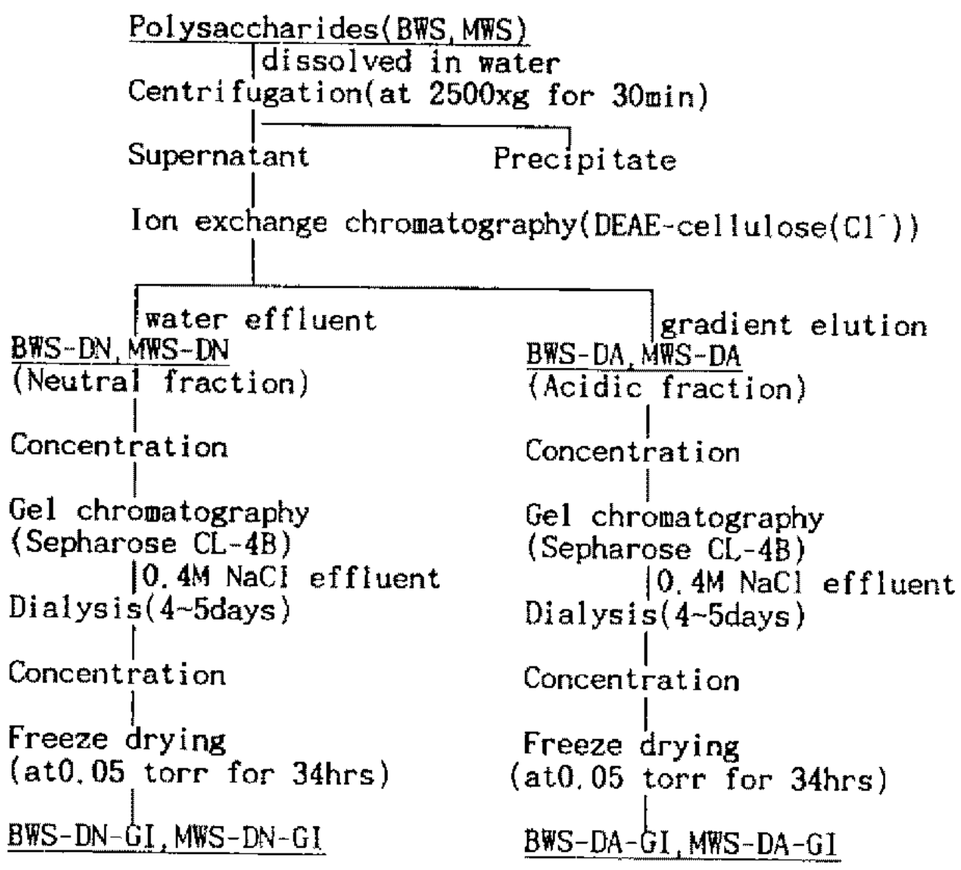

Fig. 1. Fractination of water soluble polysaccharides (BWS, MWS) from *Ganoderma lucidum*.
BWS; water soluble exo-polysaccharide from culture fluid
BWS-DN; neutral exo-polysaccharide fraction from BWS
BWS-DA; acidic exo-polysaccharide fraction from BWS
BWS-DN-GI; primary exo-polysaccharide fraction from BWS-DN
BWS-DA-GI; primary exo-polysaccharide fraction from MWS-DA
MWS; water soluble polysaccharide from mycelial cell
MWS-DN; neutral polysaccharide fraction from MWS
MWS-DA; acidic polysaccharide fraction from MWS
MWS-DN-GI; primary polysaccharide fraction from MWS-DN
MWS-DA-GI; primary polysaccharide fraction from MWS-DA

한편, 겔 크로마토그라피는 Sepharose CL-4B를 column(2.5×95 cm)에 충진하고, 0.4M의 NaCl 용액으로 평형화한 다음, 40 ml/hr의 유속으로 용출하여 4.0 ml씩 분획하였다. 이때 전당 및 단백질은 각각 phenol-sulfuric acid 법(9) 및 Lowry 법(10)을 이용하여 분석하였다.

이중확산법

이중확산법(double diffusion precipitation test)(11)은 1%(w/v)의 agarose(0.85% saline buffered with 0.1M sodium phosphate, pH 7.2)와 스텐레스 스틸 실린더(ID 0.65×L0.7 cm)를 이용하여 여러개의 well을 만들고, 여기에 여러농도(1~9 mg/0.15M NaCl)로 제조된 Concanavalin A 및 각 시료를 접종한 다음, 20~25℃에서 12~24시간동안 반응시키면서 침전 band의 유무 및 형태를 관찰하였다.

항보체 활성(anticomplementary activity)

Yamada 등(12)의 방법에 따라 다음과 같이 실험하였다.

100~1000 μg/ml 농도로 조제한 시료 30 μl와 guinea pig complement 30 μl(27.5 unit/ml) 및 GVB^{2+}(gelatin veronal buffered saline, pH 7.4) 30 μl를 시험관에 가하였다. 37℃에서 30분간 반응시킨 후, antisheep hemolysin으로 감작된 면양의 적혈구(SRBC, 1×10^9 cell/ml)를 100 μl씩 가하고 37℃에서 60분간 반응시켰다. 여기에 GVB^{2+} buffer 900 μl를 첨가하고 20 μl의 0.5M EDTA를 가하여 혼합한 다음, 400×g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액의 흡광도를 541 nm에서 측정하였으며, 항보체활성은 대조군의 total complement hemolytic activity에 대한 저해율($ITCH_{50}$, %)로서 계산하였다.

