

산업용배지 사용에 의한 영지버섯 균주 WK-003 균사체 액체 배양으로부터 생산된 세포외 다당체의 간 보호 효과

양병근 · 전용재 · 정상철 · 김동현 · 하지영 · 윤종원 · 손동환¹ · 고건일¹ · 송치현*

대구대학교 생물공학과, ¹원광대학교 의학자원연구센터

Hepatoprotective Effect of Exo-polysaccharide Produced from Submerged Mycelial Culture of *Ganoderma lucidum* WK-003 by Using Industrial Grade Medium

Byung-Keun Yang, Yong-Jae Jeon, Sang-Chul Jeong, Dong-Hyun Kim, Ji-Young Ha, Jong-Won Yun, Dong-Hwan Shon¹, Geon-Il Go¹ and Chi-Hyun Song*

Dept. of Biotechnology, Taegu Univ., Kyongsan, Kyungbuk 712-714, Korea

¹Medicinal Resources Center, Wonkwang Univ., Iksan, Chunbuk 570-749, Korea

ABSTRACT: The production of hepatoprotective exo-polysaccharide by using synthetic and industrial grade media of the submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* WK-003 was compared. The optimum concentrations of molasses and corn steep liquor (industrial grade) for the production of exo-polysaccharide were 5% and 2.5%, respectively. The productions of the exo-polysaccharide by using a 5 l jar fermenter with industrial grade medium and synthetic medium were 11.2 g D.W./l and 7.2 g D.W./l, respectively. Glutamic pyruvic transaminase (GPT) activities in the serum of intoxicated Sprague-Dawley rats by oral administration of the exo-polysaccharide produced from the industrial grade and synthetic media for 4 consecutive days were decreased from 704 IU/L to 356 IU/L and 704 IU/L to 349 IU/L, respectively.

KEYWORDS: Exo-polysaccharide, *Ganoderma lucidum*, Glutamic pyruvic transaminase, Hepatoprotective effect, Industrial grade medium

예로부터 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 영지 또는 볼로초로 불려져 왔다. 한방에서 자양강장, 소자, 혈중지질 강하, 거담, 관상 동맥의 혈류량 증대, 혈압강하 등의 약리 효과와 면역 증강 효과가 있는 것으로 알려져 있다(안, 1987). 최근에는 암 등의 난치병에도 효과가 있음이 밝혀지고 있으며, 자실체나 균사체 추출물이 체질 개선 및 각종 질병의 예방 효과 등으로 건강 식품이나 의약품의 소재로서 그 용도가 증가하고 있다(Eyal, 1991).

인공 재배에 의한 자실체의 양산과 더불어 1980년을 전후하여 약효에 관한 연구가 많이 진전되었는데, 약효 물질은 triterpenoid 등의 저분자 물질과 단백질이 결합된 다당류인 고분자 물질로 대별된다. 이들 중 저분자 물질은 항염증 작용(Kohda 등, 1985), 간 암세포 성장억제작용(Torev, 1968), 혈압강하작용(Mizuno et al., 1984), 콜레스테롤 합성 억제작용(Komkda et al., 1989), 고지혈증 개선작용(久保 등, 1980), 과산화지질 생성억제작용(木村 등, 1984), 혈소판 응집 저해작용(Sanchez-Hernandez et al., 1990) 등이 있으며, 고분자 물질은 혈압강하작용(이 등, 1983), 혈당강하작용(Hikono et al., 1989), 항암 작용(Lee et al., 1994) 및 간질 환 보호작용(Lui et al., 1979) 등이 있는 것으로 알려지고 있다. 영지로부터 분리한 다당류에 의한 간장질환 치료는

간독성 유발물질에 대한 보호능(이 et al., 1994), 초대배양 간세포 보호능(Lee et al., 1992) 및 간섬유화 억제능(박 등, 1994) 등이 보고되었으나, 이들에 대한 정확한 작용기전은 밝혀지지 않았다. 영지버섯의 액체 배양은 80년대 이후 시도가 되기 시작하였으나(Kang et al., 1981; Sone et al., 1985), 이들 대부분의 연구는 자실체나 균사체 추출물에 대한 성분조사 및 생리활성 탐색에 국한하였다.

