

韓國產 高等 菌類의 成分 및 培養에 관한 研究(第55報)

*Lyophyllum decastes*의 抗癌 成分 및 培養

李 廷 玉 · 金 亨 洙 · 崔 應 七 · 金 炳 珏

서울대학교 藥學大學

Studies on Constituents of the Higher Fungi of Korea (LV)

The Antitumor Components and Culture of *Lyophyllum decastes*

Chong Ock Lee, Hyung Soo Kim, Eung Chil Choi and Byong Kak Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract—To find antitumor components of *Lyophyllum decastes*, the mycelia of *L. decastes* were cultured in artificial media and a new antitumor component which showed potent antitumor activity against sarcoma 180 implanted in mice, was isolated and named "Lyophyllan A". Lyophyllan A was composed of a polysaccharide moiety (86%) and a protein moiety (2%). The polysaccharide moiety was found to be a heteroglycan which consisted of glucose (48.1%), mannose (30.8%), galactose, xylose and fucose. The protein moiety contained 18 amino acids. Cultural characteristics of *L. decastes* were investigated by shake culture method. The best result was obtained when *L. decastes* was cultured in medium glucose 50 g, peptone 10 g, corn steep liquor 30 ml, KH_2PO_4 0.87 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCl_2 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 mg and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mg per one liter at 26°C, 180 rpm, for 9 days.

Keywords—*Lyophyllum decastes* · antitumor component · Lyophyllan A · mycelial culture

담자균류의 항암성분에 대한 연구는 Roland 등이 *Calvatia gigantea*로 부터 Calvacin을 분리함으로써 시작되어¹⁾, Gregory 등에 의해 광범위한 연구가 이루어졌다²⁾. 그 후 *Lentinus edodes*의 자실체로 부터 강력한 종양 억제 효과가 있는 순수한 다당체인 Lentinan이 분리되었으며^{3,4)}, 그 배양균사로부터 항암성 단백질 다당체인 KS-2가 분리되었고, KS-2가 인티페론 유발작용이 있음이 보고된 바 있다⁵⁾. 또한 *Schizophyllum commune*으로부터 Shizophyllan,⁶⁾ *Coriolus versicolor*로 부터 항암성 단백질다당체 PS-K⁷⁾가 분리되었다.

한편 한국산 담자균류의 항암성분에 대한 연

구는 최근에 이르러 구름버섯, 표고, 느타리 등의 자실체의 고분자 추출물이 강력한 종양 억제 작용이 있음을 보고함으로써 시작되어⁸⁾, 갯버섯아재비 및 메꽃버섯⁹⁾, 덕다리버섯¹⁰⁾, 뽕나무버섯¹¹⁾, 애기줄각버섯의 배양균사¹²⁾, *Lyophyllum decastes*¹³⁾ 등의 항 종양 성분이 보고된 바 있다.

이에 저자는 *Lyophyllum decastes*의 항 종양 성분을 액내배양에 의해 대량 생산하기 위한 체계적인 연구에 착수하게 되었으며, 배양균사로부터 강력한 항 종양 작용이 있는 새로운 단백질 다당체 Lyophyllan A를 분리하였기에 보고하는 바이다.

얻어진 균괴를 microblender로 15초간 분쇄한 후 No. 3 배지 100 ml를 가한 500 ml 삼각 flask에 20% (v/v)씩 접종하고 1차 예비 배양과 동일한 조건으로 배양 菌絲가 flask 내에서 성숙할 때까지 7~10일간 진탕배양하였다.

(C) 本 培養

2차 예비 배양을 하여 얻은 菌絲 배양물을 다시 15초간 분쇄하여 종균으로 사용하였다. Table I에 표시된 각 배지를 사용한 각 실험군마다 3~5 개의 flask를 사용하였으며 500 ml 삼각 flask에 100 ml의 培地를 가하여 별도 인접이 없는 한 10% (v/v)씩의 종균을 접종하였다. 培養 溫度는 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 하였으며 orbital shaking incubator(회전변경 1 inch, Gallenkamp)를 사용하여 180 rev/min으로 9일간 진탕배양 하였다.

(D) 培養 菌絲 收穫

미리 칭량한 여과지상에 흡인 여과하여 菌絲를 수확하고 증류수로 2회 세척한 후 90°C oven에서 24시간 건조시킨 후 desiccator 내에서 냉각하였다. 培養 100 ml당의 건조균사량(mycelial dry weight=MDW)을 mg단위로 測定하였다.

4) 培養條件 實驗

(A) 정치 배양과 진탕 배양

정치 배양과 진탕 배양의 가능성을 알아보기 위해 培地 No. 3을 사용하여 접종 후 각각 정치 또는 진탕 배양후 정치 배양군과 진탕 배양군의 菌絲成長量을 비교하였다.

(B) 수도물과 증류수와의 비교

培地 조제에 있어서 수도물의 사용 可能性을 밝히기 위해 培地 No. 3을 각각 증류수와 수도물로 조제하고 菌絲 成長量을 비교하였다.

(C) pH의 영향

菌絲 成長에 적합한 배지의 pH 범위를 정하기 위해 pH 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0의 培地 No. 3에서 菌絲 成長量을 비교하였다.

(D) 종균의 접종량에 의한 영향

No. 3 培地에 종균의 접종량을 5, 10, 20%로 달리하여 菌사 성장량을 비교하였다.

(E) 成長曲線

적절한 수확 시기를 결정하기 위하여 No. 3에서 배양하여 3, 5, 7, 9, 11, 13일에 각각 菌사 성장량을 비교하였다.

(F) 탄소원의 비교

培地중의 탄소원으로 starch를 사용하여 (No. 42) 菌사 성장량을 비교하였다.

(G) 포도당 농도의 영향

培地의 포도당 농도를 1, 3, 5, 7, 9, 10%로 각각 조제한 배지(No. 1~No. 6)에서의 菌사 성장량을 비교하였다.

(H) 질소원의 비교

菌絲 成長에 유리한 질소원을 찾기위해 yeast extract, peptone, corn steep liquor, malt extract 등의 질소원을 각각 단독으로 또는 함량을 변경하여 조제한 배지(No. 3 및 No. 7~No. 19)에서 菌사 성장량을 비교하였다.

