

Ganoderma lucidum IY009 배양균사체 유래 단백다당류의 저분자와 고분자 분획의 특성

백성진 · 김용석 · 전억한¹ · 이은숙² · 이준우^{3*}

일양약품(주) 중앙연구소 생물공학팀, ¹경희대학교 식품가공학과,
²경산대학교 한의예과, ³경북전문대학 식품가공과

Properties of the High and Low Molecule of the Proteoglycan Extracted from *Ganoderma lucidum* IY009

Seong-Jin Baek, Yong-Seuk Kim, Uck-Han Chun¹, Eun-Sook Lee² and June-Woo Lee^{3*}

Biotechnology Lab., Central Research Institute, Il Yang Pharm. Co. Ltd., Yongin 449-900

¹Department of Food Science and Technology, Kyunghee University, Yongin 449-701

²Department of Prep. Oriental Medicine, Kyungsan University 712-715

³Department of Food Science and Technology, Kyungbuk College, Yeongju 750-712

ABSTRACT: To examine the structural properties of the proteoglycan (GMPG, *Ganoderma lucidum* mycelial proteoglycan) obtained from mycelia in *Ganoderma lucidum* IY009, we obtained the low and high molecular proteoglycan by ultrafiltration and sepharose CL-4B column chromatography. The physicochemical properties of these fractions were as follows. When the proteoglycan separated by ultrafiltration and sepharose CL-4B column chromatography, it was not fractionated completely. The molecular weight of high molecular proteoglycan by the gel column chromatography (CH) was 250 kD and 2,000 kD, and low molecular proteoglycan was 12 kD. The total carbohydrate was consisted of 75.7% (UH) and 96.7% (CH), and the low fraction was 72.7% (UL) and 87.1% (CL), respectively. The sugar of high and low molecular proteoglycan composed of glucose, mannose, fructose, galactose, xylose, ribose and arabinose. Glucose contents of all fraction were ranged from 46.9%~82.4% of the total sugar and the ratio of α and β -glucose was 0.84~1.14, and its indicated the proteoglycan to be β -glucan. Amino acids pattern showed that the fractions contained a large amount of aspartic acid, glutamic acid, alanine and leucine. These fractions showed the characteristics of IR absorption for β -glucan at 890 cm^{-1} and ¹³C-NMR spectroscopy showed the presence of the β -1,3-glucan and a β -1,6-glucan.

KEYWORDS: *Ganoderma lucidum* IY009, β -Glucan, Proteoglycan

영지버섯(*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.)의 유효성분에 관한 연구는 주로 단백 다당류인 고분자 물질과 고비성분으로 잘 알려진 triterpenoid 계열의 저분자 물질들에 대해 연구가 되어왔다. Miyazaki 등(1981)은 영지 자실체에서 항암성 다당류를 분리하여 그 구조를 추정해본 결과, 항암성 다당류 분획물의 구조는 $\beta(1\rightarrow3)$ -linkage, $\beta(1\rightarrow4)$ -linkage 및 $\beta(1\rightarrow6)$ -linkage의 glucan임을 보고하였으며, Tomoda 등(1986)은 영지의 열수 추출 다당류 중 혈당 강하작용이 있는 ganoderan B와 C의 다당구조를 분석하였는데 분자량은 각각 7400과 5800 dalton으로 나타났으며 ¹³C NMR spectrum 결과에 의해 ganoderan B의 기본골격과 side chain은 D-glucopyranosyl $\beta(1\rightarrow3)$ 와 $\beta(1\rightarrow6)$ -linkage들의 구조이며 ganoderan C는 기본골격과 side chain은 D-glucopyranosyl $\beta(1\rightarrow3)$ 와 $\beta(1\rightarrow6)$ linkage들의 구조와 D-galactopyranosyl $\alpha(1\rightarrow6)$ linkage들의 구조임을 밝혔다. Mizuno 등(1984)은

PMR, ¹³C-NMR spectra 그리고 효소 가수분해에 의하여 영지의 polysaccharide의 구조는 β -1,3구조와 β -1,6구조의 기본구조로 이루어져 있으며, 이 β -구조는 sarcoma 180 암세포주의 피사에 효과가 있으며 IR-spectrum에서 890 cm^{-1} 에 peak가 나타난다고 보고하였다. Sone 등(1985)은 영지 균사체의 세포외성 분획 다당인 β -D-glucan을 periodate oxidation과 borohydride reduction의 과정을 거쳐 변형된 polyol 형태의 β -D-glucan의 고형암 억제효과를 본 결과, 기존의 β -D-glucan 보다 높은 항암활성을 나타내었다고 보고하였다. 또한 Han 등(1995)은 영지 균사체의 세포벽에서 추출한 수용성 다당류이며 β -glucan성인 ganoderan을 sarcoma 180 세포주가 이식된 쥐에 투여하여 94%의 종양 억제가 나타남을 보고하였다. 이와 같이 영지의 자실체 및 배양 균사체에서 분리한 고분자 다당류의 경우는 항암활성, 면역 증강활성, 지질과산화 억제효과 및 혈당강하 효과 등을 갖는 것으로 알려졌다. 국내에 있어서는 Kim 등(1980)은 경기도 지방에서 자생하는 영지를 0.1 N NaOH로 추출하

