

韓國產 高等 菌類의 成分 研究(第 57報)

구름버섯 항암성분의 비교

曹熙斑·沈美慈*·崔應七·金炳珏

서울대학교 藥學大學 微生物藥品化學教室·서울市立大學校*

Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea(LVII)
Comparison of Various Antitumor Constituents of *Coriolus versicolor*

Hee-Jeong Cho, Mi-Ja Shim*, Eung-Chil Choi and Byong-Kak Kim

Department of Microbial Chemistry, College of Pharmacy, Seoul National University

Seoul 151-742, and Seoul City University*, Seoul 130-743, Korea

ABSTRACT: To separate and quantitate antitumor protein-bound polysaccharides of *Coriolus versicolor*, the constituents were obtained from the submerged culture of the mycelia(C) and from the extract of the carpophores of the wild fungus(N). The polysaccharides were degraded by methanolysis. The neutral monosaccharides were separated and quantitated by HPLC using microbondapak carbohydrate analysis column, refractive index detection and water-acetonitrile acetic acid elution. The analyses of these constituents by HPLC showed that the natural constituent(N) consisted of glucose, xylose and mannose, the average amount being 96.44, 2.16 and 1.73%, respectively. The fermentation constituent(C) consisted of mannose, glucose, xylose and galactose, the average amount being 61.30, 14.00, 12.95, and 11.75%, respectively. The analyses of these constituents by an amino acid analyzer showed that both C and N contained 17 amino acids.

KEYWORDS: *Coriolus versicolor*, HPLC, Protein-bound polysaccharide, Monosaccharide analysis, Amino acid analysis.

담자균류에 함유된 유효성분에 대한 연구는 Bose (1955)가 담자균류 수종의 항균성분에 대하여 보고 하였으며 Neal 등(1968)은 그 2차 대사산물 축적에 대하여 연구한 바 있다. 그중 담자균류의 항암성분에 관한 연구는 Roland 등(1960)이 *Calvatia gigantea*로부터 calvacin을 분리함으로써 시작되어, Gregory 등(1966)은 북미와 유럽지역에서 채집한 자실체와 이들로부터 분리한 균사 배양물에 대한 항암실험을 시행하여 20속에 걸쳐 50개의 배양물에서 항암력을 확인하였다. 그후 Espenshade 등(1966)은 이러한 항종양 담자균의 분리와 배양에 관한 연구 결과를 발표하였다.

이러한 항암성분 연구는 근래에 활발히 진행되어 담자균류중 표고버섯 *Lentinus edodes*(Berk.) Singer에서 추출한 lentinan이 sarcoma-180에 대하

여 강한 항암작용을 나타냈으며, 이의 항암기전은 세포면역반응의 촉진에 기인한 것으로 Chihara (1970), Maeda(1971) 등이 보고한 바 있다. 식용 버섯중의 하나인 팽나무버섯 *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Singer에도 항암성 다당류가 있음을 Yoshioka 등(1973)이 보고하였고, 화경버섯 *Lampteromyces japonicus*에 대해서는 Fukuda 등 (1975)이 발표한 바 있다.

구름버섯 *Coriolus versicolor* (Fr.) Quéf.에 대하여도 항암 실험이 진행되어 이 버섯의 성분중 하나인 단백질-결합 다당류의 sarcoma-180에 대한 작용에 관하여 Tsukagoshi 등(1974)이 발표하였다. 이 단백질결합 다당류는 항체 생성(Nomoto 등, 1975; Ohno 등, 1972)과 지연성 과민반응(Abe 등, 1976) 등의 다양한 종류의 면역반응을 상승시키거나 회복

시킨다고 보고되었으며, 암세포 접종 전에 투여했을 때 *allogeneic or syngeneic tumors*의 성장을 억제한다고 보고되었다(Tsakagoshi 등, 1974; Ohno 등, 1975).

Hirase 등(1976a, 1976b)은 이 단백결합 다당류가 12~14%의 protein을 포함하고 있으며 이것은 16종류의 아미노산으로 구성되어 있다고 보고하였으며 이 단백결합 다당류의 평균 분자량은 약 10^6 으로 ultracentrifugation technique를 사용해서 알아냈으며 이것의 다당류 부분의 구조는 1→4, 1→3 또는 1→6 branch를 가지는 β -glucan이라고 보고하였다. 이 단백결합 다당류의 성상은 약간 특징적인 냄새를 가지는 갈색 분말이며 열과 빛에 안정해서 오랜기간 저장이 가능하다.

한편 한국산 담자균류에 대한 연구는 부진한 상태였으나 근년에 와서 이 분야의 연구가 활발해 졌다. 1978년까지 600여종에 이르는 균류가 보고되었고(Lee 등, 1959; Kim 등, 1976a; Kim, 1978a), 그들 고등균류의 성분에 대해서도(Kim 등, 1973) 연구가 행하여 졌다.

그들 한국산 고등균류의 성분에 관한 연구중에는 alkaloid 확인(Kim 등, 1971, 1975), 아미노산 함량분석(Kim 등, 1977), 지방산 확인(Kim 등, 1978b), 스테롤 확인(Kim 등, 1976b, 1978c; Shim 등, 1978b, 1978c, 1979a, 1979b; Kwon 등, 1980), 버섯 추출물에 대한 항균력 실험(Yoon, 1959), 항균성분의 분리(Chung 등, 1978), 버섯 성분이 HeLa 배양세포증식에 미치는 영향(Chung, 1979)이 보고된 바 있다. 특히 구름버섯의 항암성분에 관한 연구는 Kim 등(1979a)이 구름버섯, 표고버섯, 느타리버섯 자실체의 열탕 추출물이 sarcoma-180에 강한 저해작용이 있음을 밝힘으로써 시작되었다. Park 등(1979)은 이들 항암성분의 화학분석을 시행하였으며 Shim(1980)은 구름버섯 배양균사의 항암성분인 단백결합 다당체의 면역증강 효과를 입증하였다. Shim(1981)은 구름버섯 배양균사의 항암성분 및 배양에 관한 연구 결과를 보고하여 균사의 액내 배양에 의한 항암성분의 대량생산 가능성을 증명하였다.

이에 저자는 배양 균사체의 항암성분과 야생 구름버섯 자실체의 항암성분을 비교하기 위해서, 항암성분을 methanolysis하여 얻은 단당류를 HPLC에 의하여 정성 및 정량하였던 바, 차이점을 발견하였다. 이 다당류에 lactose가 혼입되었을 때 HPLC에 의

하여 구별할 수 있었다. 또한 항암성분 구성 단백질의 함량을 측정하고 그 구성 아미노산을 아미노산 분석기를 이용하여 정성 및 정량하였다.

材料 및 方法

실험 재료

본 실험에 사용한 재료는 구름버섯 *Coriolus versicolor* (Fr.) Quélet의 균사 배양물과 야생 구름버섯의 자실체를 사용하였다.

배양한 균사체로부터 시료 조제

1) 배지 조성

① 종균용 배지

potato infusion 10g, glucose 50g, peptone 5g, yeast ext. 5g, K_2HPO_4 1.5g, $MnSO_4$ 0.5g을 증류수에 녹여 1l로 하고 pH 5.5로 맞춘 후, 한천 20g을 넣어서 멸균후 사면배지로 만들었다. 위의 potato infusion은 감자 10g을 썰어서 물 500 ml를 넣어 끓여쳐서 만든 것이다.