MTT assay

적정수(OD_{540} 0.6~0.7)의 암세포(mouse leukemia L 1210, human colon adenocarcinoma COLO-205 및 human promyelocytic leukemia HL-60)를 180 μl의 배지(RPMI 1640+PBS 10%)에 부유시켜 96 well plate에 접종하였다. 여기에 PBS(phosphate buffered saline)에 용해시킨 시료 20 μl씩을 시험군으로하여 각 well에 가하였으며, PBS 20 μl만을 첨가한 것은 대조군으로서 100%의 생존군(control survival)으로 하였다. 37℃로 유지한 5% CO_2-incubator에서 이들 암세포와 시료가 접종된 plate를 4일간 배양한 다음, 모든 well에 0.1 mg의 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5diphenyltetrazoliumbromide)를 가하고, 다시 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 배양종료후 plate를 100×g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거한 다음, 각 well에 DMSO (dimethylsulfoxide) 150 μl씩을 가한 후, formazan 결정이 녹을 때까지 약 10분간 가볍게 진탕하였다.

Scanning multiwell spectrophotometer(USA, Thermomax micro plate reader)로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 계산은 시험군에서 각 well의 OD_{540} 값으로부터 한 column의 평균 OD_{540} 값을 구하여 대조군의 평균 OD_{540} 값에 대한 백분율로 산출하였다(13).

결과 및 고찰

다당의 분획

세포외 다당(BWS) 및 균사체 유래 다당(MWS)을 이온교환 크로마토그라피한 결과는 각각 Fig. 2와 같다.

그림에서 보는 바와 같이 두 시료 모두 비흡착구 및 흡착구에서 각각 당의 양성 반응을 보였으며, 따라서 각 시료는 중성(BWS-DN, MWS-DN) 및 산성(BWS-DA, MWS-DA)의 두 분획으로 이루어져 있음을 알 수 있었다. 이때 흡착 획분들은 농축하여 CPC(cetyl pyridinium chloride)를 첨가한 결과 불용성의 착화합물이 형성되어 산성당 분획임을 확인할 수 있었다. 또 세포외 다당 분획들은 당성분만 검출된 반면, 균사체 다당의 경우는 당이외에도 단백질 성분이 동시에 검출되어 단백다당체(protein-bounded polysaccharide)일 가능성을 나타내었는데, 실제로 영지 균사체의 열수추출 다당은 단백다당으로 보고된 바 있다(14, 15).

한편, 이온교환 크로마토그라피하여 얻은 4가지의 다당시료 분획들(BWS-DN, BWS-DA, MWS-DN, MWS-DA)에 대하여 다시 겔 크로마토그라피한 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 세포외 다당의 중성(BWS-DN) 및 산성분획(BWS-DA)은 각각 2종의 당 분획(BWS-DN-GI, BWS-DN-GII 및 BWS-DA-GI, BWS-DA-GII)을 나타내어 분자량이 서로 다른 2종의 당혼합물로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 또, Fig. 4의 균사체 다당(MWS-DN 및 MWS-DA)의 경우에서도 세포외 다당과 유사한 양상의 결과(MWS-DN-GI, MWS-DN-GII 및 MWS- DA-GI, MWS-DA-GII)를 얻을 수 있었다.