따라서 본 연구에서는 합성배지(Song et al., 1998)와 산업용배지에서 생산된 세포외 고분자 물질(exo-polysaccharide)의 간 보호 효과를 비교하여, 간 보호 효과를 지닌 세포외 고분자 물질의 산업적 대량배양 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

자연계로부터 분리한 영지버섯 균주 7종의 액체 배양액으로부터 다당체를 추출하여 간 보호 효과 및 항보체 활성이 강한 균주 WK-003을 선발하여 실험 균주로 사용하였으며, 보관용 배지로는 potato dextrose agar(PDA)를 사용하였고, 다당체 생산용 합성배지의 조성(g/l)은 glucose 9.0, sucrose 9.0, galactose 1.0, xylose 1.0, yeast extract 0.5, bacto peptone 2.0, potato dextrose 2.0, NH₄H₂PO₄ 0.5, DL-

*Corresponding author

Serine 0.5, KH₂PO₄ 1.0, CaCl₂ 0.6, MgSO₄·7H₂O 2.0, FeSO₄·7H₂O 0.02, ZnSO₄·7H₂O 0.02, MnSO₄·5H₂O 0.02, thiamine-HCl 1×10⁻⁴, biotin 1×10⁻³이었고, 산업용 배지의 최적화를 위하여 현재 발효공업에서 산업적으로 주로 사용하고 있는 molasses(Crosby Molasses Co., Canada), corn steep liquor(CSL; Sigma Co., USA)를 선택하여 사용하였다.

접종원

G. lucidum WK-003 균사체를 상기 배지로 준비한 plate에서 30°C로 7일간 배양한 후 직경 8 mm cork borer로 punching하여 사용하거나, 250 ml baffled flask에서 30°C로 7일간 배양한 다음 균사체를 균질화하여 접종원으로 사용하였다.

다당체 회수

상기 배양물을 10,447×g/20 min으로 원심분리하고 상등액을 취하여 4배의 ethanol을 가한 다음 5°C에서 24시간 침전하고, 침전물을 원심분리하여 crude한 exo-polysaccharide를 회수하였다. 회수한 다당체를 냉동건조한 후 증류수에 녹여 72시간 투석하였다. 투석된 시료를 원심분리(10,447×g/20 min)하고 냉동 건조하여 다당체를 얻어 이를 시료로 사용하였다. 다당체의 회수 공정은 다음의 Fig. 1에 나타내었다.

산업용 배지의 최적화

일반적으로 미생물 산업에서 값싼 원료로 사용하고 있는 molasses와 corn steep liquor를 다당류 생산을 위한 배지로 사용하기 위하여 molasses 2~10% 농도로 조절하여 pH 4.5, 120 rpm, 30°C, 8일간 진탕 배양하여 1차 조건을 잡고, 상기 조건에서 잡힌 molasses 농도에 CSL 0.5~3.0%의 농도로 조

절하고 진탕 배양하여 균사체의 최적 농도 및 혼합비를 구하였다. 그리고 조건이 먼저 잡힌 CSL 농도에 molasses 4~9% 농도로 조절하여 균사체 수율과 다당체 생산의 최적 농도 및 혼합비를 구하고, 역으로 조건이 잡힌 molasses 농도에 CSL 1~5% 농도로 조절하여 균사체 수율 및 다당체 생산의 최적 농도 및 혼합비를 구하였다.

발효조 배양

배지가 들어 있는 5 l 발효조를 멸균 (121°C/20 min)하여 실온으로 식힌 후 상기 균주를 접종하여 30°C, pH 4.5, 200 rpm, 1.0 vvm으로 배양하면서 매일 200 ml씩 sampling하여 균사체와 다당체를 정량하여 균사체 생장 곡선과 다당체 생산량을 얻었다.

간 보호 효과

용성 200~250g의 Sprague-Dawley계열 rat(삼육실험동물, 경기도 오산)를 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 다음 실험군을 다음과 같이 분류하였다.

- 1군: 정상 rat에 saline을 투여함.
- 2군: 정상 rat에 세포외 다당(exo-polysaccharide)을 투여함(20 mg/kg, p.o.).
- 3군: CCl₄(0.35 ml/kg, i.p.)로 독성화된 rat에 saline을 투여함.
- 4군: CCl₄(0.35 ml/kg, i.p.)로 독성화된 rat에 세포외 다당을 투여함.