*Corresponding author <E-mail: jwlee@mail.kbc.ac.kr>

여 그 추출물의 고형암 억제 효과를 실험한 결과 87.6%의 억제율을 나타내었으며, 추출 분획물의 구성당과 구성 아미노산을 확인한 결과 4가지의 당당류와 8가지의 아미노산류로 구성되어 있음을 보고하였다. Kohda 등(1985)은 영지의 메탄을 추출물이 쥐의 비만세포로부터 histamine 유리 억제 작용이 있음을 조사하여, 이의 성분이 triterpenes 계열의 저분자인 ganoderic acid C(3 β ,7 β ,15 α -trihydroxy-11,23-dioxo-5 α -lanost-8-en-26-oic acid)와 ganoderic acid D(7 β -hydroxy-3,11,15,23-tetraoxo-5 α -lanost-8-en-26-oic acid)임을 구명하였다. Nishitoba 등(1984)은 영지 자실체에서 고비성분으로서 C₂₇ 및 C₃₀ terpenoid를 분리하여 구조를 밝혔는데 C₂₇ 계열은 영지의 종명을 따서 lucidenic acid A, B 및 C라 하였으며, C₃₀ 계열은 이미 알려진 ganoderic acid B이었다고 보고하였으며, Komoda 등(1985)은 영지 자실체로부터 triterpene계 저분자 화합물인 ganoderenic acid A, B, C, D, ganoderic acid E, F, G, 그리고 lucideric acid D를 구조 분석하여 밝혀내었으며, Kikuchi 등(1986)은 영지자실체 갖의 균속의 표면에서 추출한 triterpene계 저분자 화합물인 ganoderic acid F, G, H, lucideric acid D2, E2, 그리고 화합물 C5', C6를 구조 분석하여 밝혀내었고, ganoderic acid C2, E, I, K, 화합물인 B8, B9, 그리고 lucideric acid F를 two-dimensional(¹H-¹H, ¹H-¹³C shift correlation) NMR 기술에 의하여 구조 분석하여 밝혀내었다. Toth 등(1983)은 영지 균사체로부터 자실체 저분자 물질인 ganoderic acid와 유사한 계열로 hepatoma cell에 cytotoxic activity를 가지는 lanostanic acid류들을 ganoderic acid Z, Y, X, W, V, U로 각각 명명하였으며, Hirotsu 등(1986)은 영지 균사체에서 새로운 triterpenoid계열의 ganoderic acid T, R, S를 구조 분석하여 보고하였다. 이와 같이 영지는 자실체와 배양균사체 모두 고분자 및 저분자의 유효 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 보고됨으로서, 물리화학적 특성의 차이에 따른 그들의 생리활성의 관계성을 알아볼 필요가 있다.

따라서 본 연구는 면역·항암 활성이 우수한 *Ganoderma lucidum* IY009 균사체의 alkali 추출 단백질인 GMPG를 모체로하여 한외여과장치(ultrafiltration system)를 이용하여 고분자인 GMPG-UH와 저분자인 GMPG-UL를 분획하였고, gel permeation chromatography를 이용하여 고분자인 GMPG-CH와 저분자인 GMPG-CL를 분획, 조제하여 기존의 GMPG와 비교하여 총당 및 총단백질 함량의 차이, 분자량의 변화, 구성당 및 구성아미노산의 변화, IR spectrum에서의 β -결합성 다당류 확인, ¹³C-NMR spectrum상에서의 β -(1 \rightarrow 3)구조 유무를 확인하였다.

재료 및 방법

균주 및 실험동물

본 연구에 사용된 균주와 종균용 배지는 전남 두륜산에서 채집한 *Ganoderma lucidum*의 자실체로부터 분리한 G.

lucidum IY009 균사체를 사용하였다. 종균용과 배양용의 배지 및 배양의 조건은 Lee 등(1996)의 방법을 이용하였다. 항암실험을 위한 실험 동물은 웅성의 ICR 계 mouse로 생후 8~10 주령으로 무게는 20~25 g의 것을 삼육측산으로부터 공급받아 사용하였다. Mouse의 사육 조건으로 실험동물실 온도는 22 \pm 2°C, 습도는 55~60%, light cycle은 12시간씩 빛과 암상태를 유지하였으며, 마우스용 고형 사료와 물을 무제한 공급하였다. Sarcoma 180 암세포주는 한국화학연구소에서 분양 받아 사용하였다.

시료의 제조

발효조에서 7일간 배양된 균사체 배양액에 최종 농도가 2N이 되게 NaOH를 가한 후 실온에서 24시간 방치하고 acetic acid(glacial)로 중화(pH 7.0)시켜 원심분리하여 세포균체는 제거하고 상정액만 얻었다. 상정액은 한외여과막(membrane, MW 10,000, Sartorius Co)을 이용하여 10 kD 이상의 단백당류를 얻었으며, 이후 1500배 물을 첨가하여 한외여과를 행한 후 동결 건조하여 GMPG를 얻었다.