이상의 결과로부터 세포외 다당(BWS) 및 균사체 다

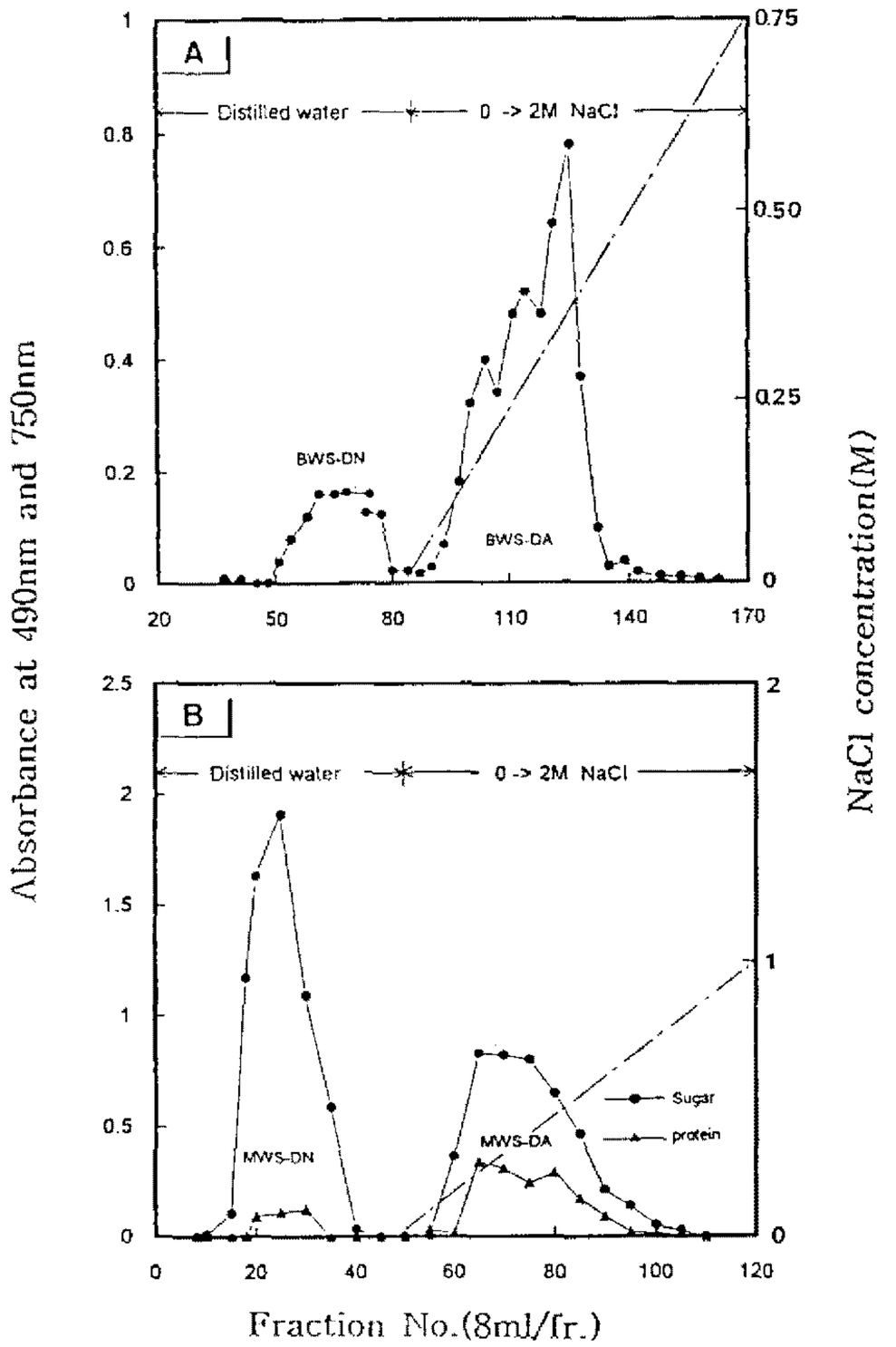

Fig. 2. Elution profiles of exo-polysaccharide (BWS, A) and mycelial polysaccharide (MWS, B) on DEAE-cellulose ion exchange chromatography.

