

## 영지 IY009 균사체의 분획에 따라 추출된 ganoderan의 조성과 생리적 활성

한만덕\* · 정 훈<sup>1</sup> · 이준우<sup>1</sup> · 백성진<sup>1</sup> · 김수웅<sup>1</sup> · 윤경하

순천향대학교 생물학과

<sup>1</sup>일양약품 중앙연구소 생물공학연구소

### The Composition and Bioactivities of Ganoderan by Mycelial Fractionation of *Ganoderma lucidum* IY009

Man-Deuk Han\*, Hoon Jeong<sup>1</sup>, June-Woo Lee<sup>1</sup>, Sung-Jin Back<sup>1</sup>,  
Su-Ung Kim<sup>1</sup> and Kyung-Ha Yoon

Department of Biology, Soonchunhyang University, Chungnam, 347-400

<sup>1</sup>Biotechnology Lab. Il Yang Pharm. Co., Ltd. Kyunggi, 449-900, Korea

**Abstract:** Ganoderan, an immunomodulating  $\beta$ -glucan of *G. lucidum*, induces potent antitumor immunity in tumor-bearing mice. The present study was set up to elucidate the chemical composition and bioactivities of ganoderan obtained from the mycelial fractionation of *G. lucidum* IY 009. Ganoderan was isolated and purified from its extracellular, cell wall and cytoplasmic sources. These ganoderans were composed mainly of glucose. The cell wall-alkali soluble-water soluble fraction (CW-AS-WS) showed the highest antitumor activity (inhibition rate of 94%) in sarcoma-bearing mice and 37% of anticomplementary activity. The CW-AS-WS fraction was found to be approximately average 20,000 dalton in aq. 0.3N NaOH solution and composed of 88% carbohydrate and 4% protein. The carbohydrate of the CW-AS-WS was composed of 74% glucose. These results indicate that the ganoderans extracted from the mycelial fractionations of *G. lucidum* IY009 had different chemical characteristics and showed different potentiality in antitumor and anticomplementary activity.

**KEY WORDS:** *Ganoderma lucidum*, ganoderan, polysaccharide, antitumor activity, anticomplementary activity, mycelial fractionation

진균류에 존재하는  $\beta$ -glucan성 다당류의 일부는 항암성이 있을 뿐만 아니라 기능적인 중합체로서 약학적, 산업적으로 이용될 수 있는 고분자이다 (Franz, 1989). 또한 이들의 연구는 진균류 균사체의 발생, 세포벽의 합성, 형태 형성 등을 이해하는데 필요하며, 항진균 제제를 설계하는데 매우 중요하다 (Burnett 및 Trinci, 1979).

고등진균류의 다당류는 균사체외로 분비하는 세포외성, 세포골격을 구성하는 세포벽성, 그리고 세포내에 저장성 형태로 존재하는 세 가지로 구분할 수

있다. Siehr(1976)는 치마 버섯의 세포벽을 구성하는 성분을 알칼리 가용성(S-glucan)과 알칼리 불용성(R-glucan) glucan으로 구분하였다. S-glucan은 (1-6)- $\alpha$ -D-glucan으로 약간 분지된 (1-3)- $\alpha$ -D-glucan이며 xylose와 mannose로 이루어져 있으며, R-glucan의 경우 chitin과 단백질이 결합된 (1-3)- $\beta$ -, (1-6)- $\beta$ -D-glucan인 것으로 보고하였다 (Sieta *et al.*, 1977). 또한 담자균류는 균사체 생장 시 점액성 물질로 균사체 외각을 덮는데, 이는 (1-3)- $\beta$ - 및 (1-6)- $\beta$ -glucan의 구조를 갖는 mucilage로써 균사체 세포벽을 통과하여 이용될 수 있고, 배양액 내로 분비되어 배지의 gelation을 유도시키기

\*Corresponding author

도 한다(Hunsley and Burnett, 1970). 균체의외성이며 수용성인 다당류는 Bush 및 Horisberger(1972)에 의해 그 구조가 연구되었는데, 장기간 배양된 균사체의 경우는 배지로 분비되는 수용성 glucan의 양이 감소되는 것으로 보고되었다. 이는 균사체로부터 (1→3)- $\beta$ -glucanase가 균체의외로 분비되어 수용성 균체의 다당류를 분해시키기 때문이며 분해된 산물들은 세포벽성 다당류 합성에 재사용된다(Neiderpruem *et al.*, 1978). 실제로 배지 내 포도당이 고갈되면 R-glucan과 S-glucan이 다소 증가되는 것이 관찰되었다(Wessels, 1969). Shida 등(1981)이 역시 표고버섯의 알칼리 불용성 glucan에 관하여 보고하였는데, 알칼리 불용성인 세포벽 glucan은 chitin과 밀접하게 공유 결합되어 있는  $\beta$ -1,3 및  $\beta$ -1,6 결합의 다당류임을 규명하였다. 이와 같이 담자균류의 다당류는 세포의 기원과 위치에 따라 물성이 다양하고, 그 양적 차이가 있으므로, 산업적 이용에 앞서 이에 대한 선행적 연구가 요구된다.

따라서 항암활성이 있는 영지 균사체성 다당류(강 등, 1981; Kim *et al.*, 1993)의 세포분획적 연구는 균사체의 형태 형성 및 구성 다당류의 고분자적 특성 뿐만 아니라 우수한 생리적 활성 다당류를 얻는데 많은 정보를 줄 수 있다. 본 연구에서는 영지 균사체를 완전 배지 내에서 배양하고, 균사체로부터  $\beta$ -glucan성 다당류인 ganoderan을 세포외성, 세포벽성 및 세포질 저장성으로 분획하여 화학적 조성 및 생리적 활성 정도를 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 일양약품(주)에서 보유하고 있는 *G. lucidum* IY 009의 균사체이며, 보관용 배지는 potato dextrose agar 배지를 사용하였다. 배양용 배지는 2% soluble starch, 0.2% yeast extract, 0.5%  $K_2HPO_4$ , 0.001%  $KH_2PO_4$ , 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 이 포함된 IYSM 배지(Han *et al.*, 1992) 성분중 soluble starch 대신 포도당을 첨가하여 이용하였다.

### 시약

실험에 사용한 대조 glucan은 laminarin( $\beta$ -(1→3)-D-glucan), mannan, yeast's zymosan A 및  $\beta$ -glucan으로 Sigma사에서 구입했고, 단백질 정량을 위한 kit는 Pierce사의 것을 사용하였다.