GMPG의 고분자 및 저분자 분획을 제조하기 위해 ultrafiltration system과 gel chromatography를 이용하여 분리하였다. GMPG-UH 및 GMPG-UL 제조의 경우에는 100 kD의 ultrafiltration membrane을 이용하여 1000배씩 20회 반복 한외여과를 행하여 100 kD 이상의 분획물(GMPG-UH)을 얻었으며, 여과 잔액은 10 kD의 ultrafiltration membrane을 이용하여 농축한 후 동결건조하여 10 kD~100 kD 분획물(GMPG-UL)을 얻었다. GMPG-CH 및 GMPG-CL의 제조는 sepharose CL-4B로 충전시킨 column(2.7 cm \times 77 cm)에 시료 0.2 g을 적용한 후 0.3 N NaOH를 이용하여 용출시켰다. 이 때의 유속은 6 ml/10 min이었고, fraction volume은 4 ml로 하였다. 용출된 분획들은 phenol-sulfuric acid 법을 이용하여(Dubois 등, 1956) 당 함량을 측정 한 후, 고분자 분획은 fraction No. 40~70(GMPG-CH), 저분자 분획은 fraction No. 87~110(GMPG-CL)을 회수하여 투석막(MW 9,000, Sigma, USA)에 넣어 흐르는 물에서 5일간 투석시켜 동결건조 하였다(Fig. 1).

구성 성분의 정량 및 분석

총당의 함량은 phenol-sulfuric acid 법(Dubois 등, 1956)으로 측정하였으며, 총단백질 함량은 bicinchoninic acid(BCA) 단백질 정량 시약(Pierce Co., USA)을 사용하여 측정하였다(Smith 등, 1985). 구성 당 및 구성 아미노산의 분석은 Lee 등(1999)의 방법을 이용하였다.

분자량 분포의 측정

단백당류의 분자량 분포를 측정하기 위하여 0.3 N NaOH에 녹인 시료 200 μ l를 sepharose CL-4B column(1.6 cm \times 52 cm)에 적용한 후, 1 ml/10 min의 유속으로 fraction volume은 2 ml씩 0.3 N NaOH 용액으로 용출하여 gel permeation chromatography(GPC)를 행하였으며, 분자량 측정을 위한

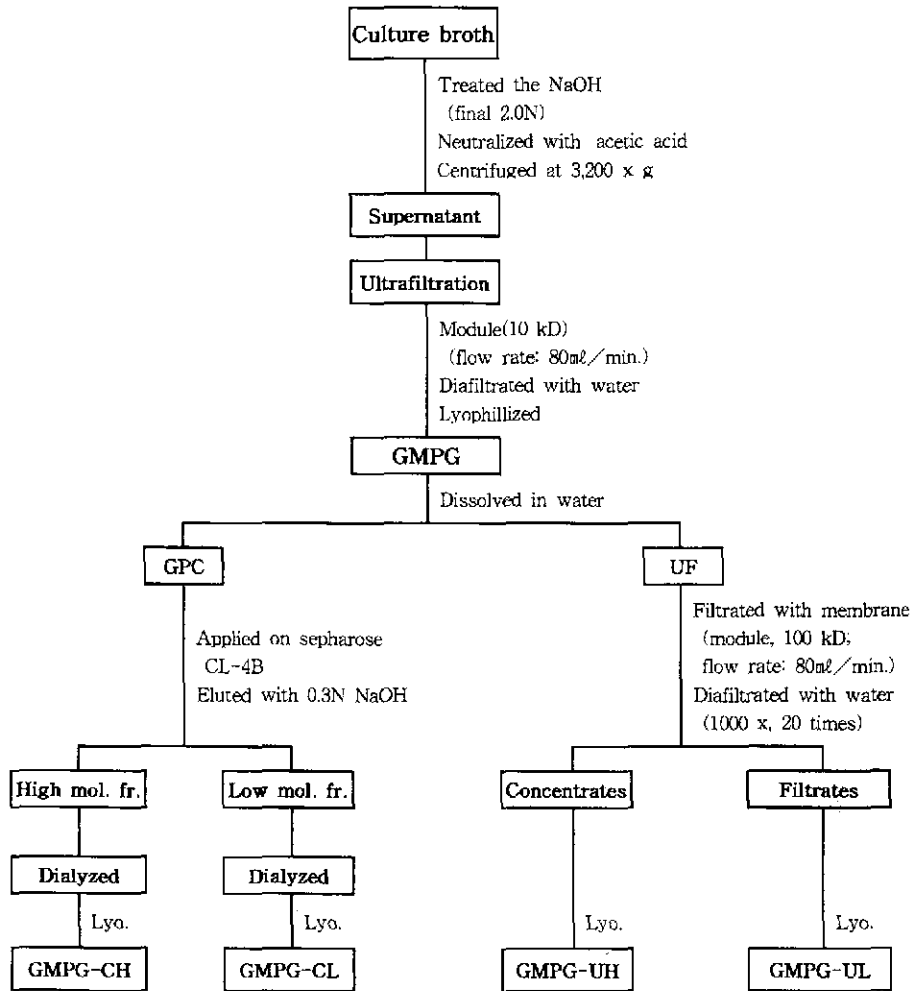


Fig. 1. Procedure for the fractionation and preparation of GMPG from *G. lucidum* IY009.

표준 물질로는 Sigma사의 dextran(2,000 kD, 500 kD, 124 kD, 9.3 kD)을 사용하였다.