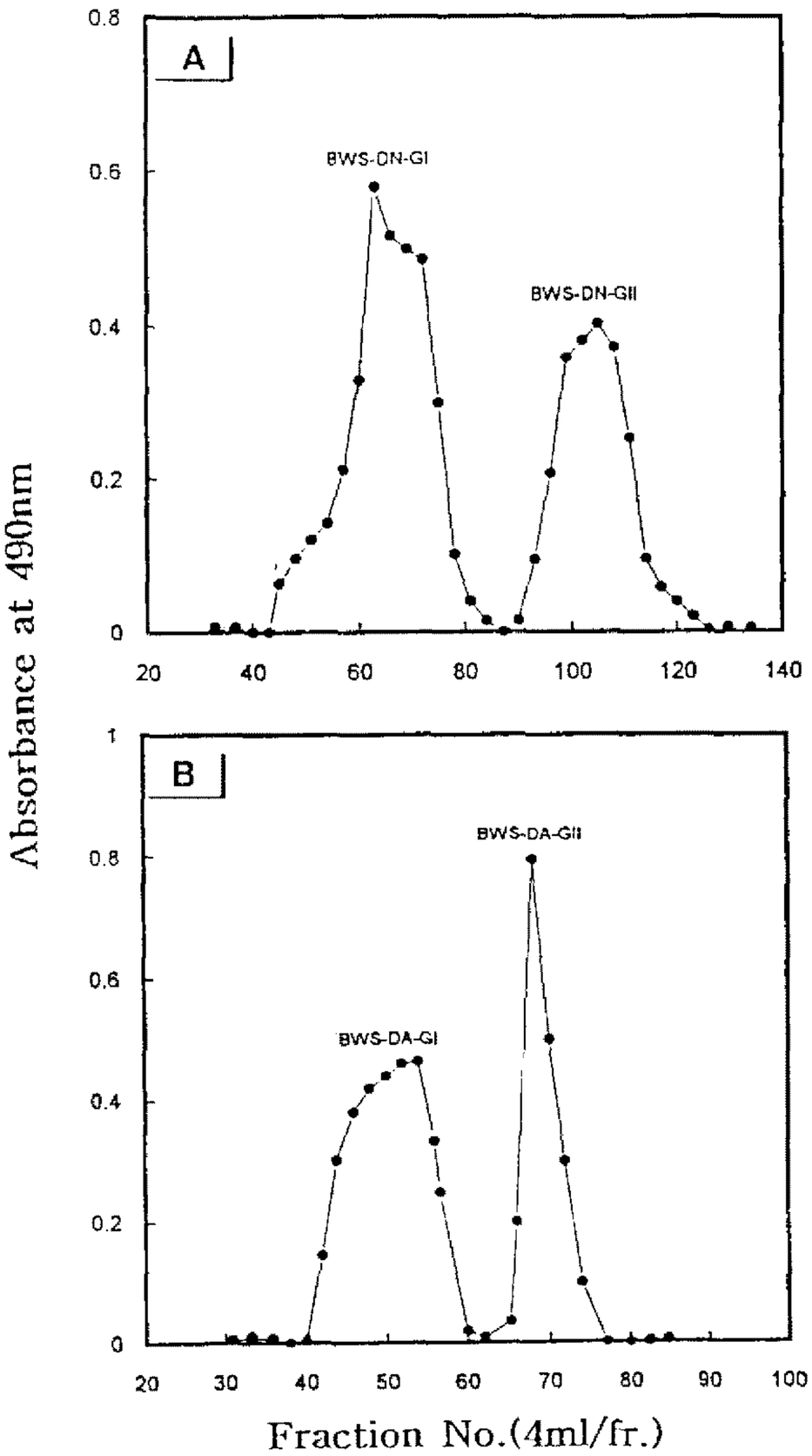

Fig. 3. Elution profiles of BWS-DN fraction (A) and BWS-DA fraction (B) on Sepharose CL-4B gel chromatography.

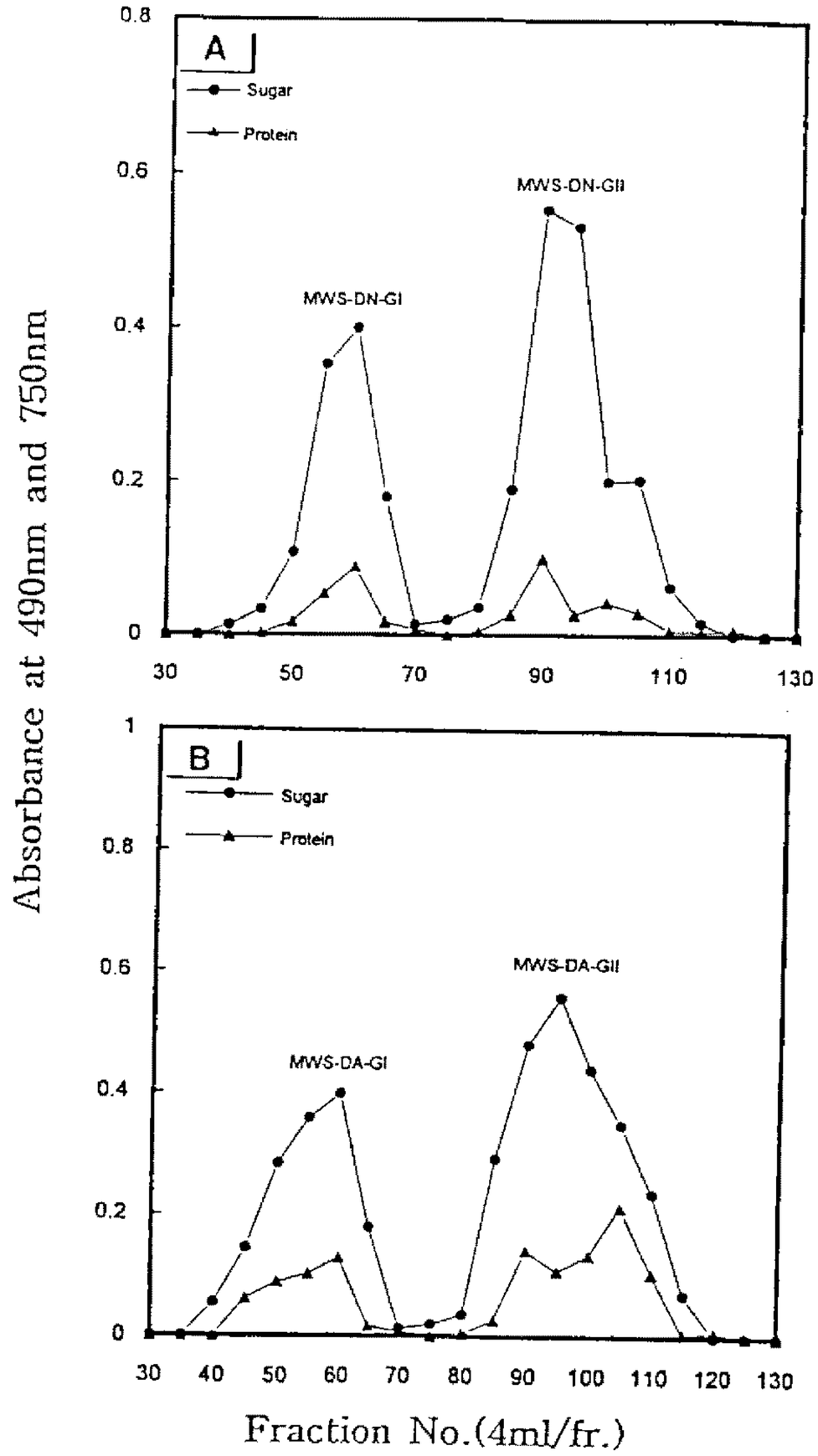

Fig. 4. Elution profiles of MWS-DN fraction (A) and MWS-DA fraction (B) on Sepharose CL-4B gel chromatography.