### 실험동물 및 종양세포

마우스는 20~25 g의 ICR계 웅성으로 삼육축산으로부터 구입하여 사용하였다. 마우스의 사육 조건으로 실험동물실 온도는  $22 \pm 2^\circ C$ , 습도는 55~60%로 유지하였으며 마우스용 고품 사료와 물을 제한없이 공급하였다. Sarcoma 180은 한국세포주은행으로부터 분양 받아 사용하였다.

### 균사체 배양

가용성 전분 대신에 포도당이 포함된 IYSM 배지를 발효조(Marubishi, MD300)에 넣고, pH 4.5로 조정 후 2기압에서 20분간 고압 멸균하였다. 여기에 potato dextrose broth에서 전 배양한 *G. lucidum* IY009 균사체를 10%(v/v) 접종하였다. 이때 working volume은 3L이며, 교반속도는 300 rpm, 통기량은 1 vvm으로 하여  $27^\circ C$ 에서 6일간 배양하였다. 배양중 pH 조정액은 0.5N NaOH, 소포제로는 silicone resin을 사용하였다.

### 균사체 분획을 통한 ganoderan의 추출

균사체 분획화를 통한 ganoderan의 추출은 다음과 같은 방법으로 행하였다. 6일간 배양된 3L의 균사체액을 1.5L로 각각 나누어 단계별 추출 및 분리 과정을 거쳤으며 최종 수율 계산시 평균하였다. 1.5L 배양액은  $3000 \times g$ 에서 1차 원심분리하여 균사체와 배양여액으로 분리하였다. 침전된 균사체는 생리 식염수로 수세하고 다시 원심분리하여 상등액을 1차 원심분리 상등액과 혼합시켰다. 균체의외성 ganoderan(EXO)을 얻고자 원심분리 상등액에 3배량(v/v)의 에탄올을 가하여 다당류를 침전시켰고, 일부는 TCA(trichloroacetic acid)를 최종 10%(w/v)가 되도록 가하여 단백질을 침전시켜 제거한 후, 상등액에 에탄올을 가해 다당류를 침전시켰다. 세포벽성 및 세포질성 ganoderan을 분리하기 위하여 수세된 균사체를 homogenizer에 넣고 10,000 rpm에서 5분 동안 균사체를 분쇄시켰다.

분쇄된 균사체를 다시 초음파로 처리한 후, glass bead를 넣어 다시 파쇄시켰다. 최종 파쇄된 균사체는 위상차 현미경을 통해 완전 파쇄 여부를 확인한 후, 초 고속원심분리기(Beckman XL-90)로 15,000×g에서 15분간 원심분리하여 균사체 세포벽 성분 및 세포질액으로 분리하였다. 세포질성 ganoderan(CYTO)을 얻기 위하여 원심분리 상등액에 에탄올을 가하여 다당류를 침전시켰다. 세포벽성(CW) ganoderan의 경우, 상층액이 제거된 원심분리 침전물을 생리식염수로 2회 세척한 후, NaOH를 가하고(최종 2N) 실온에서 12시간 동안 교반하여 알칼리 가용성(AS) 분획을 추출하였다. 추출액에 빙초산을 가하여 중화시킨 후, 원심분리(3000×g)하여 알칼리 가용성(AS) 및 불용성(AI) 분획으로 다시 분리하였고, 이에 에탄올을 가하여 다당류를 침전시켰다. 이상과 같이 에탄올에 침전된 모든 균사체 분획성 다당류들은 원심분리(6000×g)를 통하여 수획하고, 이에 소량의 증류수를 가한 다음 dialysis membrane bag(M.W cut off: 10,000)에 넣어 흐르는 탈이온수에서 5일 동안 투석시켰다. 투석된 분획들은 6000×g에서 원심분리하여 수용성(WS) 분획과 비수용성(WI) 분획으로 구분한 다음 동결건조하여 각각의 균사체 분획성 ganoderan을 얻었다.

### 당, 단백질 및 hexosamine의 분석

균사체 부위에 따라 추출된 ganoderan의 당 함량은 페놀-황산법(Chaplin and Kennedy, 1986), 단백질의 함량은 BCA protein assay kit(Pierce 사)를 사용하여 측정하였다(Smith *et al.*, 1985). 다당류를 구성하는 단당류와 구성 아미노산 분석은 전보문(한 등, 1995)과 동일한 방법으로 실행하였다.

### LAL Kit를 이용한 $\beta$ -glucan 확인

Limulus test는 LPS뿐만 아니라 (1→3)- $\beta$ -D-glucan에 의해서도 특징적으로 gel화가 일어난다(Kakinuma *et al.*, 1981). 세포분획에 따라 분리된 ganoderan 내의  $\beta$ -glucan의 양을 추정하고자 LAL kit(Kinetic-QCL™, 192 Test Kit, Biowhitaker Co.)를 이용하여 전보문(한 등, 1995)과 동일한 방법으로 측정하였다.

### IR Spectrum

소량의 ganoderan에 400배의 potassium bromide를 첨가하여 잘 분쇄시킨 후, disc를 만들고 FT-IR(Bruker, IFS-48)을 이용하여 측정하였다. 각 시료당 8번 scanning하여 Infrared spectrum을 측정하였다.

### 분자량 분포

균사체 분획에 따라 얻은 ganoderan의 평균 분자량 분포는 전보문(한 등, 1995)과 동일한 방법으로 실행하였다.

### 전기 영동

면역 전기영동은 Shimura(1983)의 방법을 변형하여 행하였다. 6.25 mM EGTA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>가 함유된 GVB<sup>2-</sup> buffer에 시료를 녹인 후(2.5 mg/ml), 25  $\mu$ l를 취해 normal human serum 75  $\mu$ l과 혼합하여 37°C의 수조에서 30분 동안 반응시켰다. 1차 전기영동은 1% agarose, tricine veronal buffer(25 mM, pH 8.6)를 사용하여 초기 전개 조건은 2.1 mA/cm에서 110분간 전개하였으며, 2차 전기영동은 1차 전기영동한 gel을 일정하게 잘라서 다른 plate에 옮기고 2.5%(v/v)의 antihuman whole serum이 함유된 1% agarose에서 plate를 만든 후, 4.2 mA로 4시간 동안 행하였다. 전개된 gel은 Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색한 후 native C3의 분해산물인 3rd peak를 관찰하였다.

### 항보체 활성 및 항암 활성

균사체 분획에 따라 추출된 ganoderan의 생리활성능을 알아보기 위하여 항보체 활성 및 항암활성 실험을 수행하였다. 실험방법은 전보문(한 등, 1995)과 동일한 방법으로 실행하였다.