② 액내 진탕배양용 배지

glucose 50g, peptone 20g, KH_2PO_4 0.87g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, KCl 0.3g, basic mineral solution 20 ml를 증류수에 녹여 1l로 하고 pH 6.5로 맞춘 후, 멸균하여 사용하였다. basic mineral solution은 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.5g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.36g, $ZnCl_2$ 0.2g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05g을 증류수에 녹여 100 ml로 하여 만들었다.

2) 배양 방법

① 종균 배양

구름버섯 *Coriolus versicolor* (Fr.) Quélet의 균사체를 무균적으로 분리하여 종균용 사면배지에 이식하여 $24 \pm 1^\circ C$ 에서 1주일간 배양하였다.

② 1차 액내 진탕배양

사면배지의 균사체를 무균적으로 분리하여 액내 진탕배양용 배지 소량을 가하여 blender로 균질화하고 100 ml의 액내 배양용 배지를 가한 500 ml 삼각플라스크에 이식하여 $24 \pm 1^\circ C$ 에서 180 rpm의 속도로 orbital shaker incubator에서 7일간 배양하였다.

③ 2차 액내 진탕배양

균사체를 포함한 1차 액내 배양액 전체를 blender로 10초간 균질화하고 무균 pipet으로 10 ml씩 취하여 액내 배양용 배지 100 ml를 가한 500 ml 삼각플라스크에 이식하여 $24 \pm 1^\circ C$ 에서 180 rpm의 속도로 incubator에서 14일간 배양하였다.

3) 항암 성분의 추출

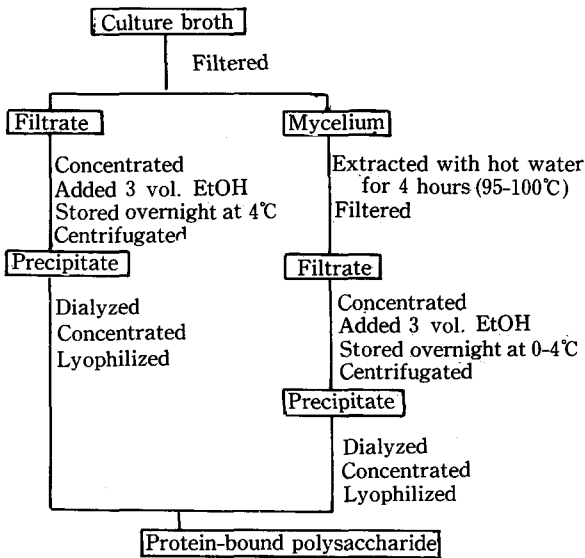
배양액을 감압여과하여 여액과 균사체를 분리하고 균사체는 60°C에서 24시간 동안 건조시키고 여액은 수용상에서 농축한 후 에탄올을 가하여 생성된 섬유상의 갈색침전을 완결시키기 위해 0~4°C에서 1일간 방치하였다.

원심분리기를 사용하여 8000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전물을 취한 후 냉동 건조시켜 생긴 건조물을 증류수로 녹여 Visking tube로 0~4°C에서 3일간 투석시켰다. 이 액을 농축한 후 냉동 건조시켜 분말을 얻었다.

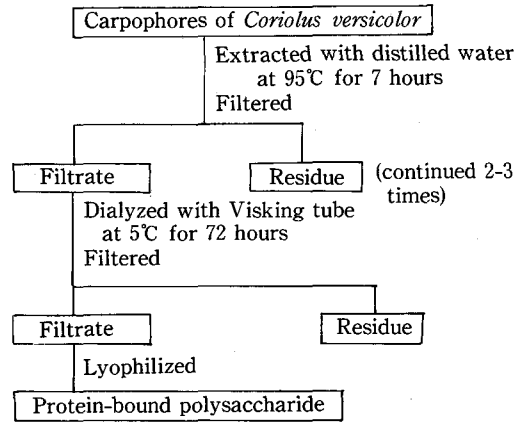
한편 건조된 균사체는 증류수를 넣어 수용상에서 4시간 동안 가열 환류시켜 추출한 후 감압여과하였다. 균사체의 추출여액을 감압 농축하여 상기 방법에 따라 에탄올로 침전, 원심분리, 투석, 농축, 냉동 건조시켜 protein-bound polysaccharide를 얻었다. 이 과정을 두번하여 각각을 Sample C₁, C₃라 명명하였다(Scheme I).

자실체로부터 시료 조제

구름버섯 *Coriolus versicolor* (Fr.) Quélet의 건조 자실체 200g을 5분동안 blender로 균질화한 후 증류수를 가하여 reflux하에서 7시간 동안 추출하였다. 여과후 잔사에 다시 증류수를 가하여 reflux하에서 3시간 동안 추출하였다. 이것을 여과하고 잔사



Scheme I. Extraction and fractionation of the antitumor polysaccharide from the cultured mycelia of *Coriolus versicolor*.



Scheme II. Extraction and separation of the antitumor component from the carpophores of *Coriolus versicolor* (Fr.) Quelet that were collected in Korea.

에 다시 증류수를 가하여 2시간 동안 추출하였다. 이 3개의 여액을 합하여 700 ml가 되도록 농축하였다. Visking tube를 사용하여 5°C에서 72시간 동안 투석시키고 원심분리한 후 침전을 제거하고 상등액을 냉동 건조시켜 protein-bound polysaccharide를 얻었다. 이 전체과정을 3번하여 각각을 Sample N₁, N₂, N₃라 명명하였다(Scheme II).

항암 성분중의 구성 다당류의 분석

1) 다당류의 함량 측정

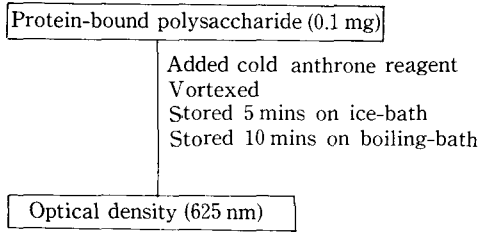
총 다당류의 함량분석은 glucose를 표준액으로 하여 anthrone 시약과 반응시켜 나타나는 발색도를 625 nm에서 흡광도를 측정하여 검량곡선에 의거하여 정량하였다.

① 시약

glucose(standard) : 100 µg/ml 용액, H₂SO₄ : 75%, anthrone reagent: anthrone 200 mg을 absolute ethyl alcohol 5 ml에 용해한 후 75% H₂SO₄를 가해 100 ml로 한 용액

② 실험방법

glucose(standard)용액을 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ml되게 시험관에 채운 후 증류수로 모두 1.0 ml 되게 채웠다. 이때 모든 시험관은 ice-bath에서 실시하였다. 각 시험관에 cold anthrone 시약을 5.0 ml 첨가하여 즉시 vortex mixer기로 진탕한 후 다시 ice-bath에서 5분간 방치하였다. 5분 경과후 각 시험관을 boiling bath로 옮겨 10분간 방치한 후 다시 ice-bath에 옮겼다. sample도 동시에 동일 조작을 거쳐 625 nm에서 흡광도를 측정하여 검량곡선을 작



Scheme III. Determination of the contents of polysaccharide by anthrone test.

성하여 sample 중의 총 당함량을 정량하였다 (Scheme III).