실험기간 동안 사료와 물을 충분히 공급하고 rat의 몸무게는 매일 측정하였다. 실험을 수행하는 동안 12시간의 명암 사이클과 23±2°C를 유지했다. 혈청 GPT(glutamic pyruvic transaminase)와 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase)는 Reitman-Frankel법(Reitman and Frankel, 1957)에 의해 serum transaminase diagnostic kit에 의해 측정하였다. 즉, 기질액 0.5 ml을 37°C에 5분간 방치하여 활성화시킨 다음 혈청을 0.1 ml 가하고 잘 혼합하여 GOT는 60분, GPT는 30분동안 37°C를 유지하였다. 여기에 정색 시액 0.5 ml를 가하고 실온에서 20분간 방치한 다음 0.4N NaOH 5 ml를 가하여 실온에서 10분간 방치한 후 60분 이내에 505 nm에서 증류수를 대조로 하여 흡광도를 측정하였다. 실험에 사용된 혈청은 필요에 따라 생리식염수로 희석하여 사용하였다. 표준 곡선은 혈청대신 표준곡선용 시액을 사용하여 위와 같은 조작을 하여 작성하였다.

통계 처리는 Student's t test에 의해, p value가 최소 0.05 이하인 경우를 유의차로 판정하였다.

결과 및 고찰

산업용 배지의 최적화

실험적으로 영지버섯을 배양하기 위해서 탄소원으로 glucose나 sucrose 등을 사용하며, 질소원으로 peptone이나 yeast extract를 이용하나(Kang et al., 1981), 산업적으로 용

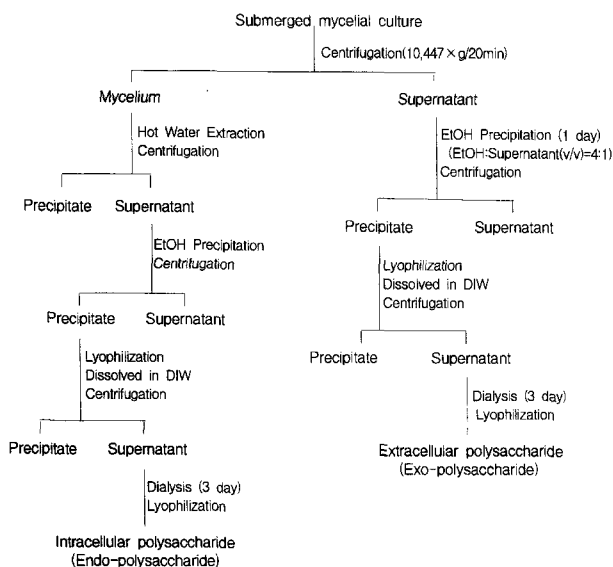


Fig. 1. Recovery process of exo- and endo-polysaccharide from the submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* WK-003

Table 1. Optimization of molasses concentration for the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* WK-003

Molasses concentrations (%)	Dry weight of mycelium (g/l)
2.0	0.375±0.0285
4.0	0.703±0.0105
6.0	1.220±0.0210
8.0	2.900±0.2970
10.0	1.920±0.3465

Condition: Shaken flask cultivation, 30°C, 120 rpm, pH 4.5, 1% inoculum, 8 days.

용하기 위해서 대량 배양할 경우, 배지의 비용을 절감하기 위해서 새로운 배지의 개발이 필요하다. 본 연구는 설탕 가공 부산물인 당밀(molasses)을 탄소원으로, corn steep liquor를 질소원으로 하여 *G. lucidum* WK-003 균사체를 액체배양한 후, 건조 균체와 세포외 다당체의 양을 비교하여, 이들의 산업적 응용 가능성을 검토하였다. molasses와 CSL 혼합배지 농도를 구하기 위하여 먼저 탄소원인 molasses만을 사용했을 때 농도가 8%에서 균사체 수율이 2.9 g/l로 최대로 나타났다(Table 1).

질소원인 CSL을 molasses 8%와 혼합한 농도는 2.5%에서 최대의 균사체 생산(10.525 g/l)을 나타내었다(Table 2).

Table 2. Optimization of CSL concentration for the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* WK-003 on the basis of 8.0% molasses

CSL concentrations (%)	Dry weight of mycelium (g/l)
0.5	6.353±0.3120
1.5	9.316±0.6010
2.0	9.675±0.4275
2.5	10.525±0.0320
3.0	9.160±0.8625

Condition: Shaken flask cultivation, pH 4.5, 120 rpm, 30°C, 1% inoculum, 7 days.