(I) carbon/nitrogen ratio (C/N ratio)의 영향

菌사 성장에 적합한 C/N ratio를 밝히기 위해 탄소원으로 glucose, 질소원으로 peptone을 사용하고 총 농도는 7%로 고정하되 이들의 비율만 달리한 배지 (No. 8 및 No. 20~No. 28)에서 菌사 성장량을 비교하였다.

(J) 培地 농도가 菌絲 成長에 미치는 영향

원만한 菌사 성장을 이룰 수 있는 최고 농도를 찾기 위해 탄소원으로는 glucose를 질소원으로는 yeast extract와 peptone을 각각 5:1:1하되 그 절대량만을 변화시켜 총 농도 3.0%부터 20%에 이르는 배지계열(No. 3 및 No. 29~No. 41)을 만들어 菌사 성장량을 비교하고, 또 배지 성분의 菌사 전환율(conversion ratio=CR)을 아래식에 따라 계산하여 비교하였다.

$$\text{CR}(\%) = \frac{\text{배지 100 ml로부터 얻은 건조 菌사량(g)}}{\text{배지 100 ml중의 성분량(g)}} \times 100$$

Lyophyllum decastes 배양물의 蛋白多糖類의 抽出, 分離 및 精製

1) *Lyophyllum decastes*의 培養

(A) 種균배양

전술한 方法대로 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 1차 예비 배양과 2차 예비 배양을 한후 均質化하여 本 培養에 종균으로 사용하였다.

(B) 本 培養

本 實驗室에서 가장 용이하게 사용 가능하며 배양 菌사의 수득율도 높은 배지를 pH 5.0으로 조정하여 사용하였다. 배지 No. 3 500 ml씩을 가

한 2 l 삼각 flask에 10% (v/v)의 종균을 접종하고 26±1°C에서 배양 균사가 flask내에서 충분히 성숙할 때까지 7~10일간 진탕 배양을 시행하였다.

2) 蛋白質多糖類의 抽出 및 分離

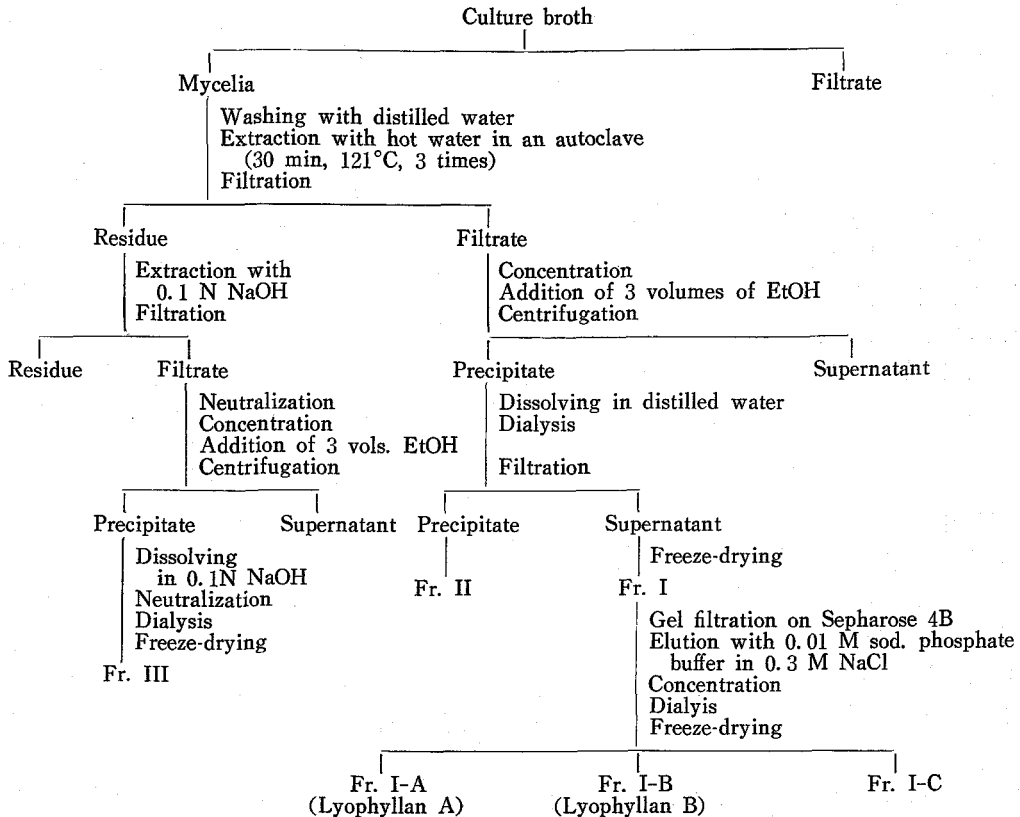
상기 배양물 (46 l)을 흡인 여과하여 배양 여액과 菌絲를 分離한 후 균사를 증류수로 3회 세척하여 사용하였다. 배양 균사를 증류수와 함께 microblender로 5분간 均質化하고 121°C 2기압에서 30분 동안 3회 반복 추출하였다. 감압 여과하여 추출액을 分離하고 감압 농축한 후 3배량의 95% ethanol을 가하고 4°C에서 24시간 방치하여 침전을 완결시켰다. 완결된 침전은 10,000×g에서 30분 동안 원심분리하여 증류수에 용해시킨 후 visking tube에 넣어 4°C에서 증류수로 7일간 투석 하였다. 투석후 원심분리하여 상정액과 불용성 침전으로 분리하여 상정액은 농축하여 냉동건조하여 담갈색 건조 분말(이후 Fr.

I이라 칭함)을 분리하였다. 불용성 침전 분획도 냉동 건조하여 담갈색 건조 분말(이후 Fr. II라 칭함)을 분리하였다.