2) 항암 성분중의 구성 단당류의 분석

① 실험기기 및 시약

High performance liquid chromatograph: Waters Associates Model 441, U6K injector, Solvent delivery system 6,000 and M-45, Recorder SE-120 (Detector : Differential Refractometer R401 : attenuation 8 X), Milli-Q water system : Waters Associates (U.S.A.), acetonitrile, methanol (HPLC用) : Merck (W. Germany)

② HPLC 분석조건

Column : μ Bondapak/carbohydrate analysis (3.9 mm i.d. \times 30 cm), eluent : acetonitrile-water acetic acid (80 : 20 : 1) 이 eluent는 ultrasonic bath에서 30분간 sonication 하여 degassing하고 0.45 μ m filterz (Millipore, Type FHUP 47 mm)에 통과시켜 사용하였다. Flow rate : 2 ml/min, 8 \times (attenuation) RI detector

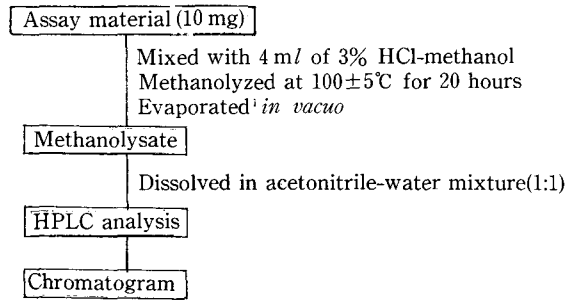
③ 분석 시료조제 및 분석방법

sample 10 mg을 4 ml의 3% HCl-methanol 용액에 넣고 vortex한 후 질소를 충전시키고 밀봉한 후 100 \pm 5 $^{\circ}$ C에서 20시간 동안 methanolysis시켰다. 여과한 후 여액을 감압농축시키고 water-acetonitrile mixture (1 : 1)으로 희석시켰다.

각 표준당에 대해서도 같은 방법으로 methanolysis시킨 후 위의 조건으로 HPLC를 행하였다. 시료의 HPLC chromatogram상의 retention time을 표준당의 retention time과 비교하여 시료중의 단당류를 확인 및 정량하였다 (Scheme IV).

④ Calibration curve 작성

표준당으로 glucose, galactose, mannose, xylose를 각각 15 mg씩 취해서 3% HCl-methanol 6 ml에 넣고 vortex한 후 질소를 충전시키고 100 \pm 5 $^{\circ}$ C에서



Scheme IV. Procedure of monosaccharide analysis by HPLC.

20시간 동안 methanolysis시켰다. 여과한 여액중 4 ml를 취해 농축시킨 후 acetonitrile-water mixture (1 : 1)을 가해서 희석시킨 후 위의 HPLC 조건하에서 5, 10, 50, 100, 200 μ g injection하였다. glucose와 galactose의 peak 겹침을 보정해 주는 방법으로 methanolysis시킨 glucose와 galactose를 동량씩 혼합하여 injection하였다. 이때 injection한 양은 각각의 당에 대해서 2.5, 12.5, 25, 50, 100 mg이 되게 하였다. HPLC chromatogram상의 peak 높이를 측정하여 직선의 식을 구하였다.

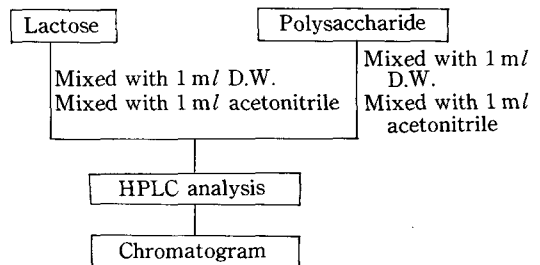
시료중의 lactose 혼입 여부 확인

1) 시료 조제 및 분석방법

sample C₁, C₃, N₁, N₃ 그리고 lactose 표준품을 20 mg 취해 1 ml 증류수에 완전히 녹인후 acetonitrile 1 ml를 가해 분석을 위한 시료를 만들었다. 아래와 같은 HPLC 조건하에서 이 시료를 5 μ l씩 injection하여 HPLC chromatogram상의 retention time을 lactose의 retention time과 비교하였다 (Scheme V).

2) HPLC 분석 조건

Column : μ Bondapak/carbohydrate analysis (3.9 mm i.d. \times 30 cm), Eluent : acetonitrile-wa-



Scheme V. Procedure of lactose analysis.

ter-acetic acid(60 : 40 : 1), 이 eluent는 ultra-sonic bath에서 30분간 sonication하여 degassing하고 0.45 μ m filter(Millipore, Type FHUP, 47 mm)에 통과시켜 사용하였다. Flow rate : 2 ml/min, 8 \times (attenuation) RI detector

항암성분중의 단백질 분석

1) 총 단백질의 함량 측정

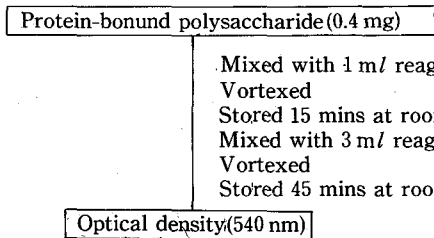
총 단백질의 함량은 Lowry-Folin법으로 구하였다. 시료에 대해 각각 Lowry-Folin 반응을 실시한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 검량곡선으로 단백질 함량을 구하였다.

① 시약

Bovine serum albumin(BSA) : 0.3 mg/ml 용액, Reagent A : 0.5 N NaOH용액에 Na₂CO₃ 100 g을 첨가하여 총 1l가 되게 하였다. Reagent B : 증류수 100 ml에 CuSO₄·5H₂O 1g을 용해시킨 용액, Reagent C : 증류수 100 ml에 potassium tartarate 2g을 용해시킨 용액, Reagent D : Reagent A 15 ml, Reagent B 0.75 ml, Reagent C 0.75 ml를 모두 섞은 용액, Reagent E : 2 N Folin-phenol 용액 5 ml에 증류수 50 ml를 섞은 용

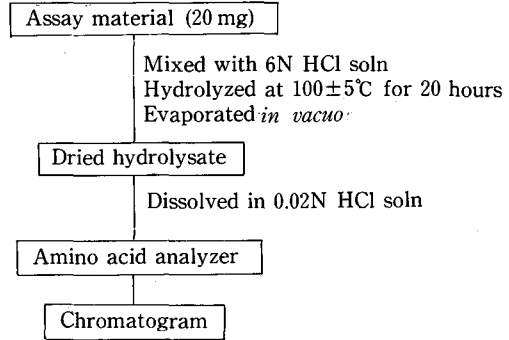
② 실험방법

시험관에 BSA 용액(0.3 mg/ml)을 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ml를 채운 후 증류수로 모두 1.0 ml 되게 채운 후 Reagent D를 각 시험관에 1 ml씩 첨가한 후 vortex mixer기로 진탕시킨 후 실온에서 15분간 방치했다. 방치하는 동안 2 N-Folin phenol 용액 5.0 ml와 증류수 50 ml를 섞어서 Reagent E를 조제했다. 15분 경과 후 각 시험관에 Reagent E



Scheme VI. Determination of the contents of protein by Lowry-Folin method.

- Reagents
 A=Na₂CO₃ 100g+0.5N NaOH soln→1L
 B=CuSO₄·5H₂O 1g+D.W. 100 ml
 C=Potassium tartarate 2g+D.W. 100 ml
 D=Reagent A 15 ml+Reagent B 0.75 ml
 +Reagent C 0.75 ml
 E=2N Folin-phenol 5 ml+D.W. 50 ml



Scheme VII. Procedure of amino acid analysis.