IR spectrum

단백다당류 분획들과 400배(w/w)의 KBr을 막자사발에 넣고 마쇄하여 pellet으로 만든 다음, FT-IR(Bruker, IFS-48, Germany)를 이용하여 측정하였다. 이 때 β -1,3-glucan의 표준물질로 curdlan, zymosan A와 α 구조를 위해서는 starch를 사용하였다.

^{13}C -NMR spectrum

단백다당류의 결합 형태 및 구조적 특성을 조사하기 위하여, ^{13}C -NMR 분석은 200 MHz spectrophotometer(Bruker, AM-200, Germany)를 이용하였다. 용매로서는 $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ 에 시료 및 표준물질 50 mg을 녹여 측정하였으며, β -1,3-linked triple-helical glucopyranose의 표준물질로는 laminarin (obtained from *Laminaria digitata*, Sigma Co.)을 사용하였다.

항암활성의 측정

항암효과의 측정은 ICR계 mouse의 우측서혜부에 0.1 ml

(5×10^7 cells/ml)의 sarcoma 180을 피하 이식하고 72시간 후, 시료를 20 mg/kg의 농도로 1일 1회씩 10일간 연속 투여하였다. 암세포 이식 30일째 되는 날에 mouse로부터 고형 암을 적출하여 중량을 측정하였다. 고형 암의 증식 저지율은 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 증식 저지 백분율(percent inhibition ratio: I.R., %)로 계산하였다.

결 과

GMPG, GMPG 고분자 및 저분자의 이화학적 특성

Column fractionation에 의한 분획물인 GMPG-CH와 GMPG-CL의 회수율은 총당의 농도를 계산하여 측정하였다. GMPG를 column에 loading하여 GMPG-CH와 GMPG-CL의 비율 및 회수율을 비교하기 위해 fraction No. 1~76을 고분자 총당으로 fraction No. 77~130을 저분자 총당으로 합산하여 계산한 결과는 Table 1과 같다.

GMPG, GMPG 고분자 및 저분자 분획의 총당 및 단백질 함량

GMPG, GMPG의 고분자 및 저분자 분획의 총당과 단백질

Table 1. The recovery ratio of high and low molecule fraction of GMPG by sepharose CL-4B chromatography

| Fraction | Weight (mg) | Recovery ratio (%) |
|---------------|-------------|--------------------|
| Loading | 200.0 | 100.0 |
| Elution | 196.5 | 98.3 |
| GMPG-CH frac. | 29.8 | 14.9 |
| GMPG-CL frac. | 166.7 | 83.4 |

Table 2. Composition of high and low molecules fraction of GMPG

| Sample | Total carbohydrate (%) | Protein (%) |
|---------|------------------------|-------------|
| GMPG | 85.9 | 12.8 |
| GMPG-UH | 75.7 | 31.5 |
| GMPG-UL | 72.7 | 33.6 |
| GMPG-CH | 96.9 | 1.9 |
| GMPG-CL | 87.1 | 8.1 |

GMPG: *Ganoderma lucidum* mycelial proteoglycan.

GMPG-UH: High molecule fraction by ultrafiltration of GMPG.

GMPG-UL: Low molecule fraction by ultrafiltration of GMPG.

GMPG-CH: High molecule fraction by column fractionation of GMPG.

GMPG-CL: Low molecule fraction by column fractionation of GMPG.

질 함량 측정 결과는 Table 2와 같다. GMPG는 85.9%의 총당과 12.8%의 단백질을 함유하고 있는 것으로 조사되었다. 또한 ultrafiltration을 이용하여 GMPG-UH와 GMPG-UL로 분획화한 경우는 각각 75.7%와 72.7%의 당과 31.3%와 33.6%의 단백질을 함유하고 있었으며, column chromatography에 의해 분획화한 GMPG-CH와 GMPG-CL의 경우에는 당과 단백질이 각각 96.9%와 87.1% 및 1.9%와 8.1%를 함유하고 있는 것으로 조사되었다.

이상의 결과들로부터 GMPG, GMPG 고분자 및 저분자들은 모두 당과 단백질이 결합된 형태의 단백 다당류임을 알 수 있었으며, GMPG와 비교하여 GMPG-UH, GMPG-UL은 당함량이 각각 10.2%와 13.2% 감소하고 단백질 함량이 각각 18.7%와 20.8%가 증가함을 알 수 있었고, GMPG-CH, GMPG-CL은 당함량이 각각 11.0%와 1.2%가 증가하고, 단백질 함량이 각각 10.9%와 4.7%가 감소함을 알 수 있다.

GMPG, GMPG 고분자 및 저분자의 구성 당의 조성

GMPG, GMPG의 고분자 및 저분자 분획을 구성하는 단당류의 종류를 알아보기 위하여 GC 분석한 결과는 Table

Table 3. Monosaccharide content of high and low molecules fraction of GMPG

| Sample | Content (%) | | | | | | | |
|---------|-------------|-----|------|------|------|-----|---------------|--------------|
| | Ara | Rib | Xyl | Fru | Man | Gal | α -Glu | β -Glu |
| GMPG | 0.3 | 0.4 | 0.9 | 11.2 | 0.5 | 4.3 | 39.9 | 42.5 |
| GMPG-UH | 5.2 | 1.9 | 5.8 | 4.9 | 7.3 | 5.9 | 32.3 | 36.7 |
| GMPG-UL | 0.7 | 1.1 | 1.6 | 0.5 | 15.1 | 7.7 | 39.1 | 34.3 |
| GMPG-CH | 0.4 | 4.0 | 17.7 | 16.4 | 11.6 | 3.0 | 25.5 | 21.4 |
| GMPG-CL | - | 0.8 | 2.2 | 12.2 | - | 3.4 | 41.2 | 40.4 |

3과 같다. 대부분 분획은 glucose, mannose, fructose, galactose, xylose와 소량의 ribose 및 arabinose를 함유하고 있는 것으로 조사되었다. 대부분 분획에서 α 와 β -glucose의 결합 비율이 0.84~1.14로 β -glucan이 주를 이루는 단백질 다당류이고, 저분자보다는 고분자가 더 많은 β -결합을 이루고 있는 것으로 조사되었다.