한편 열탕 抽出 잔유물은 증류수로 2회 세척한 후 0.1 N NaOH로 121°C 2기압에서 30분간 3회 抽出하였다. 추출액을 감압 여과 후 중화시키고 농축한 다음 3배량의 95% ethanol을 가하고 4°C에 24시간 방치하여 침전을 완결시켰다. 10,000×g에서 30분 동안 원심 분리하여 침전물을 얻어 0.1 N NaOH에 용해시켰다. 중화시킨 후 visking tube에 넣어 4°C에서 증류수로 7일간 투석하였다. 투석 후 원심분리하여 불용성 침전을 제거하고, 상정액은 감압 농축 후 냉동 건조시켜 담갈색 건조분말(이후 Fr. III라 칭함)을 분리하였다(Scheme I 및 Fig. 10).

3) 蛋白質多糖類의 精製

상기에서 分離한 Fr. I을 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.2)에 용해시킨 후 Sep-



Scheme I. Extraction, separation and purification of the protein-polysaccharide fractions from the cultured mycelia of *Lyophyllum decastes* (See Fig. 10).

harose 4B (Pharmacia Co.)가 충전된 column (2.4×80 cm)에 적용시켰다. 0.01 M sodium phosphate buffer (0.3 M NaCl 포함, pH 7.2)로 15 ml/hr의 속도로 용출시켰으며, 20분 간격으로 분획을 모아 각 분획 0.1 ml을 증류수로 10배 희석한 후 anthrone 시약과 반응시켜 625 nm에서의 흡광도를測定하여 다당체를 확인하였다.

그중 anthrone 반응 양상을 나타낸 peak에 속한 용출 분획 35 ml부터 165 ml까지 130 ml를 Fr. I-A로(이후 Lyophyllan A라 칭함), 165 ml부터 370 ml까지 205 ml를 Fr. I-B로(이후 Lyophyllan B라 칭함), 그리고 635 ml부터 890 ml까지 155 ml를 Fr. I-C로 하고 이들을 각각 visking tube에 넣어 4°C에서 증류수로 7일간 투석하고 냉동건조하여 각각 건조 분말로 획득하였다(Scheme I 및 Fig. 10).

蛋白質類의 抗癌 實驗

1) 실험동물

서울대학교 동물사육장에서 구입한 ICR마우스(♂, 20~25 g)를 사용하였다.

2) 腫瘍 細胞 移植

ICR 마우스의 腹腔내에서 7일간 培養된 sarcoma 180 세포를 복수와 함께 취하여 생리 식염수로 세척하여 sarcoma 180 세포만을 分離하였다. 생리 식염수로 1×10^7 cells/ml가 되도록 부유액을 만들고, 이 부유액 0.1 ml (1×10^6 cells/mouse)씩을 건전한 정상 ICR 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다.

3) 약물투여

腫瘍 細胞를 이식하고 3일 후부터 약물 투여를 시작하되 매일 1회씩 10일간 연속하여 腹腔내에 주사하였다. 대조군에는 생리 식염수를, 처치군에는 생리 식염수에 용해시킨 시료 Fr. II 20 mg/kg, Lyophyllan A 20 mg/kg 및 40 mg/kg, Lyophyllan B 20 mg/kg, Fr. I-C 20 mg/kg, Fr. III 20 mg/kg씩을 각각 주사하되 주사약물은 0.1ml로 하였다. 모든 주사약물은 121°C 15분간 고압증기 멸균하였다. 각 실험군은 10마리의 동물을 사용하였다.

4) 結果의 판정

腫瘍 細胞를 이식한지 30일째 되는 날 실험동물을 처사시키고 유발된 고형암을 적출한 후

그 重量을 測定하여 평균 腫瘍 重量을 얻고 이로부터 다음 식에 따라 종양 저지 백분율(percent inhibition ratio=I.R., %)을 계산하였다.

$$I.R., \% = \frac{CW - TW}{CW} \times 100$$

단, CW; 대조군의 평균 종양 중량

TW; 처치군의 평균 종양 중량

抗癌 成分의 化學分析

1) 多糖體 含量 測定

다당체 함량은 Herbert 등¹⁴⁾의 방법에 의거하였으며 anthrone 시약과 반응하여 발색된 色度를 625 nm에서 UV spectrophotometer로 측정하였다. 포도당을 표준으로 하여 작성한 검량 곡선을 사용하여 시료중의 다당류 함량을 계산하였다.

2) 單糖類의 分析

다당체를 구성하고 있는 단당류의 분석은 Mitruka¹⁵⁾의 방법에 준하였으며 시료 20 mg을 3% (v/v) HCl-MeOH와 함께 teflon sealed cap tube에 넣고 질소로 충전, 80±5°C에서 20시간 동안 methanolysis를 시켰다. 여과하여 감압 농축한 후 소량의 absolute methanol을 가하고 다시 감압 건조시켰다. 1 ml의 pyridine에 녹인 다음 0.2 ml의 hexamethyldisilazane과 0.1 ml trimethylchlorosilane을 가하고 30초 동안 맹렬히 진탕한 뒤 30분간 방치하고 GLC를 실시하였다.

각 표준품 10 mg씩과 이들 5 mg씩의 혼합물에 대해서도 동일한 조작을 거쳐 GLC를 시행하고 glucose peak에 대한 relative retention time을 계산하고 이를 기준으로 동정을 하였으며 정량은 peak의 면적을 계산하여 시행하였다.

3) 蛋白質 含量 測定

蛋白質 함량은 Lowry등¹⁶⁾의 방법에 준하여 시행하였다. bovine serum albumin (Sigma Co., U.S.A.)을 표준으로 하여 작성한 검량 곡선을 사용하여 시료중의 단백질 함량을 계산하였다.

4) 아미노산 分析

蛋白質을 구성하는 아미노산을 分析하기 위해 시료 20 mg을 5 ml의 6N-HCl과 함께 teflon sealed cap tube에 넣고 질소로 충전한 다음 밀봉하여 110±5°C에서 24시간 가수분해시켰다. 얻어진 가수분해물을 여과하여 감압 농축 건조시킨 후

여기에 0.02 N HCl 2 ml를 가하여 용해시키고, 0.5 ml씩을 아미노산 자동 분석기(Hitachi KLA-89)에 주입하여 분석하였다. 얻어진 chromatogram을 표준 아미노산 chromatogram과 비교하여 peak height method에 의해 정량하였다.

5) 抗癌 成分의 IR 分析

시료 1 mg을 KBr disc법으로 IR spectrum을 얻었다. 이것을 Fig. 11에 표시하였다.