를 3 ml씩 추가하여 즉시 vortex mixer기로 진탕시켜 다시 실온에서 45분 방치하였다. sample도 동시에 동일 조작을 실시하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 검량 곡선을 작성하여 sample중의 총 단백질량을 정량하였다(Scheme VI).

2) 아미노산의 분석

① 시료 조제 및 분석방법

sample을 20 mg 취해 6 N-HCl 용액에 넣어 20시간 동안 100 \pm 5 $^{\circ}$ C에서 가수분해하였다. 여과한 후 여액을 감압농축시키고 0.02 N-HCl 용액으로 희석시켜 50 μ l injection하였다(Scheme VII).

② 분석 조건

Column : Hitachi 4 mm ϕ \times 150 mm, ion exchange resin : resin No. 2619F, flow rate : buffer : 0.225 ml/min, ninhydrin reagent : 0.3 ml/min, column temperature : 53 $^{\circ}$ C, reaction bath temp. : 98-100 $^{\circ}$ C, photometer : measuring wavelength : 440 and 570 nm, detector : tungsten, model : Hitachi amino acid analyzer 835

結果 및 考察

다당류의 함량 측정 결과

anthrone 법에 따라 실험한 후 spectrophotometer에 의한 당류 함량의 분석 결과는 Table I 과 같다. 표준당의 calibration curve식은 Fig. 1에 나타나며 여기서 구한 직선의 식은 y=0.00488x+0.0406이었다. Sample C₁, C₃는 각각 polysaccharide 함량이 52.54, 56.64%였고 Sample N₁, N₂, N₃는 각각 76.11, 74.06, 74.88%로 야생구름버섯 자실체에서부터 추출한 항암성분이 당을 더 많이 함유하고 있었다. 일본산 PS-K는 40.86%로 당

Table I. Polysaccharide contents of the antitumor components.

| Sample | Polysaccharide |
|----------------|----------------|
| C ₁ | 52.54* |
| C ₃ | 56.64 |
| N ₁ | 76.11 |
| N ₂ | 74.06 |
| N ₃ | 74.88 |
| PS-K | 40.86 |

*Expressed as the amounts of weight %

함량이 시료보다 낮게 나타났다.

항암 성분종의 단당류의 분석 결과

1) 항암 성분 구성 단당류의 정성

HPLC에 의한 구성 단당류의 정성 결과는 Fig. 2, Fig. 3에 나타난 바와 같다. Sample C₁, C₃의 단당류는 xylose, mannose, glucose, galactose의 4종류였으며 Sample N₁, N₂, N₃의 단당류는 xylose, mannose, glucose로 3종류였다. 일본산 PS-K는 xylose, mannose, glucose의 3종류로 구성되어 있었다.

2) Calibration curve의 식

표준 단당류(glucose, mannose, xylose)의 200,

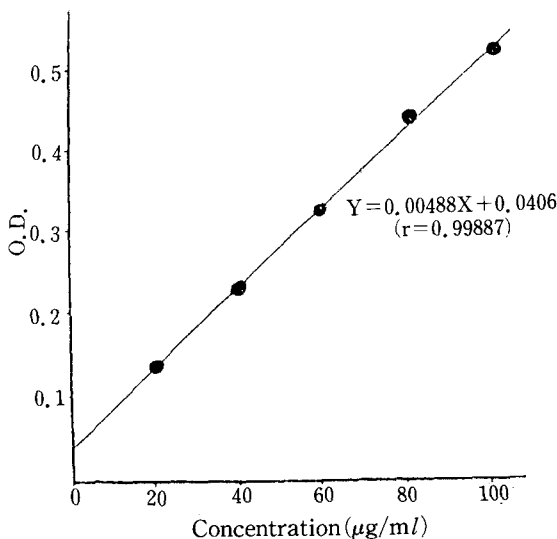


Fig.1. Calibration curve of standard glucose for the determination of the contents of polysaccharide.

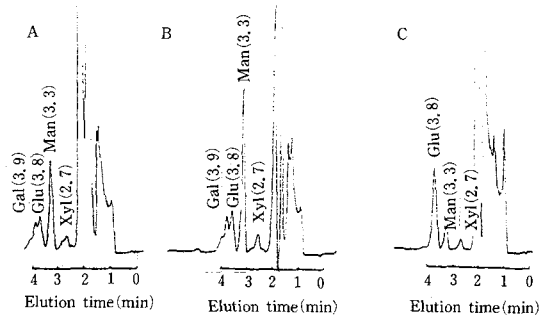


Fig.2. HPLC patterns of monosaccharides of samples C₁ (A), C₃ (B) and PS-K(C).

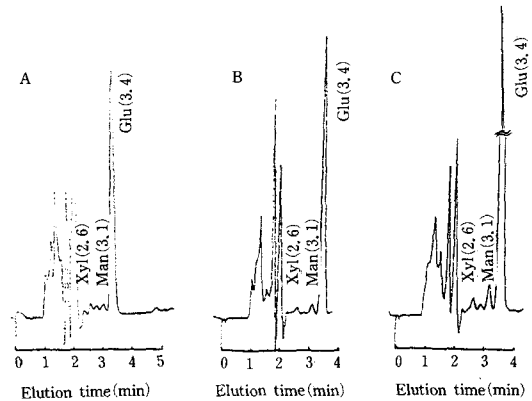


Fig.3. HPLC patterns of monosaccharides of samples N₁ (A), N₂ (B) and N₃ (C).

100, 50, 10, 5ng의 5개 농도에서 나온 peak 높이로부터 구한 calibration curve는 Fig. 4에 나타난 바와 같다.

그 식을 구해보면 다음과 같다.

glucose : $y=0.068+0.076X$, mannose : $y=0.103+0.121X$, xylose : $y=0.139+0.061X$

Sample C₁, C₃의 HPLC chromatogram에서 glucose와 galactose의 peak 겹침을 보정하기 위하여 glucose와 galactose를 동량 혼합 injection하였을 때 나오는 peak 높이로부터 구한 calibration curve식은

glucose : $y=0.224+0.148X$, galactose : $y=0.083+0.124X$ 였다(Fig. 5).

3) 항암성분 구성 단당류의 정량

HPLC에 의한 구성 단당류의 정량 결과는 Table II에서 나타난 바와 같다. 시료 C₁, C₃는 mannose의 함량이 가장 많았으며 물 농도비가 C₁에서는

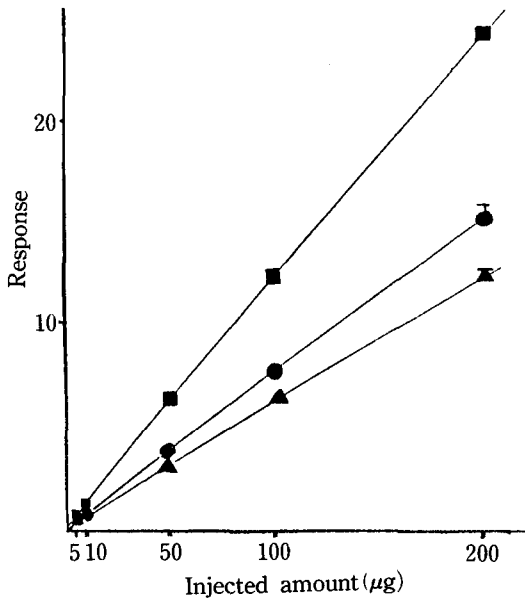


Fig. 4. Calibration curves of glucose, mannose and xylose.