GMPG, GMPG 고분자 및 저분자의 구성 아미노산의 조성

GMPG와 그의 고분자 및 저분자 분획의 아미노산 조성을 알아보기 위하여 아미노산 분석을 실시한 결과는 Table 4와 같다. 대부분 분획은 Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, His, Lys 및 Arg 등 16종의 아미노산 조성을 갖는 것으로 조사되었다. GMPG 및 고분자와 저분자 분획들은 공통적으로 산성 아미노산인 Asp와 Glu가 높은 조성을 갖고 있으며, 중성 아미노산인 Ala와 Leu의 조성이 높게 함유하고 있는 것으로 조사되었다. 이와 같은 결과는 담자균류가 함유하고 있는 일반적인 아미노산 조성과의 유사함을 확인 할 수 있었다(Lee 등, 1999).

GMPG, GMPG 고분자 및 저분자의 분자량 분포

GMPG, GMPG의 고분자 및 저분자 분획들의 분자량 분포를 알아보기 위하여 sepharose CL-4B column chromatography를 실시하였다. GMPG의 경우 전형적인 두 개의 peak를 관찰할 수 있었는데, 분자량 측정을 위한 표준물질인 dextran과 비교한 결과 각각 2,000 kD와 12 kD의 분자량을 갖는 것을 알 수 있었다. 100 kD membrane을 이용한 한외여과 고분자 분획인 GMPG-UH와 저분자 분획인 GMPG-UL의 분자량 분포는 Fig. 2와 같다. GMPG-UH의

Table 4. Amino acid composition of each fraction and GMPG obtained from *G. lucidum* IY009

| | Content (%) | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-------------|-----|-----|------|------|------|------|------|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|
| | Asp | Thr | Ser | Glu | Pro | Gly | Ala | Val | Ile | Leu | Tyr | Phe | His | Lys | Arg |
| GMPG | 10.9 | 2.2 | 2.2 | 15.0 | 13.3 | 7.2 | 8.9 | 7.8 | 3.3 | 13.3 | - | 1.7 | 2.8 | 8.9 | 2.8 |
| GMPG-UH | 12.7 | 0.7 | 0.7 | 22.7 | 10.5 | 4.4 | 7.8 | 11.2 | 3.2 | 11.7 | - | 2.9 | 1.2 | 7.8 | 2.4 |
| GMPG-UL | 10.0 | 2.5 | 6.3 | 12.5 | 5.0 | 16.3 | 12.5 | 6.3 | 5.0 | 11.3 | - | - | 5.0 | 5.0 | 2.5 |
| GMPG-CH | 14.7 | 2.3 | 2.6 | 19.9 | 9.4 | 6.8 | 9.8 | 7.9 | 4.1 | 11.7 | - | 1.1 | 0.4 | 6.4 | 3.0 |
| GMPG-CL | 12.6 | 1.2 | 1.2 | 19.2 | 10.8 | 5.4 | 7.8 | 7.8 | 3.0 | 12.0 | 2.4 | 3.0 | 1.8 | 10.2 | 1.8 |

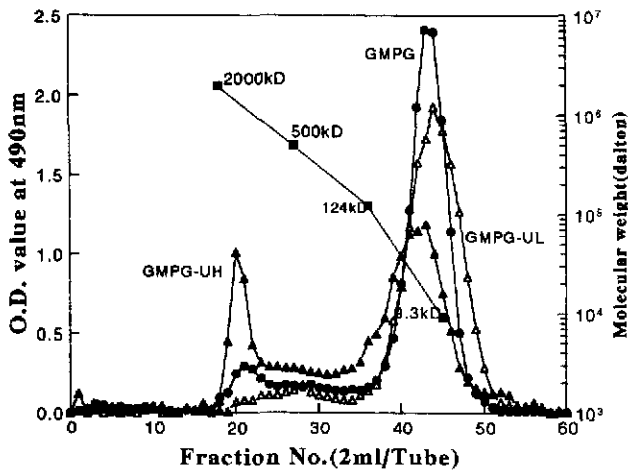


Fig. 2. Gel filtration on sepharose CL-4B chromatography of the GMPG-UH and GMPG-UL obtained from GMPG.