Table 3. Optimization of molasses concentration for the mycelial growth and exo-polysaccharide production of *G. lucidum* WK-003 on the basis of 2.5% CSL

Molasses concentration (%)	Dry weight of mycelium (g/l)	Dry weight of exo-polysaccharide (g/l)
1	4.06±0.0815	2,290±0.0105
2	5.90±0.0759	2,427±0.0295
3	7.77±0.0873	2,550±0.0396
4	9.60±0.0629	3,118±0.1082
5	12.14±0.0769	3,493±0.0421
6	11.78±0.1304	3,150±0.0392
7	10.53±0.0543	2,930±0.0810
8	10.02±0.1284	2,870±0.0376
9	9.33±0.0832	2,500±0.0743

Condition: Shaken flask cultivation, pH 4.5, 120 rpm, 30°C, 1% inoculum, 8 days.

Table 4. Optimization of CSL concentration for the mycelial growth and exo-polysaccharide production of *G. lucidum* WK-003 on the basis of 5% molasses

CSL concentration (%)	Dry weight of mycelium (g/l)	Dry weight of exo-polysaccharide (g/l)
1.0	7.73±0.1885	0.823±0.0205
1.5	11.25±0.0938	2.310±0.1766
2.0	12.03±0.0791	3.194±0.0200
2.5	12.38±0.0378	3.558±0.1569
3.0	12.12±0.0671	3.215±0.0940
3.5	11.78±0.0972	3.134±0.0716
4.0	11.28±0.0109	2.863±0.0334
4.5	10.76±0.1428	2.596±0.0263
5.0	10.29±0.0930	2.396±0.0170

Condition: Shaken flask cultivation, pH 4.5, 120 rpm, 30°C, 1% inoculum, 8 days.

molasses 8%와 CSL 2.5%의 농도가 *G. lucidum* WK-003 균사체 생산 및 세포외 다당체 생산을 위한 최적 농도임을 알아보기 위해 CSL 2.5%에 molasses 농도를 알아본 결과 5%에서 균사체 수율(12.147 g/l)과 세포외 다당체 생산(3.493 g/l)이 최대를 나타내었다(Table 3). 이것은 배지에 주된 탄소원으로 molasses만을 사용했을 때, 타 영양소가 부족하기 때문에 많은 양의 molasses를 필요로 하다가, 질소원이 많이 함유된 CSL을 첨가함으로써 CSL에 함유된 탄소원이 보완작용을 함으로써 5% 농도가 최적이 된 것으로 사료된다.

최적 농도를 재확인하기 위해 역으로 molasses 5%에 CSL 농도를 조절하였을 때, 역시 2.5%에서 균사체 수율(12.38 g/l)과 세포외 다당체 생산(3.558 g/l)이 최대를 나타내었다(Table 4). 상기의 결과로 *G. lucidum* WK-003 균사체 생산 및 세포외 다당체 생산을 위한 산업용 배지의 최적 농도를 molasses 5%와 CSL 2.5%로 결정하였다.

발효조 배양

5 l jar fermenter 배양시에 산업용 배지를 사용했을 경우 균사체 수율은 6~9일 까지 7.3 g/l로 비슷하였고, 세포외 다당체는 8일째 11.215 g/l로 최대를 나타내었다(Fig. 3). 이것은 다당 생산용 합성배지에서 생산된 7.145 g/l(Fig. 2)보다 약 4 g/l이 많이 생산된 것이다. 산업용 배지의 사용 가능성은 경제성과 세포외 다당체 생산량에 있어서 매우 고무적이다.

간 보호 효과

간 질환에 유효한 물질의 검색을 위해서는 실험 동물을 많이 이용해 왔는데, 본 연구에서는 Sprague-Dawley 계열 rat를 사용하고 독성 유발 약물로는 CCl₄을 사용하였다(Kiso 등, 1985). CCl₄ 투여에 의해 간 독성이 유발된 rat에 합성배지를 사용한 *G. lucidum* WK-003의 액체 배양으로부터 생산된 세포외 다당이 간 보호 작용이 있는 것으로 보

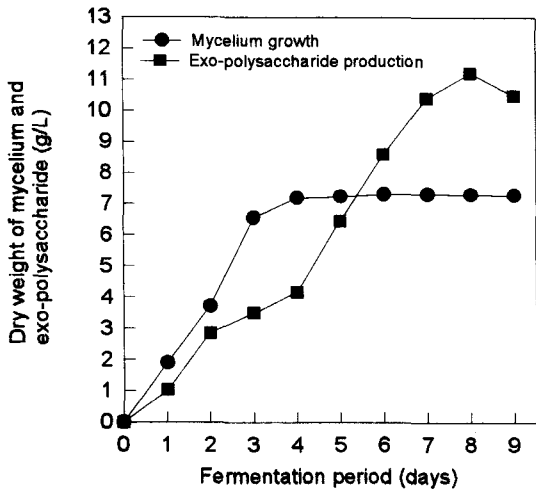


Fig. 2. Growth curve and the production of exo-polysaccharide by using jar fermenter with industrial grade medium of *G. lucidum* WK-003. (pH 4.5, 30°C, 200 rpm, 1 vvm, 1% inoculum, 5 l fermenter)