- : Mannose ($Y=0.121X+0.103$)
- : Glucose ($Y=0.076X+0.068$)
- ▲ : Xylose ($Y=0.061X+0.139$)

55%, C₃에서는 68%로 나타났다. 그 다음으로는 glucose, xylose, galactose 순이었다. Sample N₁, N₂, N₃는 세계 모두에서 물 농도비는 96% 이상이 glucose로 구성되는 것으로 나타났다. 그 다음에 소량의 xylose, mannose가 존재하였다. 일본산 PS-K는 glucose의 물 농도비가 69%로 성분 단당류 중 가장 많았다. 그 다음으로는 mannose, xylose 순이었다.

4) Sample중의 lactose의 정성

sample과 lactose의 HPLC chromatogram은

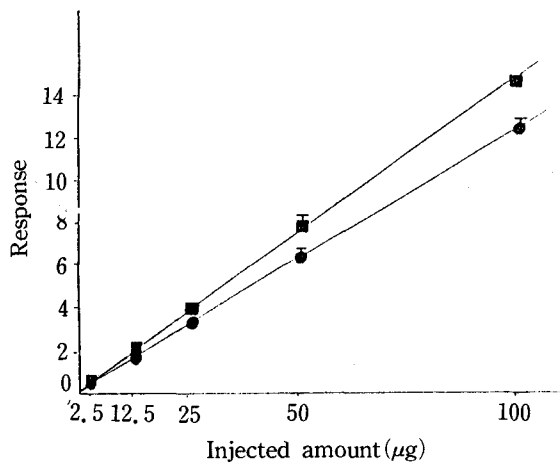


Fig. 5. Calibration curves of glucose and galactose.

- : Glucose ($Y=0.148X+0.224$)
- : Galactose ($Y=0.124X+0.083$)

Fig. 6에 나타난 바와 같다. retention time이 2.9분에서 표준당인 lactose가 관찰되는 반면 sample C₁, C₃, N₁, N₃에서는 2.9분의 lactose peak가 나타나지 않았다. 이것으로서 sample중에 혼입된 lactose를 구별할 수 있다.

항암성분의 단백질 함량 측정

Lowry-Folin 법에 따라 실험한 후 spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 계산된 단백질 함량은 Table III과 같으며 이때의 표준 단백질의 calibration curve는 Fig. 7에 나타내었다. 이때 직선의 식은 $y=0.00233X+0.0499$ 였다. Sample C₁, C₃는 각각 26.62, 24.58%였으며 Sample N₁, N₂, N₃는 11.59, 12.58, 10.61%로 배양한 균사체에서 얻은 시료보다 야생 구름버섯 자실체에서 얻은 것이 더 함량이 낮았다. 일본산 PS-K의 단백질 함량은

Table II. Contents of monosaccharides in the polysaccharide fraction of the antitumor components.

| Sample | Glucose | Mannose | Xylose | Galactose |
|----------------|-------------|------------|------------|------------|
| C ₁ | 15.58±1.20* | 55.01±0.61 | 16.25±2.46 | 13.15±0.88 |
| C ₃ | 12.42±0.33 | 67.58±0.52 | 9.65±0.42 | 10.35±0.27 |
| N ₁ | 96.17±0.31 | 1.67±0.36 | 2.16±0.09 | N. D. ** |
| N ₂ | 96.52±0.39 | 1.49±0.03 | 1.99±0.41 | N. D. |
| N ₃ | 96.62±1.62 | 2.04±0.55 | 2.34±1.07 | N. D. |
| PS-K | 69.03±0.46 | 17.04±0.42 | 13.94±0.05 | N. D. |

*Mean±S.D. of mole %

**Not detected

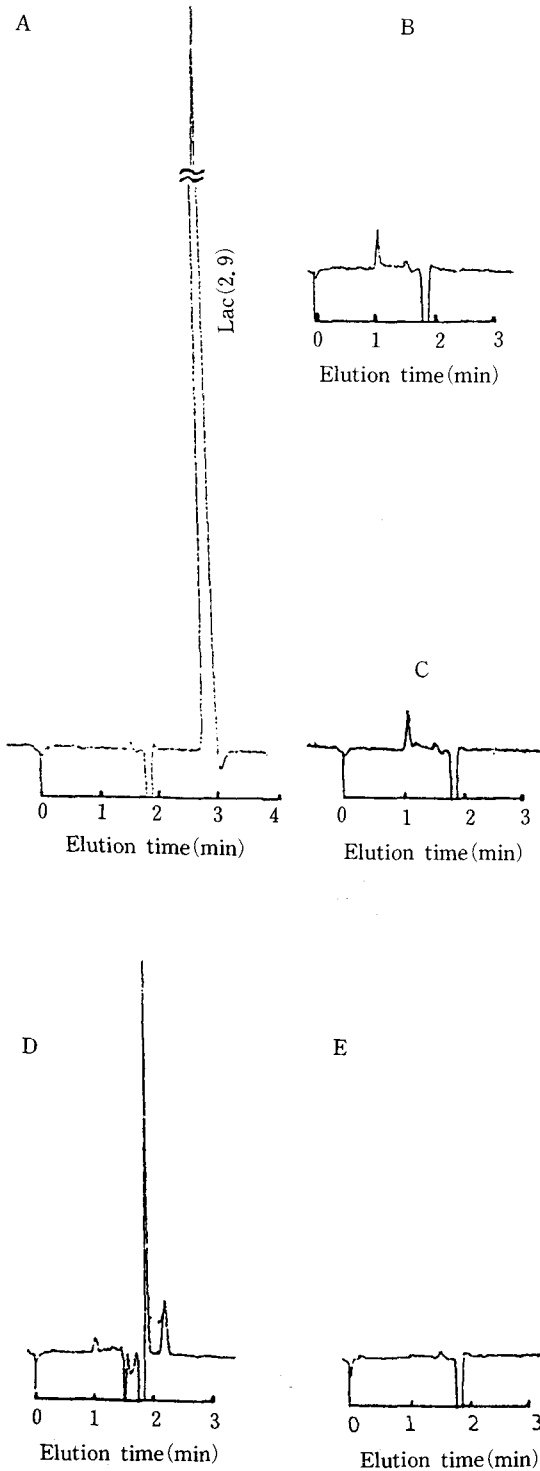


Fig.6. HPLC patterns of lactose(A), samples C₁(B), C₃(C), N₁(D) and N₃(E).

Table III. Protein contents of the antitumor components.

| Sample | Protein |
|----------------|---------|
| C ₁ | 26.62* |
| C ₃ | 24.58 |
| N ₁ | 11.59 |
| N ₂ | 12.58 |
| N ₃ | 10.61 |
| PS-K | 46.47 |

*Expressed as weight %

46.47%로 시료보다 높았다.

아미노산의 분석 결과

Amino acid analyzer에 의해 분석된 각 아미노산 조성은 Table IV와 같으며 각각의 chromatogram은 Fig. 8, 9, 10, 11, 12, 13과 같다. 시료 모두에서 구성 아미노산은 17종이었으며 그 종류가 동일하였다. L-glutamic acid는 시료 모두에서 가장 많이 존재하였고 다음으로 배양한 균사체에서는 glycine, L-threonine, L-aspartic acid, L-serine 이 평균 10% 이상으로 많이 존재하였으며 야생 구름버섯 자실체로부터 얻은 시료는 glycine, L-aspartic acid 등이 많았으며 일본산 PS-K에서는 glycine, L-aspartic acid, L-alanine 등이 평균 10% 이상으로 많이 존재하였다. 그러나 L-cystine 은 시료 모두에서 가장 소량으로 존재하였다.