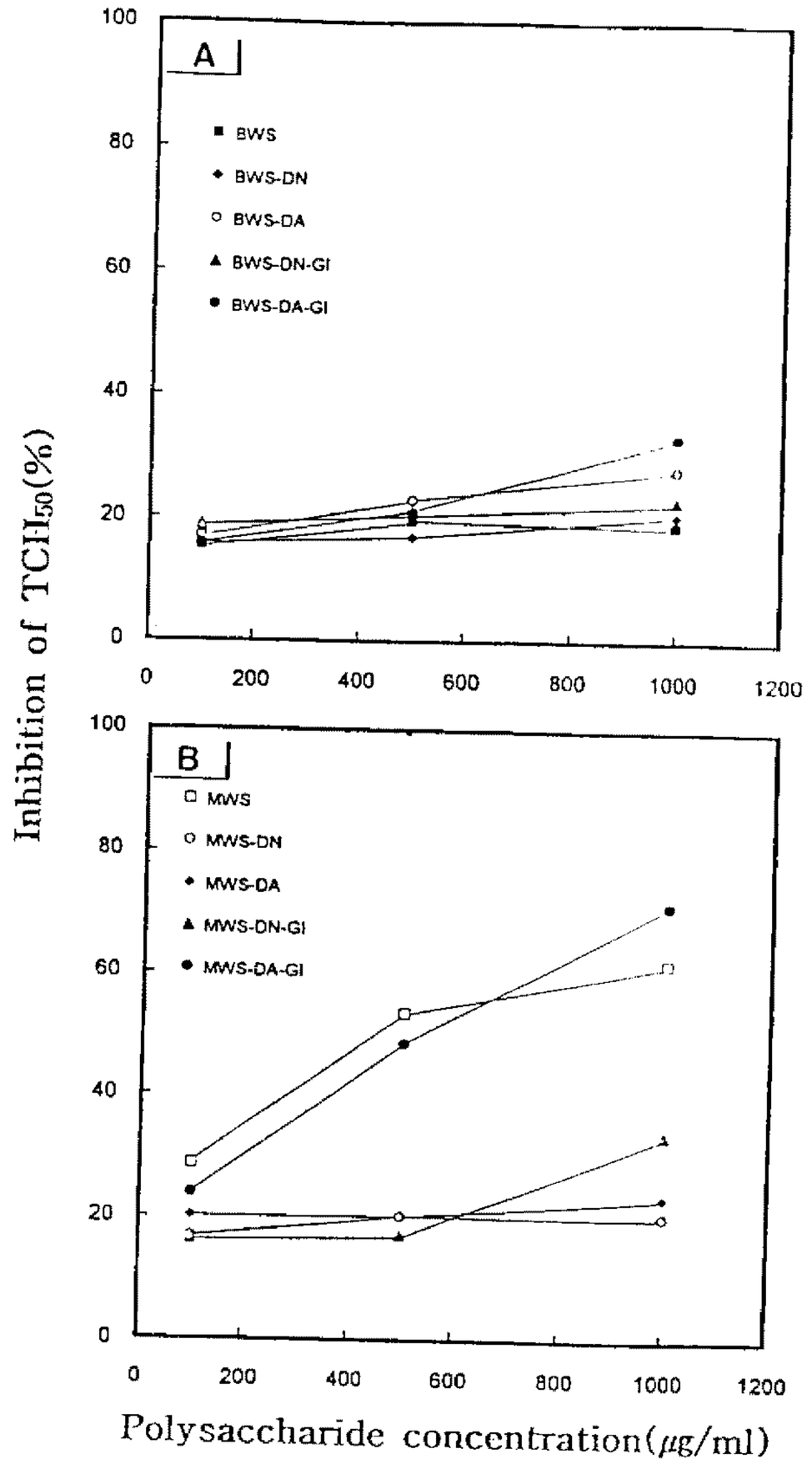

Fig. 6. Anticomplementary activity of exo-polysaccharide fractions (A) and mycelial polysaccharide fractions (B).