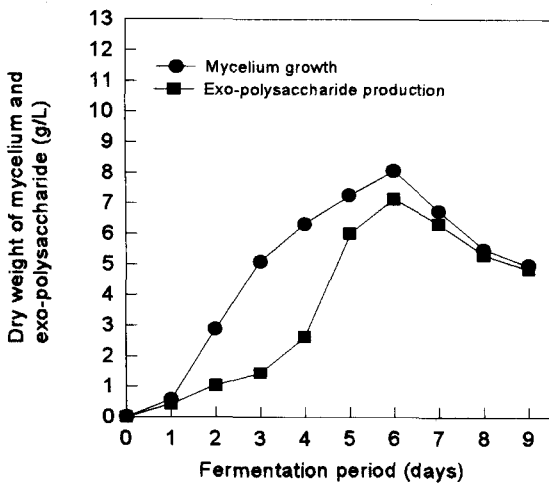


Fig. 3. Growth curve and the production of exo-polysaccharide by using jar fermenter with synthetic medium of *G. lucidum* WK-003. (pH 4.5, 30°C, 200 rpm, 1 vvm, 1% inoculum, 5 l fermenter)

고되었다(Song *et al.*, 1998). 그러나 산업에 이용하기 위해서는 값 싼 배지가 필요하며, 산업용 배지에서도 동일한 활성을 갖는지를 확인할 필요가 있다. 따라서 본 실험에서 이를 확인하기 위하여 합성배지와 최적화된 산업용 배지에서 생산된 균체의 다당체를 CCl₄ 독성이 유발된 rat에 4일간 경구 투여하였을 때 간 손상정도를 나타내는 GPT와 GOT 활성이 704 IU/L와 656 IU/L에서 각각 349 IU/L, 356 IU/L와 473 IU/L, 585 IU/L로 낮아진 결과를 보여 (Table 5), 합성배지(Song *et al.*, 1998)와 산업용 배지에서 생산된 균체의 다당체의 간 보호 작용은 거의 차이가 없기 때문에 산업용 배지의 이용 가능성이 있는 것으로 판단된다.

Table 5. Hepatoprotective effect of exo-polysaccharide on CCl₄ intoxicated rats

Group	n	GOT	GPT
Normal	6	95±5	20±1
Exo-polysaccharide(IM ^a)	6	94±9	25±3
Exo-polysaccharide(SM ^b)	6	97±7	22±2
CCl ₄ *	8	656±387	704±391
Exo-polysaccharide(IM ^a)/CCl ₄ *	8	585±303	356±172
Exo-polysaccharide(SM ^b)/CCl ₄ *	8	473±356	349±125

^a Industrial grade medium

^b Synthetic medium

*Treated CCl₄ intoxicated rats

요약

영지버섯(*Ganoderma lucidum* WK-003) 균사체의 액체 배양에 의하여 세포의 생물고분자 물질의 산업적 생산을 위한 최적 조건을 검토하였다. 세포의 고분자물질 생산을 위한 산업용배지의 최적 농도는 molasses 5%와 CSL 2.5%에서 균사체 생장(12.4 g/l)과 균체의 다당체 생산(3.6 g/l)이 최대를 나타냈으며, 5 l 발효조 배양시에는 균사체 생장이 합성배지(8.1 g/l)일때가 산업용배지(7.3 g/l)보다 높게 나타났으나, 균체의 다당체 생산은 합성배지(7.2 g/l)보다 산업용배지(11.2 g/l)일 때가 더 높게 나타났다. 간 보호 효과는 합성배지와 최적화된 산업용 배지에서 생산된 균체의 다당체를 CCl₄ 독성이 유발된 rat에 경구 투여하였을 때 주요 지표를 나타내는 GPT활성은 산업용배지에서 생산된 균체의 다당체인 경우 704 IU/L에서 356 IU/L로 낮추었으며, 합성배지에서 생산된 균체의 다당체는 704 IU/L에서 349 IU/L로 낮춘 결과를 보였다. 따라서 합성배지와 산업용 배지에서 생산된 균체의 다당체의 간 보호 작용은 거의 차이가 없는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 논문은 99년 한국과학재단과 전라북도에서 지원하는 의약자원연구센터 (원광대 RRC : 98-16-02-05-A-3)의 지원에 의한 연구로 이에 감사드립니다.