實驗 結果

培養條件 實驗

1) 정지 배양과 진탕 배양

정지 배양 결과 MDW는 200 mg이었으며 진탕 배양의 경우는 1040 mg이었다(Fig. 1).

2) 수도물과 증류수의 비교

수도물을 사용한 경우 MDW는 1,000 mg이었고 증류수의 경우는 1,040 mg이었으므로 이들 상호간에는 차이가 없었다(Fig. 1).

3) pH의 영향

pH 4.0~7.0의 범위에 있어서는 MDW가 1,200 mg 이상의 양호한 菌絲 成長을 보였다. 특히 pH 5.0에서 1,640 mg의 우수한 菌絲 成長

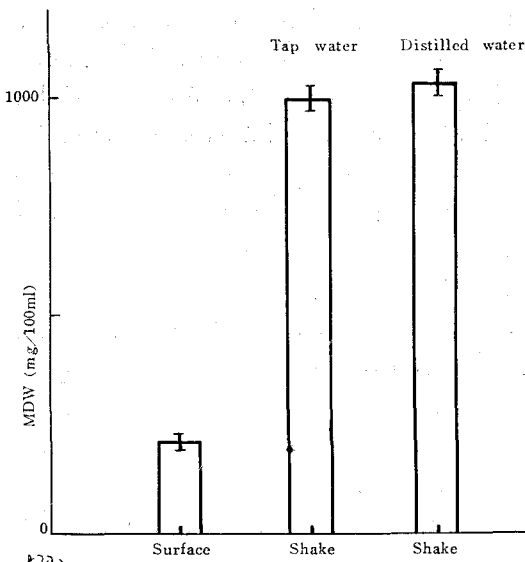


Fig. 1. Comparisons of shake culture with surface culture and distilled water with tap water for biomass production of *Lyophyllum decastes* in medium No. 3.

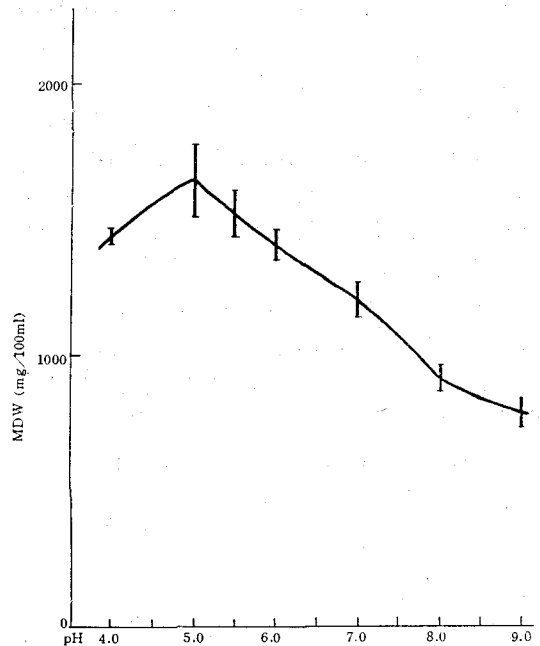


Fig. 2. Effects of pH on biomass production of *Lyophyllum decastes*.

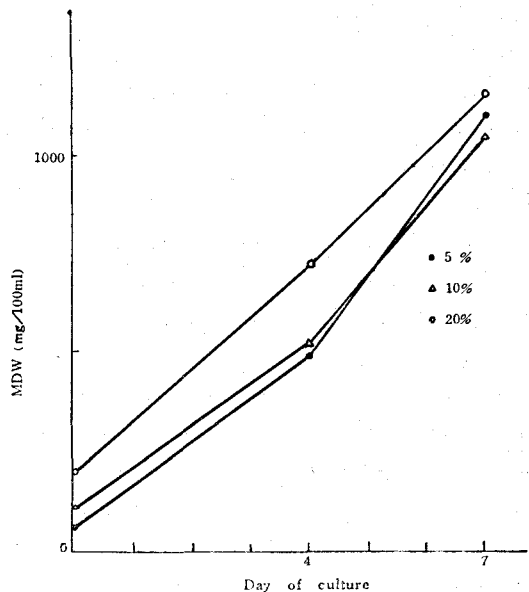


Fig. 3. Effects of inoculum size on biomass production of *Lyophyllum decastes* cultured in medium No. 3.

을 나타냈다(Fig. 2).

4) 종균의 접종량에 의한 비교

종균의 접종량을 증가시켰을 때 培養 제 4일에서의 MDW는 증가되었으나 제 7일에는 접종량에 관계없이 거의 유사한 菌絲 成長을 보였다(Fig. 3).

5) 成長 曲線

培養 7일까지는 菌絲의 지속적인 成長이 이루어졌으며 9일 부터는 菌絲 成長이 완만하였다(Fig. 4).

6) 탄소원의 비교

탄소원으로 starch를 사용하였을 때 菌絲 成長은 현저히 감소되어 680 mg이었다(Fig. 5).

7) 포도당 농도의 비교

포도당 농도가 1~9%까지는 菌絲 成長이 유사하였으나, 포도당 농도가 10%로 높은 경우에 오히려 菌絲 成長이 감소하였다. 5%의 포도당 농도에서 가장 우수한 菌絲 成長을 보였다(Fig. 6).

8) 질소원의 비교

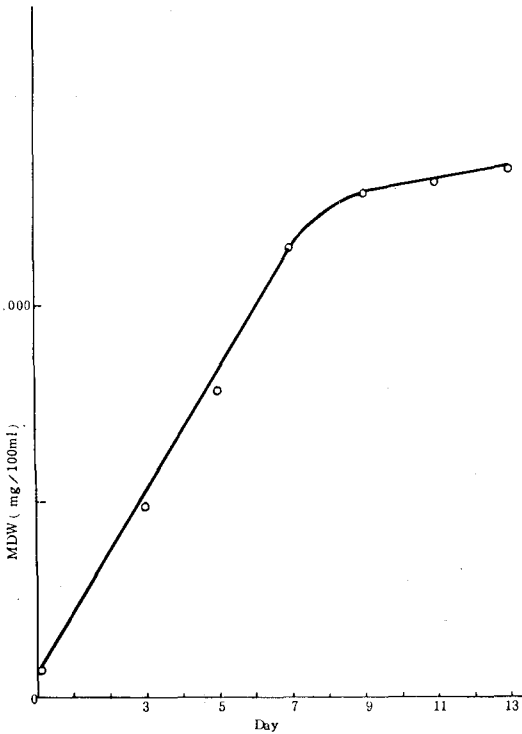


Fig. 4. Growth curve of *Lyophyllum decastes* in medium No. 3.