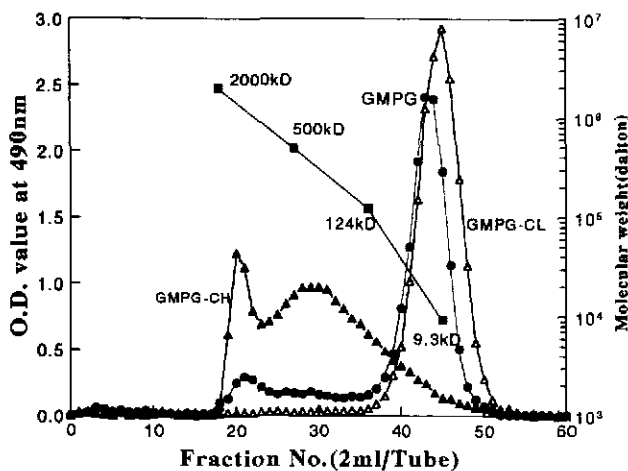


Fig. 3. Gel filtration on sepharose CL-4B chromatography of the GMPG-CH and GMPG-CL obtained from GMPG.

경우는 GMPG와 비교해 보면 저분자 부분이 상대적으로 감소하면서 고분자 분획이 증가하는 경향을 나타냈다. 그리고 10~100 kD 분획물인 GMPG-UL에 있어서는 고분자 부분이 감소하며 저분자 부분이 상대적으로 증가하는 경향을 나타내었는데, 이와 같은 결과로부터 한외여과에 의해 완전히 분리가 되지 않음을 알 수 있었으며, 고분자와 저분자 분획은 독립된 형태로 존재하는 것이 아니라, 어떠한

결합 형태를 이루는 단백질다당류임을 알 수 있다. GMPG-CH와 GMPG-CL부분을 분리하기 위해 sepharose CL-4B chromatography를 이용하여 분획하였다. 그 결과는 Fig. 3과 같이 나타났는데, GMPG-CH에서는 2,000 kD와 250 kD로 추정되는 두 개의 peak가 관찰되었으며, GMPG-CL에서는 12 kD의 분자량을 갖는 단백질다당류임을 확인할 수 있었다.

IR spectrum

GMPG, GMPG의 고분자 및 저분자 분획의 당결합 양식을 알아보기 위해 IR spectrum으로 측정하여, Baker 등 (1956)의 분석 방법을 통하여 구조를 알아본 결과는 Table 4와 같다. 일반적으로 β결합 다당류의 IR 흡수대는 891±7 cm⁻¹ 부근에서 나타나고, α결합은 860 cm⁻¹ 부근에서 흡수대를 가지며, 당의 종류에 따라 약간씩 변경된 흡수대를 갖는 것으로 알려졌다(Brock 등, 1983). 그 결과 다당류에서 나타나는 일반적인 peak인 3400 cm⁻¹ 부근에서의 O-H 신축진동, 2900 cm⁻¹ 부근에서의 C-H 신축진동, 1400 cm⁻¹ 부근에서의 CH₂ 변각진동, 1100 cm⁻¹ 부근에서 C-O 변각진동 등의 특이적 흡수 peak가 공통적으로 나타났다. 또한 β당의 결합양식을 결정 짓는 890 cm⁻¹ 부근에서의 흡수 peak는 GMPG-UH, GMPG-UL, GMPG-CH, GMPG-CL 분획들에서 육안 관찰되어 β결합된 단백질다당류임을 알 수 있었다. β-(1→3)-glucan인 curdlan, zymosan A의 경우도 각각 887.1 cm⁻¹, 886.0 cm⁻¹에서 흡수 peak가 나타났으며, α결합구조인 starch는 858.4 cm⁻¹ 부근에서 흡수peak가 나타났다.

¹³C-NMR spectrum

GMPG, GMPG의 고분자 및 저분자들의 결합 형태 및 구조적 특성을 조사하기 위하여, ¹³C-NMR 분석 결과는 Table 5에 나타내었다. GMPG, GMPG 고분자 및 저분자, β-1,3-linked triple-helical glucopyranose의 표준물질인 laminarin (obtained from *Laminaria digitata*, Sigma Co.)을 Saito 등(1987)의 방법으로 구조적 특성을 분석하였다. 일반적으로 β결합 다당류의 C-1 peak는 103~105 ppm에서 나타나고, 반면 α결합 구조는 97~101 ppm 부근에서 나타난다. 전형적인 linear β-(1→3)-glucan 구조인 laminarin을 표준물질로 분석한 결과, β-1.3 anomer를 결정 짓는 C-1 peak가 103.3 ppm에서 나타났으며, C-2, C-3, C-4, C-5 및

Table 5. I.R. absorption spectra of each fraction and GMPG obtained from *G. lucidum* IY009

| Sample | Frequencies (cm ⁻¹) of absorption peaks |
|-----------|---|
| GMPG | 3392.5, 2931.3, 1635.9, 1419.1, 1154.9, 1024.8, 933.4, 846.8 |
| GMPG-UH | 3396.0, 2923.6, 1637.0, 1419.4, 1153.7, 1045.0, 889.7, 867.8 |
| GMPG-UL | 3412.0, 2930.2, 1636.2, 1419.4, 1152.9, 1024.8, 935.1, 888.7, 871.4 |
| GMPG-CH | 3411.0, 2927.2, 1636.6, 1419.0, 1154.0, 1040.5, 892.9, 848.4 |
| GMPG-CL | 3426.2, 2926.1, 1636.9, 1420.1, 1155.0, 1033.2, 935.0, 890.9, 863.9 |
| Curdlan | 3422.1, 2892.0, 1652.7, 1419.4, 1163.0, 1035.0, 927.4, 887.1, 850.5 |
| Zymosan A | 3386.8, 2922.0, 1652.9, 1419.4, 1154.9, 1043.2, 886.0 |
| Starch | 3397.5, 2932.2, 1646.6, 1420.3, 1154.4, 1014.9, 928.6, 858.4, 765.7 |