구름버섯의 항암성분이 단백결합다당류로 구성되

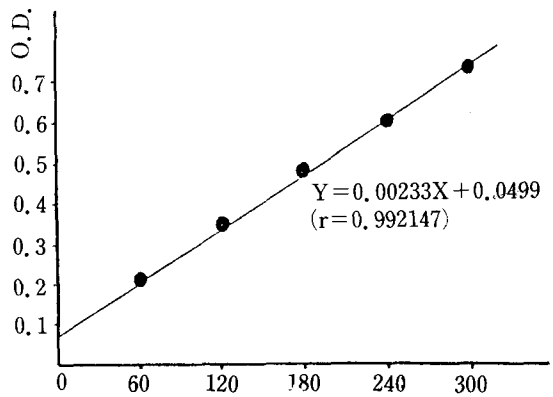


Fig.7. Calibration curve of standard albumin for the determination of the contents of protein.

Table IV. Contents of amino acids in the protein fraction of the antitumor compounds.

| Amino acid | C ₁ | C ₃ | N ₁ | N ₂ | N ₃ | PS-K |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|
| L-Glutamic acid | 11.91 | 11.75 | 11.05 | 15.92 | 11.14 | 14.04 |
| Glycine | 11.81 | 9.50 | 10.77 | 10.73 | 10.90 | 11.10 |
| L-Threonine | 11.61 | 11.99 | 7.18 | 6.98 | 7.26 | 4.34 |
| L-Aspartic acid | 10.51 | 10.12 | 11.05 | 10.38 | 10.90 | 10.97 |
| L-Alanine | 9.91 | 9.35 | 8.56 | 9.12 | 8.72 | 12.08 |
| L-Serine | 9.41 | 10.79 | 8.01 | 7.16 | 8.23 | 4.60 |
| L-Valine | 7.36 | 6.76 | 9.12 | 7.87 | 9.69 | 8.78 |
| L-Proline | 6.46 | 6.04 | 5.25 | 5.37 | 5.33 | 6.11 |
| L-Leucine | 5.06 | 4.51 | 4.70 | 5.37 | 4.84 | 9.25 |
| L-Isoleucine | 3.50 | 3.17 | 3.59 | 3.58 | 3.39 | 4.73 |
| L-Lysine | 3.00 | 4.36 | 6.91 | 5.37 | 6.30 | 2.06 |
| L-Phenylalanine | 2.65 | 2.35 | 2.49 | 2.86 | 2.42 | 4.39 |
| L-Arginine | 1.55 | 3.41 | 3.31 | 2.86 | 3.39 | 1.88 |
| L-Tyrosine | 1.30 | 2.11 | 1.10 | 1.43 | 1.21 | 2.46 |
| L-Methionine | 1.30 | 1.10 | 2.21 | 1.97 | 2.18 | 1.53 |
| L-Histidine | 1.25 | 2.16 | 3.87 | 2.33 | 3.39 | 1.37 |
| L-Cystine | 0.35 | 0.53 | 0.83 | 0.72 | 0.73 | 0.32 |

*Expressed as mole %

었다는 점을 착안하여 다당류의 함량을 구하고 이 다당류를 methanolysis로 단당류로 하여 HPLC를 이용하여 분석하는 실험을 시행하였다. 이때 HPLC 분석 조건으로 column은 μ Bondapak/carbohydrate

analysis column을, 그리고 용매로 acetonitrile-water-acetic acid를 80:20:1로 해서 사용하였을 때가 다른 column과 용매 조건을 사용하였을 때보다 더 좋은 분리능을 나타내었다.

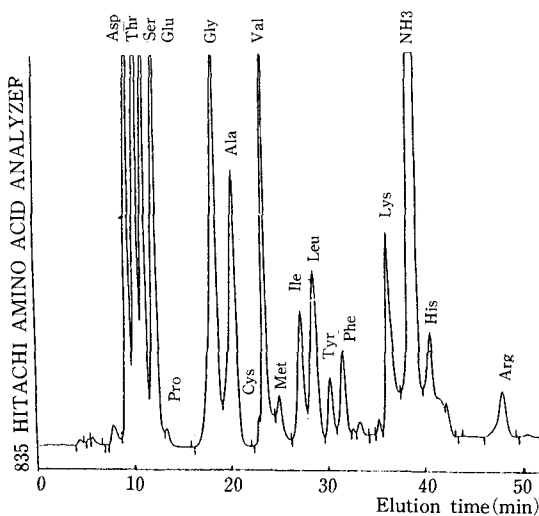


Fig.8. Chromatogram of amino acids of sample C₁.

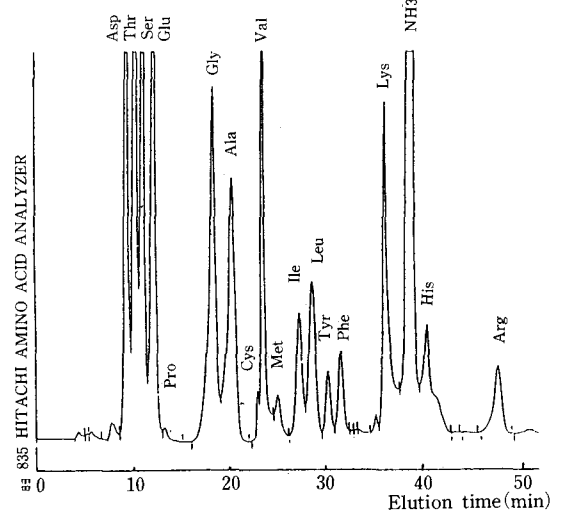


Fig.9. Chromatogram of amino acids of sample C₃.

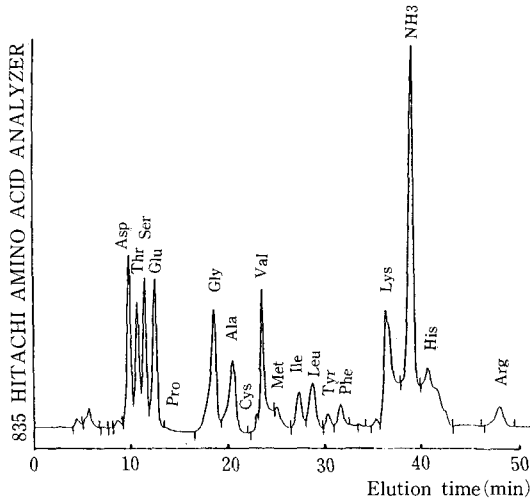


Fig.10. Chromatogram of amino acids of sample N₁.

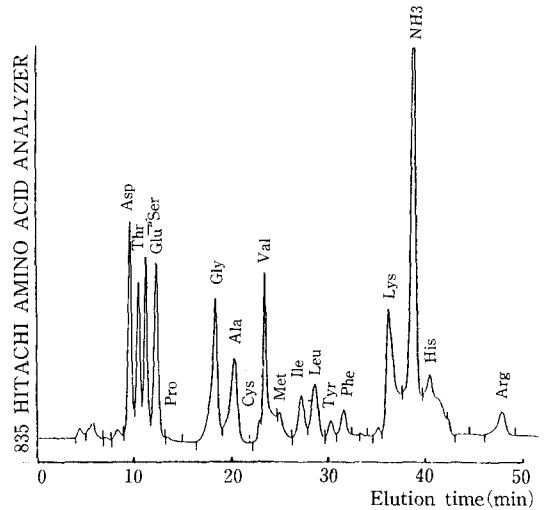


Fig.12. Chromatogram of amino acids of sample N₃.