## 결 과

### 세포분획에 따른 ganoderan의 수율

영지의 균사체를 세포분획에 따라 세포벽성, 세포질성 및 세포외성으로 분리하여 추출된 ganoderan은 대부분 백색의 다당류로서, Table 1에 나

**Table 1.** Yields of the ganoderans obtained from mycelial fractionation of *G. lucidum* IY 009

Ganoderan on mycelial fractionation	Recovery (mg/1.5L cultured medium)	% of dry weight
EXO-WS	192.5	2.3
EXO-WI	794.9	9.5
CYTO-WS	136.3	1.6
CYTO-WI	945.0	11.3
CW-AS-WS	253.2	3.0
CW-AS-WI	958.3	11.4
CW-AI-WS	324.5	3.9
CW-AI-WI	4,793.1	57.0
Total	8,397.8	100.0

\*Abbreviations: CW; cell wall, AI; alkali insoluble, AS; alkali soluble, WS; water soluble, WI; water insoluble, CYTO; cytoplasmic, EXO; extracellular ganoderan

Results are the mean of two independent experiments done in duplicate.

타낸 바와 같이 총 건중량 8.4 g/1.5L을 얻었다. 수확된 총 ganoderan 가운데 세포외성(EXO)은 11.8%(987.4 mg/1.5L), 세포질성(CYTO)은 12.9%(1081.3 mg/1.5L), 및 세포벽성(CW)은 75%(6329.1 mg/1.5L)의 비율로 각각 수확되었다. 세포외성(EXO) 분획의 경우, 비수용성(EXO-WI)은 795 mg/1.5L로 193 mg/1.5L의 수용성(EXO-WS)보다 4.1배 더 많이 수확되었다. 세포분획성 ganoderan 가운데 균사체 세포벽(CW)으로부터 분리된 알칼리 불용성(AI)이며 비수용성(WI)인 CW-AI-WI 분획은 총 균사체성 ganoderan 가운데 57%의 비율로 가장 많은 부분을 차지하였다.

#### 총 탄수화물, 단백질 및 hexosamine 함량

균사체 분획을 통해 얻은 ganoderan의 총 탄수화물, 단백질 및 hexosamine의 함량은 Table 2에 나타내었다. EXO-WS 분획의 경우, 추출 및 분리 과정 중 TCA를 처리하지 않고 추출 분리된(EXO-WS-No TCA) 분획의 경우 탄수화물의 함량이 75.8%였으나, TCA를 처리하면(EXO-WS-TCA) 약 15% 정도 증가된 90.9%의 함량을 나타내었다. 균

**Table 2.** Total carbohydrate, protein and hexosamine contents of the ganoderans obtained from the mycelial fractionation of *G. lucidum*. IY009

Cell fraction	Total carbohydrates (%)	Total protein (%)	Hexosamine (%)
EXO-WS(TCA)	90.9	4.9	0.24
EXO-WI(TCA)	85.2	8.0	0.1<
EXO-WS(No TCA)	75.8	8.4	0.69
EXO-WI(No TCA)	68.9	14.7	0.36
CYTO-WS	86.6	11.6	0.80
CYTO-WI	54.1	11.5	0.72
CW-AS-WS	88.1	4.2	0.1<
CW-AS-WI	85.8	12.9	0.60
CW-AI-WS	52.4	8.2	0.1<
CW-AI-WI	62.5	6.3	10.2
$\beta$ -glucan	90.0	1.4	3.2
Mannan	98.0	1.0	0.6
Laminarin	99.0	0.5	0.1<
Zyimosan A	90.0	9.0	0.9

\*Abbreviations: CW; cell wall, AI; alkali insoluble, AS; alkali soluble, WS; water soluble, WI; water insoluble, CYTO; cytoplasmic, EXO; extracellular, TCA: treated with TCA, No TCA; Not treated with TCA

Results are the mean of three independent experiments done in duplicate.

사체의 세포질(CYTO)로부터 얻은 수용성(CYTO-WS) 분획은 86.6%의 탄수화물로 구성되어 있는 반면, 비수용성(CYTO-WI)은 54.1%의 낮은 탄수화물을 함유하고 있었다. 세포벽성(CW) 분획의 경우, 알칼리 가용성(CW-AS) 분획이 불용성(CW-AI) 분획보다 탄수화물의 양이 더 많았고, 단백질에는 별 차이가 없었다. 균사체 분획성 ganoderan의 hexosamine은 대부분 1% 미만이었으나, CW-AI-WI에서는 10.2%를 포함하고 있었다.  $\beta$ -glucan성 다당류의 대조 물질로 사용한  $\beta$ -glucan, mannan, laminarin 및 zyimosan A(Sigma Co.)의 탄수화물의 함량은 모두 90% 이상이었으며, 단백질의 함량은 1.4% 이하였으나 zyimosan A의 경우, 비교적 많은 9%의 단백질이 포함되어 있었다.

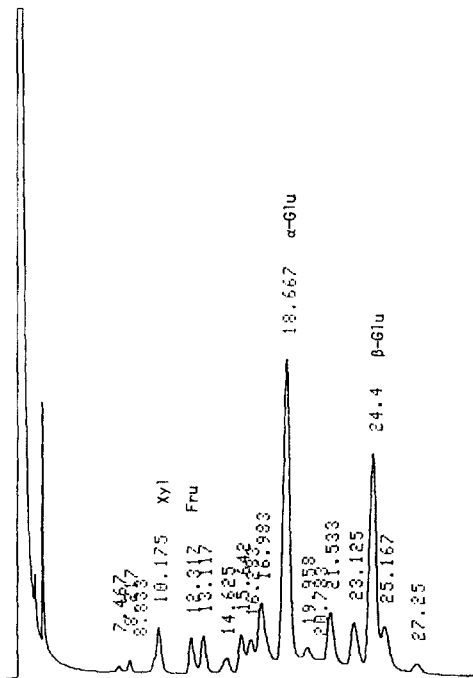
#### 구성당 함량

균사체 분획성 ganoderan의 구성 단당류는

**Table 3.** Monosaccharide content (%) of the ganoderans obtained from the mycelial fractionations of *G. lucidum* IY009

Ganoderan	Monosugars	Rib	Xyl	Fru	Man	Gal	$\alpha$ -Glu	$\beta$ -Glu
EXO-WS(TCA)		0.6	3.6	4.0	36.1	13.0	26.8	16.0
-WI(TCA)		-	-	-	4.4	3.9	39.4	52.3
EXO-WS(No TCA)		0.4	2.0	1.9	55.9	12.6	20.2	7.1
-WI(No TCA)		-	-	-	-	-	41.8	58.2
CYTO-WS		-	7.8	-	22.5	24.8	37.0	8.0
-WI		-	-	-	9.4	14.0	34.2	42.3
CW-AS-WS		0.7	6.8	8.9	4.7	4.8	38.8	35.3
-WI		-	1.5	3.2	1.4	2.8	37.1	54.1
CW-AI-WS		-	3.6	5.4	4.2	2.9	34.0	45.0
-WI		1.2	5.1	9.6	2.9	4.0	31.7	48.5
$\beta$ -Glucan		-	0.7	4.0	1.1	2.9	37.6	53.8
Mannan		-	-	9.7	88.7	-	1.6	-
Laminarin		-	-	2.2	-	8.1	42.7	47.0
Zyosan A		0.6	-	-	37.0	1.4	25.7	35.3

\* Abbreviations: EXO; extracellular, TCA; treated with TCA, No TCA; not treated with TCA, CW; cell wall, AS; alkali soluble, AI; alkali insoluble, WS; water soluble, WI; water insoluble. Results are the mean of two independent experiments done in duplicate.