Table 6. ^{13}C -NMR Spectra of the GMPG, GMPG fractions and laminarin in $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$

| Carbon atom | GMPG | GMPG-UH | GMPG-UL | GMPG-CH | GMPG-CL | Laminarin |
|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | $\beta(1\rightarrow3)$ | $\beta(1\rightarrow3)$ | $\beta(1\rightarrow3)$ | $\beta(1\rightarrow3)$ | $\beta(1\rightarrow3)$ | $\beta(1\rightarrow3)$ |
| C-1 | 103.6 | 103.4 | 103.7 | 103.2 | 103.5 | 103.3 |
| C-2 | 73.3 | 73.5 | 73.5 | 72.8 | 73.4 | 73.0 |
| C-3 | 86.9 | 86.8 | 85.3 | 86.5 | 86.5 | 86.4 |
| C-4 | 70.0 | 70.1 | 69.1 | 68.8 | 68.7 | 68.7 |
| C-5 | 75.0 | 76.3 | 76.5 | 76.5 | 76.8 | 76.6 |
| C-6 | 61.0 | 61.1 | 61.1 | 61.1 | 60.7 | 61.1 |

C-6의 peak는 각각 73.0 ppm, 86.4 ppm, 68.7 ppm, 76.6 ppm, 61.1 ppm에서 peak를 나타냈다. GMPG는 103.6 ppm에서 약한 C-1 peak가 관찰되며, GMPG-UH는 103.4 ppm에서, GMPG-UL은 103.7 ppm에서 각각 C-1 peak가 관찰되었고, GMPG-CH, GMPG-CL는 각각 103.2 ppm, 103.5 ppm에서 관찰되었다. 그러므로 이들은 모두 $\beta(1\rightarrow3)$ 구조를 갖는 단백다당류임을 알 수 있다. 반면에 GMPG, GMPG 고분자 및 저분자들 모두 97~101 ppm에서 peak가 관찰됨으로서 α -결합이 혼재되어 있는 단백다당류임이 확인되어진다. 이는 구성당 분석시의 결과에서 α 와 β -glucose 결합비율이 0.84~1.14인 것과 같은 결과이다.

항암효과

GMPG, GMPG의 고분자 및 저분자 분획의 항암효과를 알아보기 위하여 sarcoma 180 고형암에 대한 증식저해율을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. GMPG는 77.6%의 암세포 증식 저해율을 나타내었으며, column chromatography에 의한 분획물인 GMPG-CH와 GMPG-CL은 각각 79.6% 및 63.4%의 암세포 증식 저해율을 나타내었다. 즉 β -결합 당의 함량이 높게 나타난(Table 2) 고분자 분획의 항암활성이 높게 나타나는 것으로 조사되었다. 또한 현재 일본에서 항암제 및 항암 보조제로 상업화되어 있는 krestin (obtained from *Coriolus versicolor*)은 64%의 sarcoma 180 암세포에 대한 증식저해율을 나타내었다. 일반적으로 담자균류 유래 다당류의 항암활성을 위해서는 β -form의 다당류 존재가

알려지고 있다. 이와 같은 결과로부터 GMPG의 항암활성은 풍부하게 존재하는 β -결합 단백다당류가 어떠한 역할을 할 것으로 추정된다.

고찰

영지(*Ganoderma lucidum*)는 면역 촉진 효과와 항암활성이 탁월하며, 간 보호 효과도 우수한 $\beta(1\rightarrow3)$ -linked glucan과 $\beta(1\rightarrow6)$ -linked glucan을 다량으로 함유하고 있다(Mizuno 등, 1984; Sone 등, 1985). 면역·항암 활성이 우수한 영지 균사체 배양액의 alkali 추출 단백다당류인 GMPG를 제조하여 표준물질인 dextran과 비교하여 분자량 분포를 측정 한 결과, 2,000 kD와 12 kD의 전형적인 2개의 peak가 형성됨을 알았다.

본 연구는 이 영지 균사체 alkali 추출 단백 다당류의 2 가지 분자량이 혼재된 GMPG를 2,000 kD 이상의 단백 다당류를 고분자로, 12 kD 이하의 다당류를 저분자로 하여 환외여과장치와 gel permeation chromatography에 의해 분획화하여 모체인 GMPG 중 분자량의 차이에 따른 구조적 특성과 항암 활성간의 관계성을 알아보고자 하였다. 영지의 alkali 추출 단백다당류인 GMPG를 100 kD의 membrane 으로 환외여과하여 고분자 단백다당류(GMPG-UH)와 저분자 단백다당류(GMPG-UL)를 얻었으며, column fractionation에 의하여 고분자 단백다당류(GMPG-CH)와 저분자 단백다당류(GMPG-CL)를 얻었다. 이 분획 과정에서 환외여과에 의한 분획에서는 완전히 분리가 되지 않음을 알 수 있었으며, 고분자와 저분자는 독립된 형태로 존재하는 것이 아니라 어떠한 결합 형태를 이루는 단백다당류임을 알 수 있었다. Column fractionation에서는 GMPG-CH는 2,000 kD와 250 kD의 두가지 분자량이 혼재된 단백다당류가 관찰되었으며, GMPG-CL에서는 12 kD의 분자량을 갖는 단백 다당류임을 확인 할 수 있었다. 또한 GMPG-CH와 GMPG-CL의 비율과 회수율을 총당의 농도를 계산(Dubois 등, 1956)하여 측정하였는데 비율은 고분자 대 저분자비가 15:84이었으며 실제 회 수량은 각각 15 mg/200 mg(GMPG-CH/GMPG), 76 mg/200 mg(GMPG-CL/GMPG)이었다.