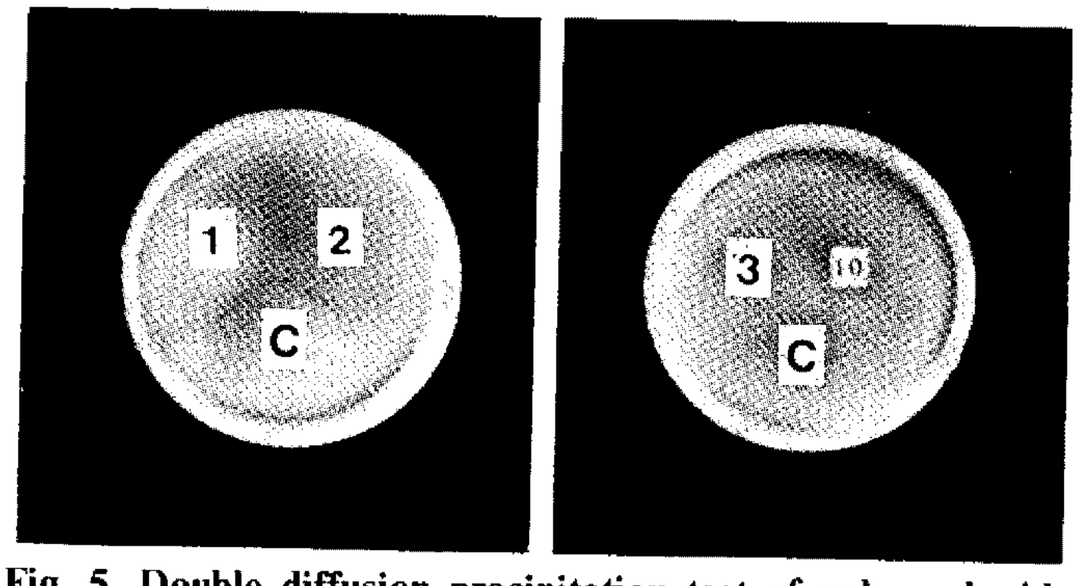

Fig. 5. Double diffusion precipitation test of polysaccharide fractions with Concanavalin A in agarose gel.
1; BWS-DN-GI, 2; MWS-DN-GI, 3; BWS-DA-GI, 4; MWS-DA-GI, C; Concanavalin A

당(MWS) 2종과 이들로부터 이온교환 및 겔 크로마토그라피하여 얻은 분획 8종(BWS-DN, BWS- DA, MWS-DN, MWS-DA, BWS-DN-GI, BWS-DA-GI, MWS-DN-GI 및 MWS-DA-GI)을 포함하여 총 10종의 다당 시료를 분획하였다.

한편, 이들 10종의 분획중 세포외 및 균사체 유래의 고분자 분획 4종에 대하여 이중확산법을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다.

그림에서 보는 바와 같이 겔 크로마토그라피하여 얻은 중성 분획분인 BWS-DN-GI 및 MWS-DN-GI는 sharp한 단일 band가 나타나 균질당으로 생각되었으나 산성분획분인 BWS-DA-GI와 MWS-DA-GI의 경우는 band가 전혀 형성되지 않았다.

다당분획의 항암활성

일반적으로 다당류에서는 항암 활성과 항보체 활성이 비례관계를 나타내므로 항보체 활성의 측정으로 항암활성을 예측할 수 있다(16, 17). 따라서 항암활성의 간접적인 탐색수단으로 BWS와 MWS 및 이들로부터 분