**Fig. 1.** G.L.C. pattern and monosaccharide composition of the ganoderan-CW-AS-WS fraction. This ganoderan was obtained from the cell wall of *G. lucidum* IY009.

Table 3에서 보는 바와 같다. 포도당이 주요 구성당이었으며, 대부분의 경우 비 수용성 분획(WI)이 수용성 분획(WS)보다 포도당의 함량이 많았다. 대조 다당류인 mannan은 89%가 만노오스로 구성되어 있었으며, laminarin은 90%의 포도당, 그리고  $\beta$ -glucan은 91%의 포도당으로 구성되어 있었다. 균체의성인 EXO-WI 분획은 90% 이상이 포도당으로 구성되어 있었으며, EXO-WS는 상대적으로 만노오스의 함량이 많았다. 특히 추출 및 분리 과정에서 TCA를 가하지 않은 EXO-WS(No TCA)의 만노오스 함량은 55.9%이었으나, TCA를 가해 단백질을 부분적으로 제거시킨 EXO-WS(TCA)의 만노오스 함량은 36.1%로 감소되었다. 세포질에서 분리된 CYTO-WS와 CYTO-WI는 갈락토오스 함량이 다른 균사체 분획 보다 상대적으로 많았다. 세포벽에서 분리된 CW-AS와 CW-AI 분획의 구성당은 약 65~93%의 포도당으로 구성되어 있고, 만노오스와 갈락토오스는 5%를 포함하고 있었다(Fig. 1).

**구성 아미노산**

균사체 분획을 통하여 얻은 ganoderan 내에는 5~14% 내외의 단백질이 포함되어 있었다(Table

Table 4. Amino acid contents (%) of the ganoderans on the mycelial fractionation of *G. lucidum* IY009

Gnoderans	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Try	Phe	His	Lys	Arg
EXO-WS(TCA)	6.0	16.0	26.8	26.8	4.2	8.6	8.7	2.9	0.5	3.9	3.3	0.9	2.0	1.4	2.0	4.9
EXO-WI(TCA)	8.3	10.0	10.0	10.0	4.7	9.9	9.8	7.9	0.9	4.1	5.0	2.5	4.2	0.1	2.1	13.9
EXO-WS(No TCA)	11.2	11.4	13.1	13.1	6.0	10.2	9.5	5.9	0.6	4.6	6.2	2.4	4.0	1.0	2.5	2.2
EXO-WI(No TCA)	11.4	11.1	10.5	10.5	5.4	11.0	9.8	7.3	0.2	4.4	6.2	3.2	5.0	0.6	2.6	3.2
CYTO-WS	8.5	12.0	20.2	20.2	5.9	9.2	11.8	4.1	0.6	3.9	4.8	1.2	2.8	1.1	2.9	2.7
CYTO-WI	11.9	9.2	8.9	8.9	6.5	9.5	9.8	6.8	0.8	4.6	7.3	3.7	5.3	0.9	3.9	2.4
CW-AS-WS	15.1	5.4	7.4	7.4	5.1	9.7	8.9	3.5	ND	6.4	5.6	2.5	3.3	0.7	3.5	10.0
CW-AS-WI	11.1	6.5	6.4	6.4	5.8	9.5	11.7	8.3	0.8	0.7	10.5	3.2	5.6	1.0	5.1	3.1
CW-AI-WS	11.5	7.1	6.5	6.5	5.6	9.0	10.7	8.1	0.7	6.2	9.2	2.4	5.5	1.0	4.2	2.7
CW-AI-WI	6.6	4.0	4.8	4.8	3.7	6.8	7.0	5.4	ND	32.7	10.2	2.4	4.1	0.7	2.5	3.3
Mannan	3.8	1.2	ND	ND	ND	2.8	2.8	ND	ND	4.8	ND	ND	ND	ND	ND	72.4
Laminarin	21.3	0.7	1.2	1.2	5.0	6.8	9.2	5.6	ND	8.2	6.9	ND	2.0	0.2	5.4	18.4
$\beta$ -glucan	4.8	2.4	3.0	3.0	2.3	3.7	4.1	2.7	ND	51.4	10.2	ND	1.7	0.1	1.4	8.0
Zyosan A	7.0	5.6	7.3	7.3	33.5	5.9	11.4	2.4	1.2	2.8	3.7	1.7	1.9	0.7	3.8	2.5

\* Abbreviations: EXO; extracellular, TCA; treated with TCA, No TCA; not treated with TCA, CW; cell wall, AS; alkali soluble, AI; alkali insoluble, WS; water soluble, WI; water insoluble, ND; not determined. Results are the mean of two independent experiments done in duplicate.

2). 이와 같은 단백질의 구성 아미노산은 Table 4와 같다. 균체의 분비성 분획인 EXO-WS(TCA)는 주로 Ser(26.8%)과 Thr(16%)으로 구성되어 있었으며, EXO-WI(TCA)의 경우, Arg(13.9%), Thr(10%) 및 Ser(10%)이 주요 구성 아미노산이었다. 그러나 정제 과정 중 TCA를 처리하지 않은 EXO-WS-No TCA 분획은 Ser(13.1%), Thr(11.4%), Asp(11.2%) 그리고 Gly(10.2%)이 주요 아미노산이었으며, EXO-WI-No TCA의 경우, Asp(11.4%), Thr(11.1%) 및 Gly(10.5%)이 주 구성 아미노산이었다. 즉, TCA를 가하면 Asp, Gly 및 Pro과 같은 구성 아미노산이 상대적으로 감소되는 것으로 나타났다. 세포질성 분획 가운데 CYTO-WS의 구성 아미노산은 Ser(20.2%), Glu(20.2%) 및 Thr(12%)이 주 구성 아미노산이었으며, CYTO-WI의 경우, Asp(11.9%)이 가장 많은 농도로 검출되었다. 세포벽성 분획의 경우, CW-AS-WS의 단백질은 Asp(15.1%), Arg(10%) 및 Gly(9.7%)이 주요 구성 아미노산이었고(Fig. 2), CW-AS-WI의 경우, Ala(11.7%), Asp(11.1%), Leu(10.5%)이 주요 아미노