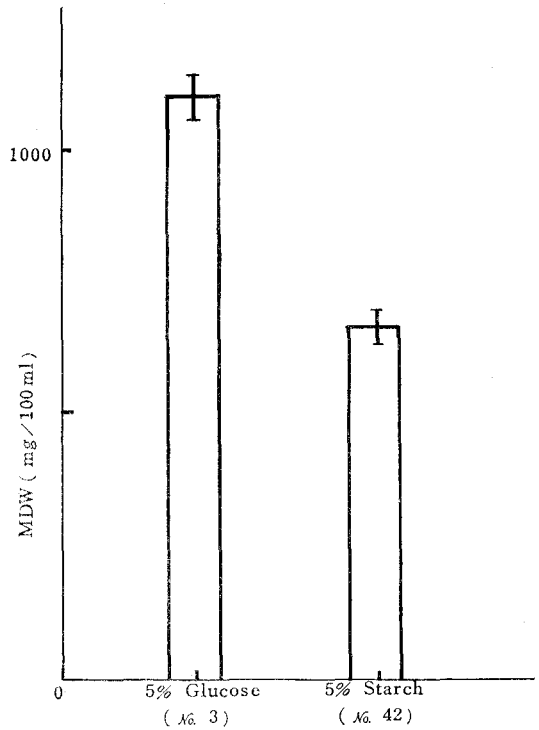


Fig. 5. Biomass production of *Lyophyllum decastes* cultured in glucose or starch.

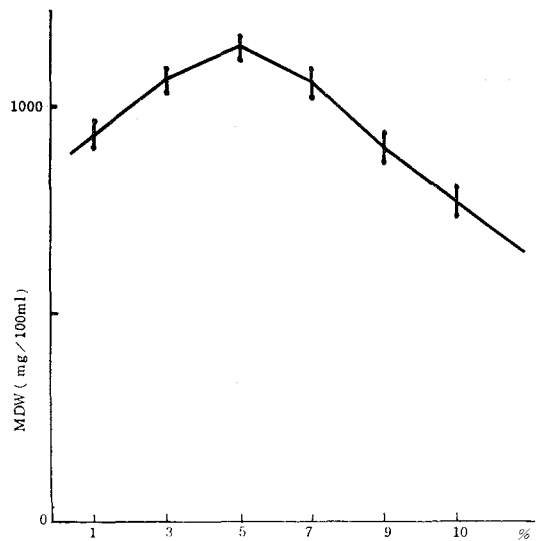


Fig. 6. Effects of glucose concentration on biomass production of *Lyophyllum decastes*.

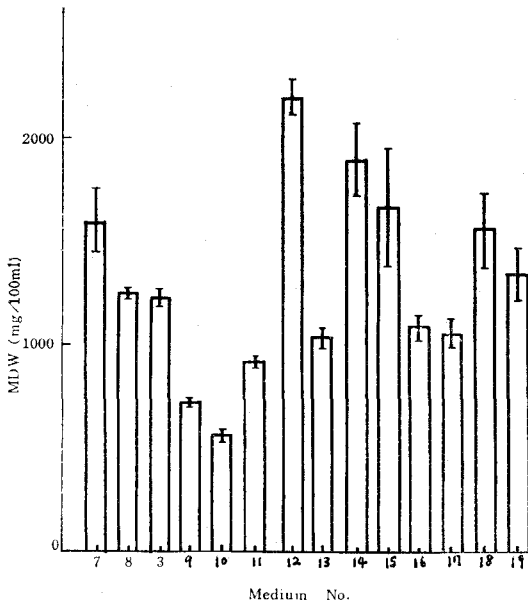


Fig. 7. Effects of nitrogen sources on biomass production of *Lyophyllum decastes*.

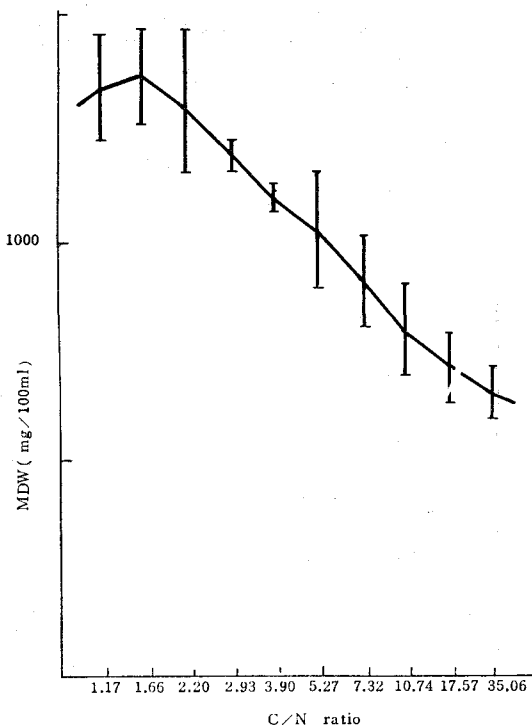


Fig. 8. Effects of C/N ratio on biomass production of *Lyophyllum decastes*.

4종의 질소원을 단독으로 사용하였을 경우에는 yeast extract가 菌絲 성장을 가장 촉진시켰으며, corn steep liquor와 malt extract는 질소원으로서 불량하였다. 그러나 corn steep liquor를 yeast extract 또는 peptone과 혼합하여 사용한 경우에는 높은 菌絲 成長을 보였다. 질소원으로 corn steep liquor 30 ml와 peptone 10 g을 혼합 사용했을 때 菌絲 성장이 가장 우수하였다(Fig. 7).

9) Carbon/nitrogen ratio 영향

C/N 비율이 1.17~7.32일 경우에 菌絲 성장이 우수했고 1.17~2.20에서 특히 우수하였으며 C/N비율이 10.74 이상으로 높은 경우에는 菌絲 성장이 불량하였다(Fig. 8).