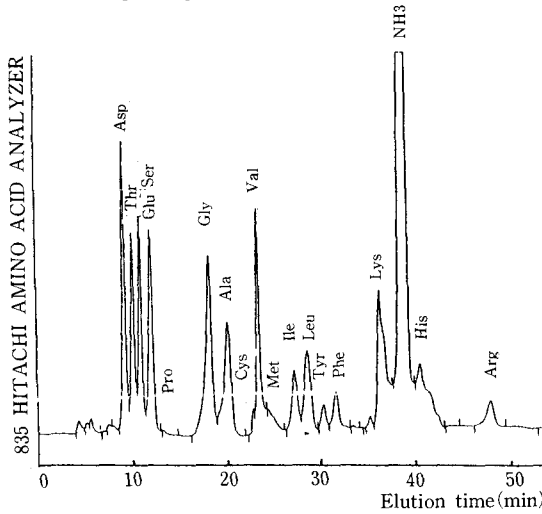


Fig.11. Chromatogram of amino acids of sample N₂.

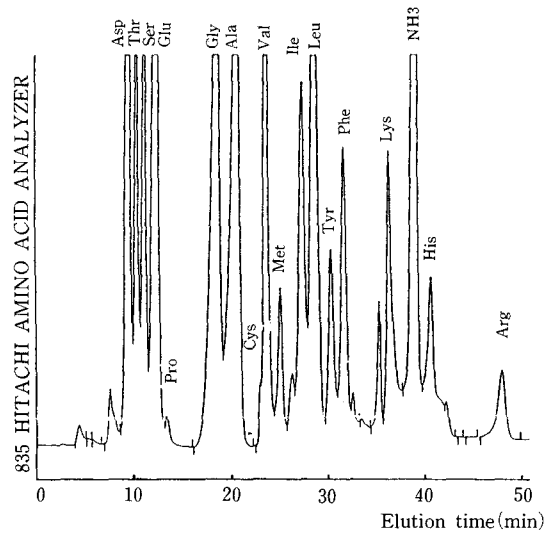


Fig.13. Chromatogram of amino acids of PS-K.

시료중 항암성분 구성 단당류는 retention time이 동일한 당을 찾음으로서 결정하였는데 배양한 균사체로부터 얻은 시료 C₁, C₃에서 xylose, mannose, glucose, galactose의 4개의 단당류가 확인되었다. 이 확인은 시료에 이 4개의 단당을 각각 소량씩 혼합하여 injection하였을 때 기대했던 당의 retention time에서 peak가 분리되는 것없이 단일 peak로 각각 증가함을 관찰하므로써 가능했다. 야생 자실체로부터 얻은 시료 N₁, N₂, N₃는 xylose, mannose, glucose의 3개의 단당류의 peak가 나타났고 이것 역시 위와같은 방법으로 확인되었다.

또한 이 단당류의 구성은 야생 자실체로부터 얻은 시료의 경우에는 일본산 PS-K와 일치하나 정량하였을 때는 PS-K보다 더 높은 양의 glucose를 가지는 것으로 나타났으며 반대로 mannose와 xylose는 훨씬 더 작은 양으로 가지는 것으로 나타났다. 그러나 배양 균사체의 시료인 경우는 단당류 구성에서 galactose가 더 존재했으며 PS-K와 다르게 mannose가 가장 많이 존재하고 glucose, xylose, galactose가 거의 유사한 양으로 들어 있었다.

lactose peak는 시료에서 관찰되지 않았으므로 시료를 위의 HPLC 조건으로 HPLC 분석했을 때 만일 lactose가 부형제 등으로 혼합하여 사용되었을 경우에는 lactose peak가 높게 나타나게 되므로 확인할 수 있다.

아미노산 분석에서는 모든 시료에서 17종의 아미노산이 확인되었으며 그중 glutamic acid가 PS-K에서 14%로 가장 많았으며 이것은 시료에서도 많은 양으로 존재하였다. 그러나 시료에서 10% 이상으로 존재했던 threonine, serine이 PS-K에서는 4% 정도로 적게 존재했다. 하지만 이 분석에서는 시료들 간에 큰 차이는 보이지 않았다.

摘 要

구름버섯 배양균사체와 야생 구름버섯 자실체로부터 얻은 protein-bound polysaccharide의 당과 단백질 함량을 비교하였을 때 배양균사체인 경우보다 야생 자실체의 경우가 당 함량이 더 높게 나타났으며 단백질 함량은 더 적게 나타났다. 구름버섯에서부터 얻은 시료를 methanolysis시킨 후 HPLC로 분석하였을 때 배양균사체인 경우 4종류의 단당이 검출되었고 그중 mannose가 가장 함량이 많은 반면 야생 자실체인 경우 3종류의 단당이 검출되었으며 그중 glucose가 가장 많이 존재하였다. 구름버섯에서부터 얻은 시료에 lactose가 혼합되었을 경우 HPLC로 구별할 수 있었다. 구름버섯에서 얻은 시료의 구성 아미노산을 분석하였을 때 시료 모두에서 동일한 17종의 아미노산이 검출되었다.

감사의 말씀

이 연구에 소요되는 경비의 일부는 한국과학재단의 연구비로 충당되었으며 이에 감사하는 바이다.

参考文献

- Abe, S., Ohkuma, M., Yamazaki, M. and Mizuno, D.(1976): Differentiation of host-mediated antitumor agents from mitotic poisons by the antitumor foot-ped reaction in Ehrlich carcinoma-ddY mouse system. *Gann* **67**: 685-692.
- Alpenfels, W.F.(1981): A rapid and sensitive method for the determination of monosaccharides as their dansyl hydrazones by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **114**: 153-157.
- Bose, S.R.(1955): Campestrin, the antibiotic of *Psalliota campestris*. *Nature* **175**: 468.
- Cheetham, N.W.H. and Sirimanne, P.(1983): Methanolysis studies of carbohydrates, using H.P.L.C. *Carbohydrate Res.* **112**: 1-10.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. and Fukuoka, F.(1970): Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* **30**: 2776-2781.
- Chung, K.S., Shim, M.J. and Kim, B.K.(1978): Studies on the constituents of the higher fungi of Korea(XI), an antibiotic component and a sterol of *Coriolus sanguineus* Fr. *Arch. Pharm. Res.* **1**: 33-40.
- Chung, K.S.(1979): The effects of mushroom components on the proliferation of HeLa cell line *in vitro*. *Arch. Pharm. Res.* **2**: 25-33.
- Espenshade, M.A. and Griffith, E.W.(1966): Tumor-inhibiting Basidiomycetes, isolation and cultivation in the laboratory. *Mycologia* **58**: 511-517.
- Fruton, J.S. and Simmonds, S.(1956): *General Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc. New York.
- 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.
- Ghernati, H.M., Abdeddaim, K. and Guermouche, M.H.(1982): Rapid HPLC methods for the separation and quantitation of a mono-, di- and tri-saccharides mixture and applications. *J. Liq. Chromato.* **5**: 1725-1748.
- Gregory, F.J., Healy, E.M., Agerborg, H.P.K., Jr. and Warren, G.H.(1966): Studies on antitumor substances produced by Basidiomycetes. *Mycologia* **58**: 80-90.
- Hirase, S., Nakai, S., Akatsu, T., Kobayashi, A., Oohara, M., Matsunaga, K., Fujii, M., Kodaira, S., Fujii, T., Furusho, T., Ohmura, Y., Wada, T., Yoshikumi, C., Ueno, S. and Ohtsuka, S.(1976a): Structural studies on the anti-tumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes). I. Fractionation with barium hydroxide. *Yakugaku Zasshi* **96**: 413-418.
- Hirase, S., Nakai, S., Akatsu, T., Kobayashi, A., Oohara, M., Matsunaga, K., Fujii, M., Kodaira,