산이었다. CW-AI-WI의 경우, 32.7%의 Ile과 10.2%의 Leu이 존재하는데, 이는 다른 분획들과 비교해 볼 때 매우 많은 양이었다. 대조 시료로 실험에 사용한  $\beta$ -glucan성 다당류 가운데, mannan<sup>®</sup>은 많은 아미노산들이 결합되어 있는 반면에 Arg이 대부분을 차지하는 특이성을 보였고,  $\beta$ -glucan인

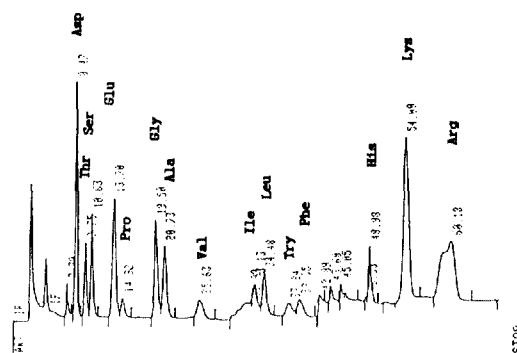


Fig. 2. Amino acid composition of the ganoderan-CW-AS-WS fraction. This ganoderan was obtained from the cell wall of *G. lucidum* IY009.

Table 5. I.R. spectrum of the ganoderans obtained from the mycelial fractionation of *G. lucidum* IY009

Ganoderan	Main frequencies (cm. <sup>-1</sup> ) of absorption peaks									
EXO-WS(TCA)	3398	1670	1336	1138	1058	836				
-WI(TCA)	3414	1049								
EXO-WS(No TCA)	3403	2931	2361	2339	1656	1648	1529	1052	877	
-WI(No TCA)	3355	3380	2930	1631	1546	1529	1369	1044	891	
CYTO-WS	3419	1720	1687	1665	1648	1547	1529	1460	1342	1070
-WI	3375	1741	1722	1703	1656	1648	1630	1612	1565	1546
	1529	1461	1072	887						
CW-AS-WS	3405	2925	1720	1702	1687	1665	1648	1631	1579	1572
-WI	3387	2919	1720	1702	1687	1656	1648	1642	1562	1546
	1529	1502	1460	1370	1079	892				
CW-AI-WS	3413	2934	1578	1414	1043	1012	923			
-WI	3429	2920	1720	1708	1691	1656	1631	1562	1550	1535
	1460	1377	1037							
$\beta$ -Glucan	3408	2919	1659	1625	1551	1079				
Mannan	3408	1439	1421	1059	975	825				
Laminarin	3432	1631	1144	1122	1088	1054	1042	1020		
Zyosan A	3428	2926	1630	1405	1039	865				

\*Abbreviations: EXO; extracellular, TCA; treated with TCA, No TCA; not treated with TCA, CW; cell wall, AS; alkali soluble, AI; alkali insoluble, WS; water soluble, WI; water insoluble.

laminarin<sup>®</sup>은 21.3%의 Asp와 18.4%의 Arg이 주 구성 아미노산이었다. 느타리버섯에서 추출된 β-glucan<sup>®</sup>은 Ile(51.4%) 및 Leu(10.2%)이 주 구성 아미노산으로 CW-AI-WI와 유사한 양상을 보였다. Zymosan A<sup>®</sup>에 포함되어 있는 단백질의 경우, 33.5%의 Pro과 11.4%의 Ala이 주 구성 아미노산이었다. 알칼리 처리된 세포벽성 ganoderan은 처리하지 않은 세포외성 다당류 및 세포질성 다당류와 비교해 볼 때 Thr의 함량이 2~4배 정도 감소하였다.

**Infra red 스펙트럼**

세포분획에 따라 수획된 ganoderan의 I.R. spectrum은 Table 5와 같다(Fig. 3). EXO-WI (No TCA), CYTO-WI, CW-AS-WI 등의 분획에서는 895±9 cm<sup>-1</sup>에서 main frequency를 보여 β-anomer인 것으로 확인되었다. 그 외 분획의 경우 다른 파장이 상대적으로 흡수 frequency가 강하여 수치화 되지 않았으나, I.R. spectrum 상에서는 관찰할 수 있었다. 또한 대부분의 분획들은 1725~49 cm<sup>-1</sup>, 1648 cm<sup>-1</sup> 부근에서 흡수파장을 보인 것으로 보아 carbonyl group(C=O), acetamido group을 갖고 있었으며, EXO-WS, CYTO-WS, CYTO-WI, CW-AS-WI, β-glucan, mannan, laminarin 등과 같은 분획은 1150~1080 cm<sup>-1</sup>(ring form), 1150~1060 cm<sup>-1</sup>(alkyl ether)에서 main frequency를 나타낸 것으로 보아 ether linkage(C-O-C)를 갖는 다당류임을 알 수 있었다.

**β-glucan 확인**

LAL kit를 이용해 세포분획성 ganoderan 내의 (1→3)-β-D-glucan의 유무를 확인한 결과, Table 6과 같이 모든 분획들은 LAL을 gelation시켰다. 시료의 농도가 2 μg/ml일 때 gelation을 유도하는 반응시간은 589~1257초 이내에 이루어졌으며, 특히 EXO-WS(No-TCA), CYTO-WI 및 CW-AI-WI분획은 5.0 이상의 β-glucan unit를 나타냈다.

**분자량 분포**

균사체 분획성 ganoderan들의 평균 분자량은

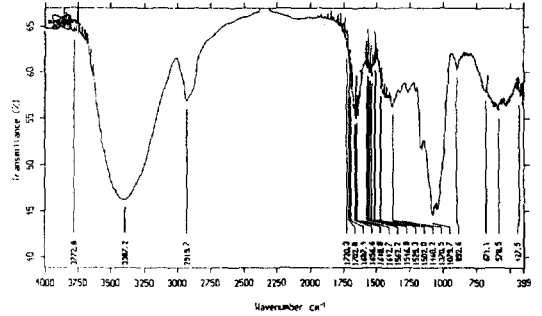


Fig. 3. I.R. spectrum of the ganoderan-CW-AS-WS fraction. This ganoderan was obtained from the cell wall of *G. lucidum* IY009.