10) 培地 농도의 영향

5% 이상의 배지 농도에서 菌絲성장은 유사했으나, 배지 농도에 따라 균사 전환율(conversion ratio)은 점점 감소하였다(Fig. 9).

培養 菌絲로부터 蛋白多糖類의 分離 및 精製 *Lyophyllum decastes*의 배양물 46 l로 부터 얻은 균사체로 부터 精製전의 蛋白多糖類 8.4 g (180 mg/l)을 얻어 Sepharose 4B column으로 gel filtration한 결과 anthrone 반응에 양성인 주 peak가 3개 관찰되었다. 첫번째 peak부터 Fr.

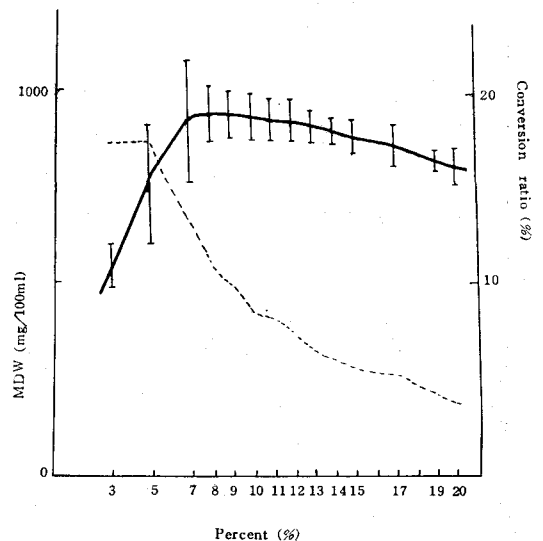


Fig. 9. Growth of *Lyophyllum decastes* in different concentration media and the conversion ratio of medium components into mycelia (The dotted line is the conversion ratio).

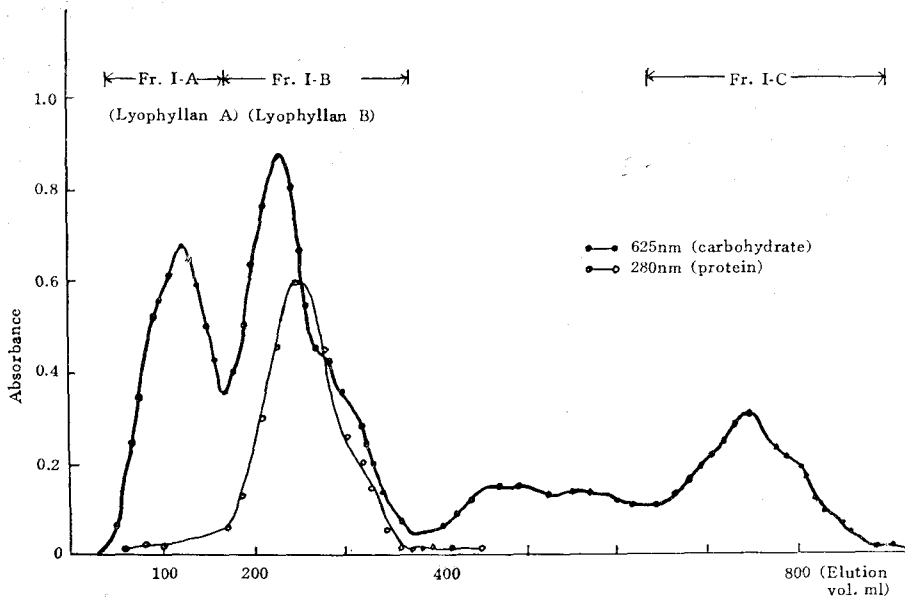


Fig. 10. Separation of protein-polysaccharide from *Lyophyllum decastes* on Sepharose 4B.

I-A(Lyophyllan A라 칭함), Fr. I-B(Lyophyllan B라 칭함), Fr. I-C라 하였다(Fig. 10). 그 수득량은 각각 0.95 g, 1.07 g, 0.12 g 이었다. Fr. II는 1.6 g(34.8 mg/l)이었으며, Fr. III는 13 l의 배양물의 菌絲體로 부터 전술한 과정에 따라 分離하였을 때 1.66 g(128 mg/l)을 획득하였다.

抗癌 實驗

*Lyophyllum decastes*의 배양 균사로 부터 分離

한 각 분획에 대하여 항암 실험을 한 결과 Lyophyllan A가 가장 강력한 sarcoma 180 성장 저지 작용이 있었으며 특히 40 mg/kg/day의 용량에는 89.1%의 종양 저지율을 보였다. 이때 실험동물 10마리중 2마리는 종양의 완전회화(complete regression)가 관찰되었다.

Lyophyllan B, Fr. III도 각각 56.4%, 47.5%의 유의성 있는 종양 억제력이 인정되었으나 Fr. II와 Fr. I-C는 억제력이 인정되지 않았다

Table II. Antitumor activities of various fractions of the metabolites of *Lyophyllum decastes*

Sample	Dose(mg/kg/day, i.p.)	Tumor weight (g, mean±SE)	Inhibition ratio (%)	Complete regression	Significance ^{a)} (p)
Control	Saline	3.72±0.52	—	0 ^{b)} /10 ^{c)}	—
Fr. II	20	2.81±0.65	24.5	0/10	N.S. ^{d)}
Control	Saline	5.51±0.86	—	0/10	—
Lyophyllan A	20	1.51±0.48	72.6	1/9	0.001
	40	0.60±0.15	89.1	2/10	0.001
Lyophyllan B	20	2.40±0.45	56.4	0/10	0.001
Fr. I-C	20	4.06±0.88	26.3	0/10	N.S.
Fr. III	20	2.89±0.82	47.5	0/10	0.05

a) The significance was evaluated according to student's t-test. p<0.05 was taken as the criterion of significant difference.

b) The number of mice in which the tumor was completely regressed.

c) The number of mice used.

d) Statistically not significant.

(Table II).