- S., Fujii, T., Furusho, T., Ohmura, Y., Wada, T., Yoshikumi, C., Ueno, S. and Ohtsuka, S.(1976b): Structural studies on the anti-tumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes). II. Structures of β -D-glucan moieties of fractionated polysaccharides. *Yakugaku Zasshi* **96**: 419-424.
- Hjerpe, A., Antonopoulos, C.A., Classon, B., Engfeldt, B. and Nurminen, M.(1982): Uronic acid analysis by high-performance liquid chromatography after methanolysis of glycosaminoglycans. *J. Chromatogr.* **235**: 221-227.
- Hjerpe, A., Engfeldt, B., Tseggenidis, T. and Antonopoulos, C.A.(1983): Separation and determination of neutral monosaccharides using methanolysis and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **259**: 334-337.
- Kawamoto, T. and Okada, E.(1983): Separation of mono- and disaccharides by high-performance liquid chromatography with a strong cation-exchange resin and an acetonitrile-rich eluent. *J. Chromatogr.* **258**: 284-288.
- Kim, B.K., Lim, J.H., Yoon, I.H., Park, O.J. and Kim, H.S.(1971): Studies on the constituents of the higher fungi of Korea. *Korean J. Pharmacogn.* **2**: 31-34.
- Kim, B.K., Choi, E.C. and Chi, H.J.(1973): Studies on the constituents of Korea higher fungi(IV), constituents of *Lactarius piperatus*(Fr.) S.F. Gray. *Korean J. Pharmacogn.* **4**: 39.
- Kim, B.K., Shim, M.J., Choi, E.C. and Park, Y.I. (1975): Studies on the culture of ergot fungus(IV), culture of Korean ergot fungus. *Korean J. Pharmacogn.* **6**: 9.
- Kim, B.K., Kim, D.H., Choi, E.C. and Shim, M.J. (1976a): Taxonomic investigations on Korean higher fungi(IV). *Korean J. Mycol.* **4**: 17-25.
- Kim, B.K., Kang, C.Y., Choi, E.C. and Kim, K.H. (1976b): Studies on the constituents of the higher fungi in Korea(VII), sterols from *Daedaleopsis tricolor*(Fr.) Bond. et Sing. *Korean J. Mycol.* **4**: 27-30.
- Kim, B.K., Lee, Y.S., Choi, E.C., Shim, M.J. and Lee, Y.N.(1977): Studies on the constituents of the higher fungi of Korea(VI), amino acids from *Amanita spissacea* and *Amanita vaginata*. *Korean Biochem. J.* **10**: 47-58.
- Kim, B.K.(1978a): Taxonomic investigations on Korean higher fungi(V). *Yakhak Hoeji* **22**: 91-44.
- Kim, B.K., Lee, M.H. and Shim, M.J.(1978b): Studies on the constituents of the higher fungi of Korea(IX), fatty acids from *Agaricus bisporus*. *Korean J. Mycol.* **6**: 5-8.
- Kim, B.K., Jang, S.Y. and Shim, M.J.(1978c): Studies on the constituents of the higher fungi of Korea(VIII), sterols of *Coriolus versicolor*(Fr.) Quel. *Korean J. Mycol.* **6**: 1-4.
- Kim, B.K., Park, E.K. and Shim, M.J.(1979a): Studies on the constituents of higher fungi of Korea(XXIII), antineoplastic activities of *Coriolus versicolor*(L. ex Fr.) Quel., *Pleurotus ostreatus*(Fr.) Kummer and *Lentinus edodes*(Berk.) Sing. *Arch. Pharm. Res.* **2**: 145-151.
- Kim, T.B., Lee, K.B., Joo, C.N., Kim, D.H., Lee, S. S., Kim, Y.S., Park, I.W. and Lee, S.Y.(1979b): *Experimental Biochemistry*, Tamgoodang, Seoul, Korea, 226.
- Kwon, T.J., Park, D.W., Lee, C.O., Kang, C.Y. and Kim, B.K.(1980): Studies on the constituents of higher fungi of Korea(XXI), a sterol from *Calvatia saccatum*(Vahl.) Fr. *Korean J. Mycol.* **8**: 25-28.
- Lee, J.Y., Lee, Y.W. and Lim, J.H.(1959): *Illustration of Fungi of Korea*, Baemungak, Seoul, Korea, 101.
- Maeda, Y. and Chihara, G.(1971): Lentinan, a new immunoaccelerator of cell-mediated responses. *Nature* **229**: 634.
- Neal, J.M., Benedict, R.G. and Brady, L.R.(1968): Interrelationship of phosphate nutrition, nitrogen metabolism and accumulation of key secondary metabolites in saprophytic cultures of *Psilocybe cubensis*, *Psilocybe cyanescens* and *Panaeolus campanulatus*. *J. Pharm. Sci.* **57**: 1661-1667.
- 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.
- Ohno, R., Imai, K., Yokomaku, S. and Yamada, K. (1975): Antitumor effects of protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, against 3-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma in C57BL/6 mice. *Gann* **66**: 679-681.
- Ohno, R., Yokomaku, S., Wakayama, K., Sugiura, S., Imai, K. and Yamada, K.(1972): Effect of protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, on the immune response of mice to sheep

- red blood cells. *Gann* **67**: 97-99.
- Park, E.K., Choi, E.C. and Kim, B.K.(1979): Studies on the constituents of higher fungi of Korea(XXIV), chemical analysis of antineoplastic components of *Coriolus versicolor*(L. ex Fr.) Quel., *Pleuroteus ostreatus*(Fr.) Kummer, and *Lentinus edodes*(Berk.) Sing. *Arch. Pharm. Res.* **2**: 153-157.
- 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 Stevens, J.A.(1960): Calvacin, a new antitumor agent. *Science* **23**: 1897.
- Shim, M.J.(1980): Studies on constituents and culture of the higher fungi of Korea(XXV), stimulatory effects of *Coriolus versicolor* constituents on immune response. *Korean J. Mycol.* **8**: 115-116.
- Shim, M.J.(1981): Studies on constituents and culture of the higher fungi of Korea. *Korean J. Mycol.* **9**: 49-66.
- Tsukagoshi, S. and Ohashi, F.(1974): Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann* **65**: 557-558.
- Wade, N.L. and Morris, S.C.(1982): Rapid determination of sugars in cantaloupe melon juice by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **240**: 257-261.
- Yoshioka, Y., Sano, T. and Ikekawa, T.(1973): Studies on antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes*(Curt. ex Fr.) Sing. *I. Chem. Pharm. Bull.* **21**: 1772-1776.

Accepted for Publication 11 August