Table 6. Estimation of the β-glucan through LAL test by Toxidometer

Ganoderans	Reaction Time (sec.)	β-glucan unit (G.U/ml)
EXO-WS(TCA)	962	2.0
EXO-WI(TCA)	1063	1.3
EXO-WS(No TCA)	589	>5.0
EXO-WI(No TCA)	1137	0.9
CYTO-WS	803	4.4
CYTO-WI	725	>5.0
CW-AS-WS	1177	0.8
CW-AS-WI	1257	0.6
CW-AI-WS	1253	0.6
CW-AI-WI	724	>5.0
β-glucan	779	>5.0
Laminarin	844	3.5

\*Abbreviations: EXO; extracellular, TCA; treated with TCA, No TCA; not treated with TCA, CW; cell wall, AS; alkali soluble, AI; alkali insoluble, WS; water soluble, WI; water insoluble. G.U; β-glucan unit

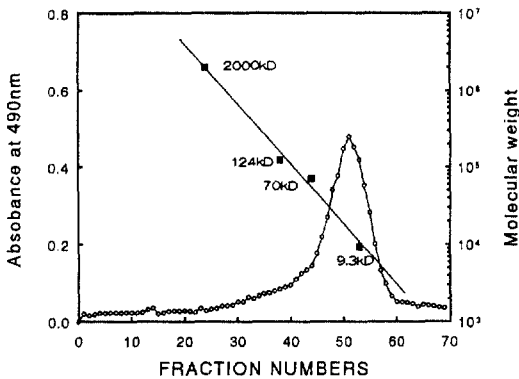
Table 7과 같이 수용성(WS) 분획의 경우 11~40 kD 범위의 분자량 분포를 갖는 다당류이었다. 즉, TCA를 가하여 조제한 EXO-WS(TCA)는 11 kD였고, TCA를 처리하지 않은 EXO-WS(No TCA)는 40 kD의 평균 분자량을 갖는 것으로 보아 단백질이 다당류의 중합도에 큰 영향을 미치는 것으로 보여진다. CW-AS-WS는 20 kD의 평균 분자량을 나타냈으나(Fig. 4), CW-AI-WS는 주로 3000 kD 이상의 고분자들과 35kD 등의 분자량을 갖는 불규칙한



**Table 7.** Average molecular weights of the mycelial ganoderans of *G. lucidum* IY009.

Ganoderans	Molecular weight (Average, kD)
EXO-WS(TCA)	14
EXO-WI(TCA)	60, 1000
EXO-WS(No TCA)	40
EXO-WI(No TCA)	>3000, 300
CYTO-WS	12
CYTO-WI	250, 1500, >3000
CW-AS-WS	20
CW-AS-WI	>2500, 1500, 35
CW-AI-WS	>3000, 35
CW-AI-WI	>3000, 50

\*Abbreviations: EXO; extracellular, TCA; treated with TCA, No TCA; not treated with TCA, CW; cell wall, AS; alkali soluble, AI; alkali insoluble, WS; water soluble, WI; water insoluble.

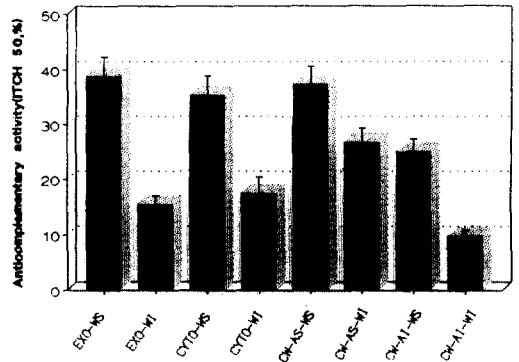


**Fig. 4.** The mean molecular weight of ganoderan-CW-AS-WS. This ganoderan was obtained from the mycelial cell wall fractionation of *G. lucidum* IY009. The volume of each fraction was 2 ml. The elutes were checked by measuring absorbance at 490 nm after phenol-sulfuric acid reaction for carbohydrates.

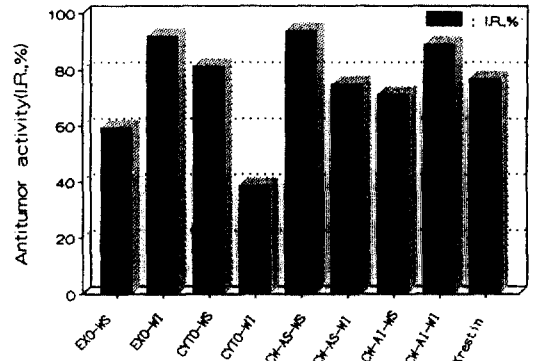
분자량 분포를 나타냈다. 비수용성(WI) 분획의 경우, WS처럼 단일 peak의 평균 분자량 분포를 갖지 않고, 분절화된 분자량 pattern을 갖는 것으로 보였다.

**항보체 활성**

균사체 분획을 통하여 얻은 ganoderan의 항보체 활성을 검색한 결과, Fig. 5와 같다. 항 보체 활성이



**Fig. 5.** Anticomplementary activity of the ganoderan obtained from the mycelial fractionation of *G. lucidum* IY009. Results are the mean  $\pm$  S.D of two independent experiments done in triplicate.



**Fig. 6.** Antitumor activity of the ganoderan obtained from the mycelial fractionation of *G. lucidum* IY009. The results are mean values done in decaplicate.

가장 높게 나타난 분획은 EXO-WS로 38.9%의 활성을 보였다. 역시 활성이 높게 나타난 분획은 37.5%의 CW-AS-WS, 그리고 35.5%의 CYTO-WS 분획이었다.

**항암활성**

항보체 활성이 검색된 동일한 시료를 sarcoma 180이 서혜부에 이식된 마우스에 20 mg/kg의 용량으로 복강 투여하여 항암활성을 측정한 결과, Fig. 6과 같이 균체의 수용성 분획(EXO-WS)은 59.9%, 비수용성(EXO-WI)은 92.1%의 암저지율을 보였다