化學分析

종양 억제력이 입증된 Lyophyllan A, Lyophyllan B, Fr. III에 대하여 총 다당체 함량과 총 단백질 함량을 測定한 結果를 Table III에 표시하였다. 이들은 단백다당류로 판단되며, 그 중 Lyophyllan A는 86% 다당체와 2% 단백질로 구성된 protein-polysaccharide로 판명되었다.

Lyophyllan A의 다당체를 구성하는 당당류를 分析한 結果 glucose 48.1% 및 mannose 30.8%를 비롯하여 fucose, xylose, galactose 등으로 구성되어 있었다(Table IV).

Lyophyllan A의 단백질을 구성하는 아미노산을 분석한 結果 lysine, aspartic acid, glutamic

Table III. Total polysaccharide and protein contents of the antitumor fractions of *Lyophyllum decastes*.

Total contents	Polysaccharide(%)	Protein(%)
Lyophyllan A	86	2
Lyophyllan B	58	32
Fr. III	46	28

Table IV. Monosaccharide contents in the polysaccharide moiety of Lyophyllan A.

Monosaccharide	Relative ratio (%)
Glucose	48.1
Fucose	7.1
Xylose	11.3
Mannose	30.8
Galactose	2.7

Table V. Contents of the total amino acids in the protein moiety of Lyophyllan A.

Amino acid	%	Amino acid	%
Trp	+	Gly	6.3
Lys	14.9	Ala	7.7
His	5.8	Cys	+
Arg	6.0	Val	5.6
Asp	10.4	Met	2.5
Thr	6.2	Ile	3.5
Ser	6.3	Leu	7.7
Glu	11.7	Tyr	2.5
Pro	+	Phe	2.8

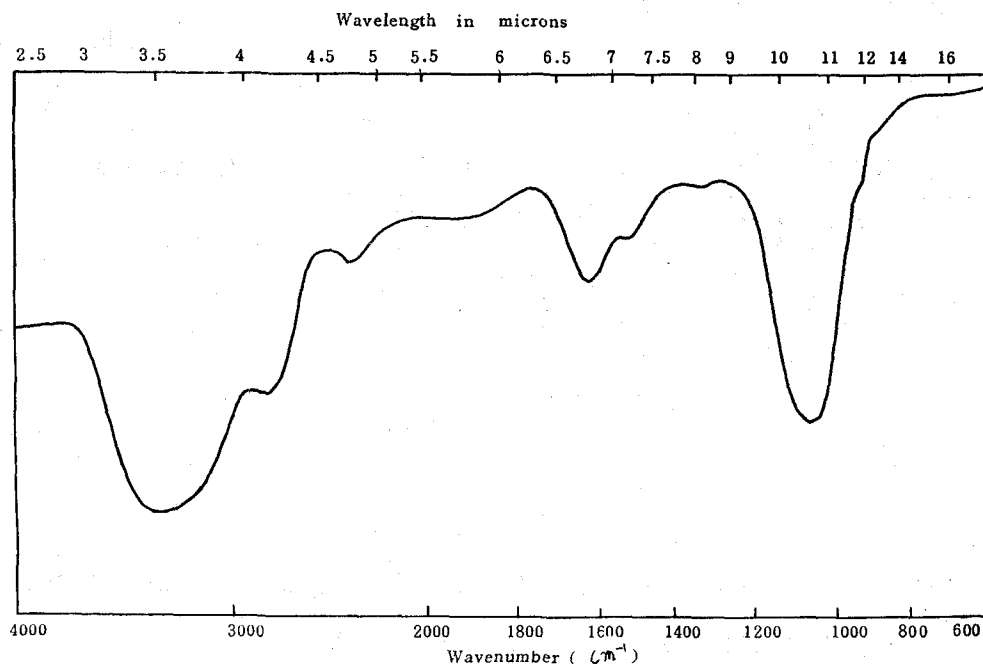


Fig. 11. IR spectrum of Lyophyllan A.

acid 등 18종의 아미노산으로 구성되어 있었다 (Table V).

Lyophyllan A의 IR spectrum (Fig. 11)을 보면 다당체에서 일반적인 $3,300\sim 3,400\text{ cm}^{-1}$ 부근의 O-H 신축진동, $2,900\text{ cm}^{-1}$ 부근의 C-H 신축진동, $1,630\text{ cm}^{-1}$ 부근의 C=O 신축진동, 그리고 $1,000\sim 1,100\text{ cm}^{-1}$ 부근에서의 C-H, C-O의 변각진동 등을 관찰할 수 있었다.

考 察

*Lyophyllum decastes*의 培養 조건으로서는 호기성 조건하에서 菌絲 성장이 탁월하였으며, 培地 조제시 증류수 대신 수도물을 사용할 수 있었으며, pH 4.0~7.0의 넓은 범위에서 菌絲 성장이 우수하며, 질소원으로서는 발효공업용 corn steep liquor를 혼합 사용하여도 菌絲 성장이 양호하였으므로 이러한 點들은 大量 培養시 장점이 될 수 있다.

포도당의 농도가 5%일 때 菌絲 수득율이 가장 높았으며, 그 이상의 농도에서는 감소하였고, C/N ratio가 1.17~2.20의 낮은 범위에서 菌絲 성장이 양호하였다. 질소원에 따라서 건조 균사량의 수득율에 큰 차이가 있는 점 (Fig. 7)으로 보아 이 菌株의 액내 배양시 균사 성장에는 질소원이 중요한 것으로 사료된다.

중균의 접종량에 따른 균사 성장은 5%, 15%, 20%의 접종으로 7일 배양시에 건조 균사량이 거의 일정한 것으로 보아 5% 정도의 소량의 접종으로도 원활한 菌絲 성장이 가능하였다.