참고문헌

久保道徳, 松田秀秋, 谿忠人, 有地滋. 1980. 靈芝(*Ganoderma lucidum*, 子實體)의 研究, 만년버섯 熱水抽出 액기스의 實驗 高脂血症對作用, 基礎와 臨床 **14**: 2455.
 木村善行, 有地滋, 高橋猛. 1984. 靈芝(*Ganoderma lucidum*, 子實體)의 過酸化脂質形成抑制作用, 基礎와 臨床 **18**: 2071-2074.
 박은전, 김기영, 김재백, 김수웅, 이승룡, 손동환. 1994. 영지로 부터 추출한 다당체의 실험적 간경화에 대한 섬유화 억제 효과. 약학회지 **38**: 338-344.
 안덕균. 1987. 고등균류의 한방적 이용. 한국균학회지 **15**: 213-

- 215.
- 이권행, 정 훈, 김영일, 김병각. 1983. 산업폐자원을 이용한 발효에 의한 영지의 항고혈압 성분의 생산. *한국균학회지* **19**: 79-84.
- 이주영, 박기숙, 정진호, 조미정, 고광호, 이준우, 정훈, 이승룡. 1994. G009의 간 보호 작용에 관한 연구. *한국응용약물학회지* **2**: 206-212.
- 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 Nostand Reinhold, New York.
- Hikono, H., Ishiyama, M., Suzuki, Y. and Konno, C. 1989. Mechanisms of hypoglycemic activity of Ganoderan B, a glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Medica* **55**: 423-428.
- Kang, C. Y., Shim, M. J., Choi, E. C., Lee, Y. N. and Kim, B. K. 1981. Studies on antineoplastic components of Korean basidiomycetes, Mycelial culture and antineoplastic component of *Ganoderma lucidum*. *Kor. Biochem. J.* **14**: 101-112.
- Kiso, Y., Kumasaka, M. and Shinoda, M. 1985. Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Planta Medica* **49**: 222-225.
- Kohda, H., Tokumoto, W., Sakamoto, K., Ishihara, S. and Uchida, M. 1985. The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Histamine release-inhibitory triterpenes. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 1367-1374.
- Komoda, Y., Shimmizu, M., Sonda, Y. and Sato, Y. 1989. Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors, *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 531-533.
- Lee, J. W., Han, M. D. and Lee, K. H. 1992. Screening of hepatoprotective substances from higher fungi by primary cultured rat hepatocytes intoxicated with carbone tetrachloride, *Kor. J. Mycol.* **20**: 10-17.
- Lee, K. H., Lee, J. W., Han, M. D., Jeong, H., Kim, Y. I. and Oh, D. H. 1994. Correlation between anticomplementary and antitumor activity of the crude polysaccharide from *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Bioeng.* **22**: 45-51.
- Lui, G. T., Wang, G. F., Wei, H. L., Bao, T. T. and Sung, Z. Y. 1979. Comparison of the protective actions of dimethylbiphenylcarboxylate, trans-stilbene, alcoholic extracts of *Polyporus japonicus* and *Ganoderma* towards experimental liver injury in mice. *Yao Hseueh Pao.* **14**: 598.
- Mizuno, T., Kato, N., Totsuka, A., Takenaka, K., Shinkai, K. and Shimizu, M. 1984. Fractionation structural features and antitumor activity of water soluble polysaccharide from Reish fruit body of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Nogeigoku Kaishi* **58**: 871-882.
- Reitman, S. and Frankel, S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Pathol.* **28**: 56-63.
- Sanchez-Hernandez, E., Garcia-Mendoza, C. and Novaes-Ledieu, M. 1990. Chemical characterization of the hyphal wall of the basidiomycetes *Arimillaria mellea*. *Exp. Mycol.* **14**: 178-183.
- Sone, Y., Okuka, R., Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A. 1985. Structure and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 2641-2653.
- Song, C. H., Yang, B. K., Ra, K. S., Shon, D. H., Park, E. J., Go, G. I. and Kim, Y. H. 1998. Hepatoprotective effect of extracellular polymer produced by submerged culture of *Ganoderma lucidum* WK-003. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 277-279.
- Torev, A. 1968. Submerged culture of higher fungi mycelium on an industrial scale. *Mushroom Sci.* **7**: 585-589.