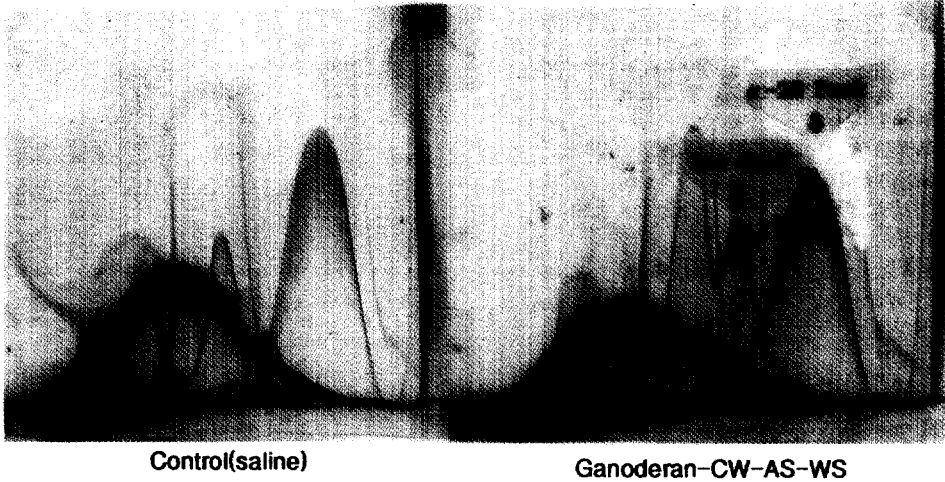


Fig. 7. Crossed immunoelectrophoresis patterns of the normal human serum treated with the ganoderan-CW-AS-WS fraction. This ganoderan was obtained from the mycelial cell wall-alkali soluble and water soluble fractions of *Ganoderam lucidum* IY009. 100  $\mu\text{g/ml}$  of ganoderan-CW-AS-WS reacted with the fresh human serum was run on the 1% agarose, second run was done on the 1% agarose containing antihuman whole serum. The gel was stained in coomassie brilliant blue R-250 solution. The converted complement C3 (3rd peak) designated by arrow.  $\alpha$ -2M designated  $\alpha$ -2-macroglobulin.

다. 세포질성인 CYTO-WS의 고탄형 저지율은 81.4%이었으나, CYTO-WI는 38.8%로 비교적 낮은 항암활성을 보였다. 세포벽성(CW)인 CW-AS-WS는 94%로 항암활성이 가장 높았으며, CW-AI-WI는 89.3%, CW-AS-WI는 75% 그리고 CW-AI-WS는 71%의 암 증식 저지율을 보였다. 또한 현재 일본에서 면역항암제로 시판되는 Kre-stin(protein-bound polysaccharides obtained from *Coriolus versicolor*)은 76.9%의 항암활성을 나타내어 EXO-WI, CYTO-WS, CW-AS-WS, 그리고 CW-AI-WI보다 낮은 항암활성을 보였다.

#### 면역 전기 영동을 통한 보체활성 확인

Shimura 등(1983)에 의하면, 담자균류의 다당류에 의한 항보체 활성 기작은 보체 성분 중 C3의 활성화에 의한 것으로 전기 영동상 3rd peak/ $\alpha$ -2 macroglobulin의 상대적 값이 항 종양 활성을 갖는 다당류의 농도에 비례하여 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서도 항보체 활성이 우수한 CW-AS-WS 분획이 보체의 제 3성분인 C3을 활성화시키는지를 면역 전기 영동으로 확인하였다(Fig. 7). 즉, CW-AS-

WS 분획을 human serum과 반응시켰을 때, 3rd peak인 C3 분해 산물이 대조군 보다 현격히 증가하고, native C3는 감소하는 것으로 보아, CW-AS-WS 분획이 C3를 직접적으로 활성화시키는 것으로 볼 수 있었다.

#### 고 찰

BRM(biological response modifier)으로써 생리적 활성이 있는  $\beta$ -glucan성 다당류는 많은 진균류 및 해조류에 존재하며, 담자균류의 경우 가장 풍부한 다당류이다(水野, 1992).

본 연구에서는 영지 균사체로부터 면역 활성이 우수한  $\beta$ -glucan성 다당류인 ganoderan을 균사체 분획별로 분리하여, 그 조성 및 생리 활성 정도를 알아보았다. De Vries와 Wessels(1973)에 의하면 치마버섯 균사체의 최외각 부분이  $\beta$ -glucan인 mucilage로 덮여 있고, 그 안쪽은 알칼리 가용성의 glucan, 그리고 세포질 막과 인접한 내층은  $\beta$ -glucan이 chitin microfibril과 결합하여 존재한다고 하였다. 또한 Michalenko 등(1976)에 의하면 양송

이의 균사체벽은 43% chitin, 14% KOH-soluble glucan, 27%의  $\beta$ -glucan, 16%의 protein, 그리고 1.5%의 lipid로 구성되어 있다고 보고하였다. 영지의 경우, 균사체 분획에 따라 다당류를 추출 및 분리한 결과, 총 수획된 다당류는 12%의 균체외성(EXO), 13%의 세포질성(CYTO) 및 75%의 세포벽성(CW)으로 구성하고 있어 대부분의 다당류가 세포벽을 구성하였다. 균사체 분획에 따라 분리된 분획물들은 주로 탄수화물로 구성되어 있었으며, 단백질이 대략 5~14%, hexosamine은 보통 1% 내외였다. 그러나 세포벽에서 분리된 CW-AI-WI 분획의 경우, 10% 정도의 많은 hexosamine이 포함되어 있었다. 이는 분획내에 gluacan과 glucoaminoglycan간의 강한 공유적인 결합으로 인해 알칼리 조건하에서 용해되지 않으며(Moll and Wessel, 1987), 균사체의 세포벽 내층을 구성하는 chitin과  $\beta$ -glucan성 다당류간에 견고히 결합에 따라 추출 과정에서 이탈되지 않고 잔존하는 것으로 사료된다. 균사체 분획성 다당류의 구성당 함량은 대부분 포도당이 가장 많이 포함되어 있었으며, I. R spectrum 및 LAL kit로 확인한 결과,  $\beta$ -glucan성이었다. 그러나 균체외성인 EXO-WS 분획의 경우, 많은 양의 만노오스를 포함하고 있었다. 이는 균체외 가용성 다당류가 mannoprotein의 형태로 분비되는 것을 의미하여, 이를 뒷받침할 수 있는 근거로서 EXO-WS 분획 정제 시 TCA를 처리한 분획은 TCA를 처리하지 않고 정제된 것보다 만노오스의 함량이 19.9% 감소되었다. 세포벽성 분획물들은 74~90%가 포도당으로 구성되어 있어 균사체의 세포벽 골격은 포도당의 polymer인 것으로 사료된다. 균류로부터 추출되는 다당류는 물리적 및 효소적 정제과정을 거치지 않는 한 단백질이 부분적으로 결합되어 있다. Andaluz 등(1988)에 의하면, 효모의 glucan은 단백질 acceptor에 결합되어야만 합성이 개시된다고 제시되었으며, 이와 같은 가능성은 yeast cell free extract를 이용하여 *in vitro* 합성된 glucan을 SDS-전기영동에 의해 확인되었다. 영지 균사체를 분획화하여 얻은 ganoderan내 단백질은 균사체 추출 부위에 따라 구성 아미노산은 상이하였는데, 이는 균사체의 특정 부위마다 특이적인 단백질, 다당류에 결합되어 있는 아미노산 서열상의

차이, 그리고 추출과정시 아미노산의 이탈 등에 의한 차이로 추정된다. 이와 같은 아미노산의 차이는 ganoderan의 물성에 많은 영향을 줄 수 있는 것으로 여겨진다(예, 가용성, 비가용성).