저자들이 이 菌株의 배양 균사로 부터 분리하여 精製한 Lyophyllan A는 精製하지 않은 단백질 당류보다 더 우수한 89.1%의 중양 저지율을 나타내었다. Lyophyllan A의 다당체 함량은 86%, 단백질 함량은 2%로서 합계는 88%이었다. 여기서 다당체 함량 측정법은 Hebert 등¹⁴⁾의 방법을 이용하였으며, 다당체가 酸 중에서 형성하는 furfural 유도체와 anthrone이 반응하여 나타나는 발색도를 625 nm에서 측정하여 glucose를 대조군으로 한 검량선으로 부터 산출하는 방법으로 glucose의 발색도를 100으로 할 때 mannose는 55, galactose는 66에 해당하기 때문에 Lyo-

phyllan A의 다당체의 함량 측정치는 실제 함량보다 낮게 나타난 것으로 사료된다. Lyophyllan A의 다당체는 GLC 분석 결과 glucose는 48.1%이고 30.8%의 mannose를 비롯하여 galactose 등 모두 5종으로 구성된 結合 方式 미정의 heteroglycan으로 사료된다. 또한 Lyophyllan A의 단백질 부분에 존재하는 tryptophan이 glucose의 발색도를 감소시켜 다당체의 함량 測定値를 낮추었을 수도 있다.

Lyophyllan A의 단백질 부분은 lysine, aspartic acid, glutamic acid를 포함하여 18종의 아미노산으로 구성되어 있었다. Lyophyllan A는 당과 당 그리고 단백질과 당 등이 복잡하게 결합된 중합체이므로 그 분자량이 일정치 않아서 그 構造 결정은 이 연구와 별도로 시행되어야 한다고 사료된다. 이러한 중합체로 유사한 예로는 구름버섯 *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel.에서 분리하여 현재 의약품으로 사용되고 있는 PS-K (Krestin)로서 β -1, 4:1, 3 또는 β -1, 4:1, 6 glucans와 18~38%의 protein으로 구성된 분자량이 약 100,000이상인 단백질당류로만 밝혀져 있다.^{7,17)}

또한 Lyophyllan A의 단백질 부분은 여러단계의 정제과정을 통해서도 제거되지 않았으며, PS-K의 경우에 당과 단백질이 공유결합으로 결합되어 있음이 밝혀졌으므로¹⁸⁾ Lyophyllan A도 당과 단백질이 공유결합으로 결합된 것으로 사료된다.

Lyophyllan A의 중양 억제 효과는 20 mg/kg 및 40 mg/kg의 용량에서 각각 72.6% 및 89.1%의 높은 저지율을 나타내었을 뿐만 아니라 각각 9마리중 1마리 및 10마리중 2마리에서 중양의 완전 퇴화를 관찰할 수 있었으므로 더욱의 미가 있다고 사료된다.

結 論

Lyophyllum decastes 균주의 액내배양시 균사 성장의 최적 조건을 검토한 바, 균사 성장 최적 pH는 5.0이었으며, 균사성장은 진탕 배양시 우수하였고, 탄소원으로서는 glucose, 질소원으로서는 peptone과 corn steep liquor를 혼합사용시

우수하였다. 또한 배지중의 포도당 농도는 5%, C/N비율은 1.17~2.20에서 균사성장이 우수하였으며, 5% 이상의 배지 농도에서는 균사성장은 유사하였다.

*Lyophyllum decastes*의 菌絲를 액내 배양하여 sarcoma 180에 대하여 강력한 종양 억제 작용을 나타내는 새로운 단백질체를 균사로 부터 分離하였고 이를 精製하여 Lyophyllan A라고 명명하였다.

Lyophyllan A를 化學的으로 分析한 結果 86%의 다당체와 2%의 단백질로 이루어진 고분자 물질임을 알았으며, 그 다당체는 glucose를 주로 하는 5종의 단당으로 구성된 heteroglycan이며, 그 단백질은 lysine을 위시한 18종의 아미노산으로 형성되어 있음을 밝혔다.

謝辭—이 研究에 소요되는 경비는 서울大學校 藥學大學 附設 綜合藥學研究所의 연구비로 충당되었으며 이에 감사하는 바이다.

(1985년 11월 21일 접수 : 12월 2일 수리)

文 獻

1. Roland, J.F., Chmielewicz, Z.F., Weiner, B.A., Gross, A.M., Boening, O.P., Luck, J.V., Bardos, T.J., Reilly, H.C., Sugiura, K., Stock, C.C., Lucas, E.H., Byerrum, R.U. and Steven, J.A.: *Science* 23, 1897 (1960).
2. Gregory, F.J., Healy, E.M., Agerborg, H.P.K., Jr. and Warren, G.H.: *Mycologia* 58, 80 (1966).
3. Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuoda, F.: *Nature* 222, 687 (1969).
4. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. and Fukuoda, F.: *Cancer Res.* 30, 2776(1970).
5. Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F. and Ishida, N.: *J. Antibiotics* 31, 1079 (1978).
6. Komatsu, N., Okubo, S., Kukimoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sasaki, S.: *Gann* 60, 137 (1969).
7. Tsukagoshi, S., Ohashi, F.: *Gann* 65, 557 (1974).
8. Kim, B.K., Park, E.K. and Shim, M.J.: *Arch. Pharm. Res.* 2, 145 (1979).
9. Min, H.K., Choi, E.C. and Kim, B.K.: *Kor. J. Mycol.* 8, 13 (1980).
10. Kang, C.Y., Lee, C.O., Chung, K.S., Choi, E.C. and Kim, B.K.: *Arch. Pharm. Res.* 5, 39 (1982).
11. Kim, J.S., Choi, E.C., Kim, H.R., Lee, C.K., Lee, C.O., Chung, K.S., Shim, M.J. and Kim, B.K.: *Kor. J. Mycol.* 11, 151 (1983).
12. Kim, Y.J., Lee, C.O., Shim, M.J., Kim, S.W., Choi, E.C. and Kim, B.K.: *Kor. J. Mycol.* 12, 35 (1984).
13. Kim, H.R., Shim, M.J., Kim, J.W., Kim, H.W., Lee, C.O., Choi, E.C. and Kim, B.K.: *Kor. J. Pharmacogn.* 15, 61 (1984).
14. Herbert, D., Phipps, P.J. and Strange, R.E.: *Method in Microbiology*, 5B, p.265 (1971).
15. Mitruka, B.M.: *Gas Chromatographic Applications in Microbiology and Medicine*, John Wiley & Sons. N.Y., p.156 (1975).
16. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
17. Hirase, S.: *J. Pharm.* 96, 419 (1976).
18. Wagner, H.: *Proceedings of the Fifth Asian Symposium on Medicinal Plants and Spices*, p.33 (1984).