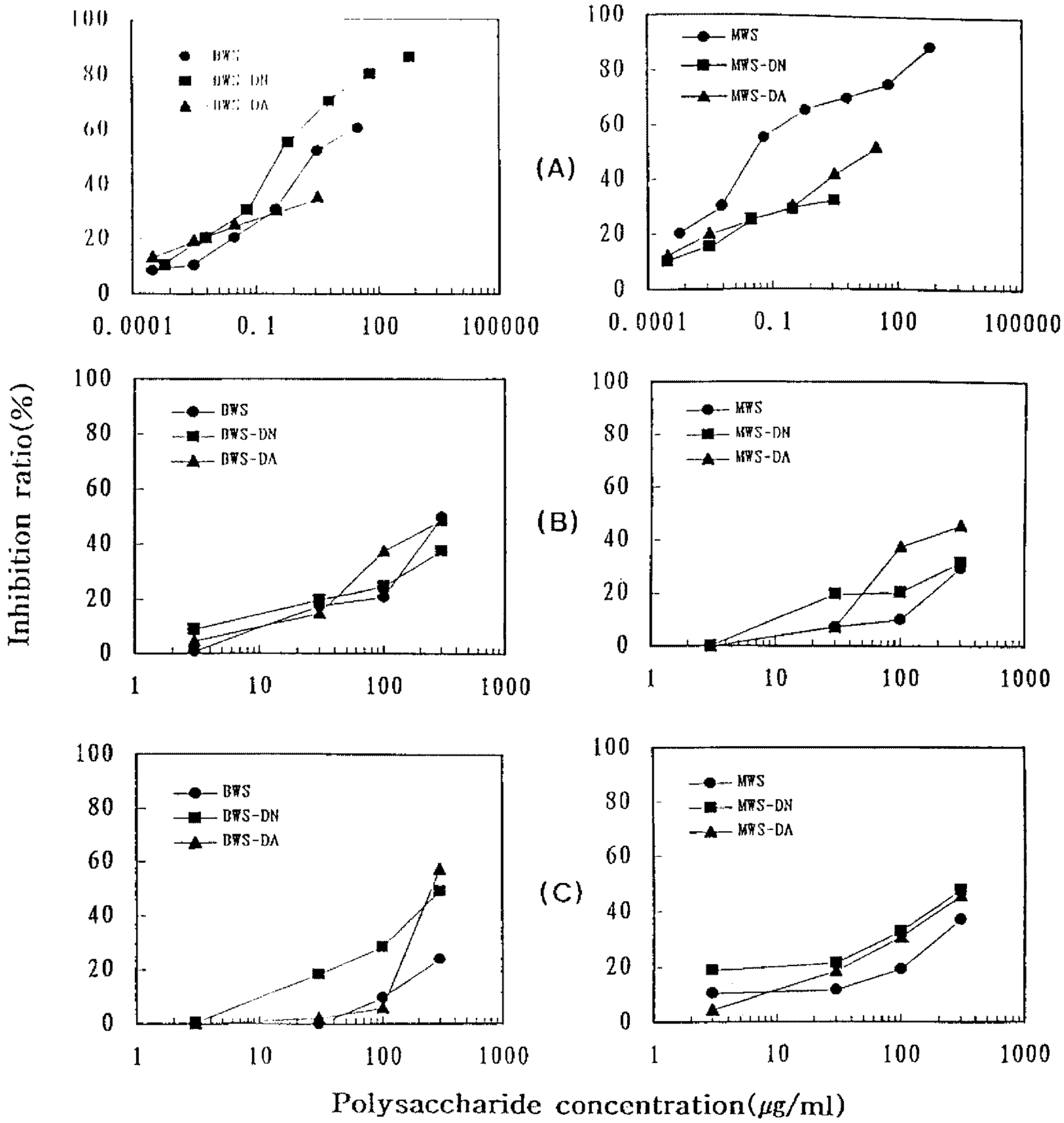

Fig. 7. MTT assay of exo-polysaccharide fractions (left) and mycelial polysaccharide fractions (right).
(A) mouse leukemia L1210, (B) human colon adenocarcinoma COLO-205, (C) human promyelocytic leukemia HL-60

획한 다당시료들에 대하여 항보체 활성을 실험한 결과는 Fig. 6과 같다.

그림에서 보는 바와 같이 세포외 다당분획들의 항보체 활성은 15~30%로 영지자실체로부터 열수 추출하여 얻은 조다당 분획들의 항보체 활성($ITCH_{50}$, %)으로 보고된 3.4~31.5%의 값 범위이었는데(18), 이들 분획중 산성분획인 BWS-DA와 BWS-DA-GI는 1000 μg/ml의 시료 농도에서 가장 높은 약 30%의 항보체 활성을 나타내어 세포외 다당 분획들중에서 산성유래의 분획들이 우수함을 알 수 있었다. 반면, 균사체 유래 다당 분획들의 항보체 활성은 15~70% 범위로 세포외 다당 분획들에 비해 높았으며, 특히 MWS 및 MWS-DA-GI는 1000 μg/ml의 농도에서 약 60~70%로 가장 높은 활성을 나타내었다.

한편, 암세포에 대한 억제 또는 사멸능을 알아보기 위하여 BWS 및 MWS 유래의 각 다당시료에 1종의 mouse leukemia L1210 및 2종의 human cell line (COLO-205 및 HL-60)을 사용하여 MTT 시험한 결과는 Fig. 7과 같다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 mouse leukemia L1210에 대한 저해능을 보면 다당시료들의 농도가 서로 달라 상대적인 비교는 곤란하나 세포외 다당의 경우는 중성 분획인 BWS-DN이 600 μg/ml의 시료농도에서 약 86%의 가장 높은 저해율을 나타내었다. 또, 세포외 다당인 BWS와 이의 산성 분획인 BWS-DA는 각각 30 및 3 μg/ml의 시료농도에서 60 및 35% 정도의 저해율을 보였다. 반면, 균사체 유래의 다당 분획들의 경우는 MWS가 600 μg/ml의 시료농도에서 약 89%의 가장 높은 저해율을 나타내었고, 산성분획인 MWS-DA는 30 μg/ml에서 약 52%, 중성 분획인 MWS-DN은 3 μg/ml의 시료농도에서 32% 정도의 저해율을 나타내었다.

또, 2종의 human cell line인 COLO-205 및 HL-60에

대한 저해능을 살펴보면 그림에서 보는 바와 같이 세포외 다당 분획 시료들은 균사체 유래의 다당 시료들보다 비교적 높은 저해능을 나타내었다. COLO-205에 대해서는 세포외 다당 분획들중에서 BWS와 BWS-DA가, 그리고 균사체 유래의 다당 분획들 중에서는 MWS-DA가 각각 300 μg/m*l*의 시료농도에서 IC_{50}에 가까운 저해능을 보였다. 또, HL-60에 대해서는 세포외 다당 분획들중에서 BWS-DA와 BWS-DN가, 균사체 유래의 다당 분획들중에서는 MWS-DN이 각각 300 μg/m*l*의 시료농도에서 약 50%(IC_{50})의 가장 높은 저해능을 나타내었다.

요 약

영지 균사체의 액체배양에 의하여 생산된 세포외 다당 시료를 분획하였고, 이들 각 분획에 대한 항암활성을 균사체 유래 다당 분획들과 비교하면서 조사하였다.