이상과 같이 균사체 분획을 통해 얻은 ganoderan의 항보체 및 항암 활성을 검색한 결과, 항보체 활성이 가장 우수한 것은 38.9%의 EXO-WS, 37.5%의 CW-AS-WS 등이었다. 평균 분자량이 20kD인 CW-AS-WS에 의한 항보체 활성 기작을 확인하기 위하여 면역 전기 영동을 실행한 결과, 보체의 제 3성분인 C3의 활성화를 유도시켰다. 항암 효과는 대조 양성 물질인 Krestin(*Coriolus versicolor*)로부터 분리된 단백질 다당류가 76.9%의 억제 효과를 보인 반면에 세포벽에서 추출된 CW-AS-WS 분획은 94%의 항암활성을 나타냈다.

## 적 요

영지의 균사체를 분획화하여  $\beta$ -glucan성 다당류인 ganoderan을 분리한 결과, 12%의 균체외성, 13%의 세포질성, 그리고 75%의 세포벽성 분획으로 각각 수획되었다. 각각의 분획들은 추출 부위와는 상관없이 포도당을 가장 많이 포함하고 있었으며,  $\beta$ -glucan의 특징을 지닌 다당류이었다. Ganoderan의 구성당 및 구성 아미노산은 균사체 추출 부위에 따라 상이한 비율을 나타내었다. 이들의 생리적 활성을 검색한 결과, 항 보체 활성은 균체외성이며 수용성인 EXO-WS 분획이 38%로 가장 우수하였으며, 세포벽에서 추출한 알칼리 가용성이며 수용성인 CW-AS-WS 분획이 37%를 나타내었다. 항암활성은 CW-AS-WS 분획이 가장 우수하였으며 94%의 종양 억제율을 보였다. CW-AS-WS는 평균 분자량 20kD로 80%의 포도당으로 이루어진  $\beta$ -glucan성 다당류이다.

## 參考文獻

- Andaluz, E., Ridruejo, J.C., Ramirez, M., Ruiz-Herrera, J. and Larriba, G. 1988. Initiation of glucan synthesis in yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 251-255.

- Baker, S.A., Bourne, E.J. and Whiffen, D.H. 1956. Use of infrared analysis in the determination of carbohydrate structure. *Methods Biochem. Anal.* 3: 213-245.
- Burnett, J.H. and Trinci, A.P.J. 1979. Fungal wall and hyphal growth. Cambridge University Press, London. U.K. pp. 1-25.
- Bush, D.A. and Horisberger, M. 1972. Structure of a  $\beta$ -D-glucan from the mycelial wall of Basidiomycetes QM 806. *Carbohydrate Res.* 22: 361-367.
- Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. 1986. Carbohydrate analysis: a practical approach. IRL Press. Oxford. England. pp 1-2.
- De Vries, O.M.H. and Wessels, J.G.H. 1973. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by combined action of purified  $\alpha$ -1,3-glucanase and chitinase derived from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Microbiol.* 76: 319-330.
- Franz, G. 1989. Polysaccharides in Pharmacy: Current applications and future concepts. *Planta Medica.* 55: 493-497.
- Han, M.D., Lee, K.H. and Yoon, K.H. 1992. On the mycelial production of *G. lucidum*. *J. Soonchunhyang Univ.* 15(3): 927-933.
- Hunsley, D. and Burnett, J.H. 1970. The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. *J. Gen. Microbiol.* 62: 203-218.
- Kakinuma, A., Asano, T., Torii, H. and Sugino, N. 1981. Gelation of Limulus amoebocyte by antitumor (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 434-439.
- Kim, B.K., Cho, H.Y., Kim, J.S., Kim, H.W. and Choi, E.C. 1993. Studies on constituents of higher fungi of Korea (LX V III). Antitumor components of the cultured mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Pharmacogn.* 24: 203-213
- Michalenko, G.O., Hohl, H.R. and Dorarast. 1976. Chemistry and architecture of the mycelial wall *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 92: 251-262.
- Moll, P.C. and Wessels, J.G.H. 1987. Linkages between glucosaminoglycan and glucan determine alkali-insolubility of the glucans in walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 41: 95-99.
- Neiderpruem, D.J., Marshall, C. and Speth, J. L. 1978. Control of extracellular slime accumulation in monokaryons and resultant dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Sa-bouradia.* 15: 283-289.
- Shida, M., Ushioda, Y., Nakajima, T. and Matsuma, K. 1981. Structure of the alkali-insoluble skeletal glucan of *Lentinus edodes*. *J. Biochem.* 90: 1093-1100.
- Shimura, K., Ito, H. and Hibasani, H. 1983. Screening of host-mediated antitumor polysaccharides by crossed immunoelectrophoresis using fresh human serum. *Japan. J. Pharmacol.* 33: 403-408.
- Siehr, D.J. 1976. Studies on the cell wall of *Schizophyllum commune*. Permethylation and enzymatic hydrolysis. *Can. J. Microbiol.* 54: 130-136.
- Sieta, J.H., Rast, D. and Wessels, J.G.H. 1977. The effect of carbon dioxide on fruiting and on the degradation of a cell-wall glucan in *Schizophyllum commune*. *J. Microbiol.* 102: 385-389.
- Smith, P.K., Krohn, R.L., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B. J. and Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Wessels, J.G.H. 1969. Biochemistry of sexual morphogenesis in *Schizophyllum commune*: Effect of mutation affecting the incompatibility system on cell-wall metabolism. *J. Bacteriol.* 98: 697-704.
- 강창울, 심미자, 최응철, 이영남, 김병각. 1981. 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구-만년버섯의 균사배양 및 항암성분. *한국생화학학회지* 14: 101-112.

한만덕, 이준우, 정훈, 정성균, 이승룡, 윤경하.  
1995. *Ganoderma lucidum* IY009 균사체로부터  
추출된 ganoderan의 항암 및 항보체 활성화에  
미치는 탄소원의 영향. 한국균학회지 **23**: 209-

225.

水野 卓, 川合正允. 버섯의 化學·生化學. 新 日本印  
刷株式會社. 1992. 東京. 日本. pp. 35-87.