배양여액으로부터 세포외 수용성 다당(BWS)을 얻었고, 이를 순차적으로 이온교환 및 겔 크로마토그라피하여 BWS를 포함한 세포외 수용성 다당 분획, 총 5종을 얻었으며, 균사체 유래의 수용성 다당(MWS)에서도 세포외 다당과 동일한 방법으로 분획하여 총 5종의 분획을 얻어 대조구로 시용하였다. 세포외 다당 시료들의 항보체 활성($ITCH_{50}$, %)은 15~30% 정도로 15~70%인 균사체 유래 다당 분획들의 값보다는 낮았으나, 이들 세포외 다당 분획들중, BWS-DA와 BWS-DA-GI는 1000 μg/m*l*의 시료 농도에서 30% 정도의 매우 높은 활성을 나타내었다. MTT assay에서는 mouse leukemia L1210에 대하여 BWS-DN 및 MWS가 600 μg/m*l*의 농도에서 각각 86 및 89%의 높은 저해율을 나타내었으며, BWS-DA 및 MWS-DN의 경우는 3 μg/m*l*의 매우 낮은 농도에서도 32~35%의 저해율을 보였다. 또, human cell line인 COLO-205에 대해서는 BWS와 BWS-DA 및 MWS-DA가, 그리고 HL-60에 대해서는 BWS-DA와 BWS-DN 및 MWS-DN이 각각 300 μg/m*l*의 시료 농도에서 약 50%(IC_{50})의 높은 저해능을 나타내었다.

감사의 말

본 논문은 연세대학교 생물산업소재 연구센터의 연구비 지원(94-K3-1005-02-04-2)에 의거 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

1. Eyal, J. 1991. Mushroom mycelium grown in submerged culture-potential food applications. Pp. 31-42. *In* I. Goldberg and R. Williams (ed.), *Biotechnology and Food Ingredients*, Van Nostrand Reinhold, New York.
2. Jong, S.C. and J.M. Birmingham. 1992. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Advances in Applied Microbiology* **37**: 101-134.
3. Mizuno, T., M. Kato, A. Totsuka, K. Takenaka, K. Shinkai, and M. Shimizu. 1984. Fractionation, structural features and antitumor activity of water-soluble polysaccharide from "Reishi", the fruit body of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **58**: 873-879.
4. 이신영, 강태수. 1996. 영지(*Ganoderma lucidum*) 균사체의 액체배양에 의한 세포외 생물고분자의 생산과 특성. 한국산업미물학회지 **24**: 111-118.
5. Sone, Y., R. Okuda, A. Wada, A. Kishida, and A. Misaki. 1985. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agricultural Biological Chemistry* **49**: 2642-2650.
6. Tseng, T.C. 1984. Studies on *Ganoderma lucidum* 1. liquid culture and chemical composition of mycelium. *Bot. Bull. Acad. Sin (Taipei)*. **25**: 149.
7. 한만덕, 정훈, 이준우, 백성진, 김수웅, 윤경하. 1995. 영지 IY009 균사체의 분획에 따라 추출된 ganoderan의 조성과 생리적 활성. 한국균학회지 **23**: 285-297.
8. Hunter-Cevera, J.C., M.E. Fonda, and A. Belt. 1986. Isolation of Cultures. Pp. 4-21. *In* Demain, A.L. and N.A. Solomon (ed.), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Chaplin, M.F. 1986. Monosaccharides. Pp. 1-13. *In* M.F. Chaplin and J.F. Kennedy (ed.), *Carbohydrate Analysis*. IRL Press, Oxford.
10. Bollag, D.M. and S.J. Edelstein. 1991. *Protein Methods*. Pp. 56-57. Wiley Liss, Inc., New York.
11. Hudson, L. and F.C. Hay. 1989. *Practical Immmnology*. Pp. 233-236. 3th ed., Blackwell Scientific Pub., Oxford.
12. Yamada, H., H. Kiyohara, J.C. Cyong, Y. Kojima, Y. Kumazawa, and Y. Otsuka. 1984. Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. *Planta Medica*. **48**: 163-167.
13. Alley, M.C., D.A. Scudiero, A. Monks, M.C. Hursey, M.J. Czerwinsky, D.L. Fine, B.J. Abbott, J.G. Mayo, R.H. Shoemaker, and M.R. Boyd. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**: 589-601.
14. Kim, K., H.Y. Cho, J.S. Kim, H.W. Kim, and E.C. Choi. 1993. Studies on constituents of higher fungi of Korea (LXVIII). *Kor. J. Pharmacogn.* **24**: 203-212.
15. 이권행, 정훈, 김영일, 김빙각. 1991. 산업폐자원을 이용한 발효에 의한 항고혈압 성분의 생산. 한국균학회지 **19**: 79-84.
16. Okuda, T., Y. Yoshioka, T. Ikekawa, G. Chihara, and K. Nishioka. 1972. Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature*. **238**: 59-60.
17. 오광근, 전영중. 1990. 항암활성을 가지는 다당류. 생물화공 **4**: 11-21.
18. 정훈, 이준우, 이권행. 1990. 한국산 고등균류의 항보체 활성 효과에 관한 연구. 한국균학회지 **18**: 145-148.

(Received 20 March 1996)