GMPG, GMPG 고분자 및 저분자 분획들의 총당, 총단백질 함량을 측정(Smith 등, 1985)하였는데, GMPG는 85.9%의 총당과 12.8%의 단백질을 함유하고 있었다. GMPG-UH

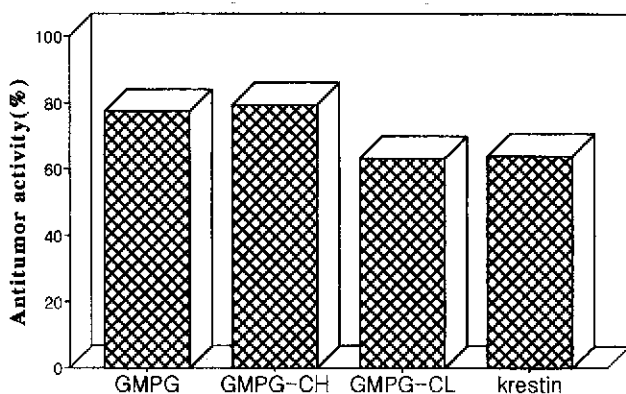


Fig. 4. Antitumor activity of each fraction and GMPG obtained from *G. lucidum* IY009.

와 GMPG-UL의 경우에는 75.7%와 72.7%의 당과 31.3%와 33.6%의 단백질을 함유하였으며, GMPG-CH와 GMPG-CL의 경우는 당과 단백질이 각각 96.9%와 87.1% 및 1.9%와 8.1%를 함유하고 있는 것으로 조사되었는데 한외여과 분획물들은 모두 당의 함량은 감소하고 단백질은 증가하였으며, column 분획물은 반대로 당함량은 증가하고 단백질 함량은 감소하였다.

GMPG, GMPG의 고분자 및 저분자 분획을 구성하는 당류의 종류를 알아보았는데 GC 분석한 결과 대부분 분획은 glucose, mannose, fructose, galactose, xylose와 소량의 ribose 및 arabinose를 함유하고 있었으며, α 와 β -glucose의 결합 비율이 0.84~1.14로 β -glucan이 주를 이루는 단백다당류이고, 저분자보다는 고분자가 더 많은 β -결합을 이루고 있는 것으로 조사되었다. 구성 아미노산의 조성은 대부분 분획이 Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, His, Lys 및 Arg 등 16종의 아미노산 조성을 갖는 것으로 조사되었다. GMPG 및 고분자와 저분자 분획들은 공통적으로 산성 아미노산인 Asp와 Glu가 높은 조성을 갖고 있으며, 중성 아미노산인 Ala와 Leu의 조성이 높게 함유하고 있는 것으로 조사되었다. 이와 같은 결과는 담자균류가 함유하고 있는 일반적인 아미노산 조성과 유사함을 확인 할 수 있었다. GMPG, GMPG의 고분자 및 저분자 분획의 당결합 양식을 알아보기 위해 IR spectrum으로 측정하여 구조를 알아보았다(Baker 등, 1956). 일반적으로 β -결합 다당류의 IR 흡수대는 $891 \pm 7 \text{ cm}^{-1}$ 부근에서 나타나고, α -결합은 860 cm^{-1} 부근에서 흡수대를 가지며, 당의 종류에 따라 약간씩 변경된 흡수대를 갖는 것으로 알려졌다(Brock 등, 1983). 실험 결과, 다당류에서 나타나는 일반적인 peak인 3400 cm^{-1} 부근에서의 O-H 신축진동, 2900 cm^{-1} 부근에서의 C-H 신축진동, 1400 cm^{-1} 부근에서의 CH₂ 변각진동, 1100 cm^{-1} 부근에서 C-O 변각진동 등의 특이적 흡수 peak가 공통적으로 나타났다. 또한 β -당의 결합양식을 결정짓는 890 cm^{-1} 부근에서의 흡수 peak는 GMPG-UH, GMPG-UL, GMPG-CH, GMPG-CL 분획들에서 육안 관찰되어 β -결합된 단백다당류임을 알 수 있었다. β -(1 \rightarrow 3)-glucan인 curdlan, zymosan A의 경우도 각각 887.1 cm^{-1} , 886.0 cm^{-1} 에서 흡수 peak가 나타났으며, α -결합구조인 starch는 858.4 cm^{-1} 부근에서 흡수 peak가 나타났다. ¹³C-NMR을 이용하여 GMPG, GMPG의 고분자 및 저분자들의 결합 형태 및 구조적 특성을 조사하였다. GMPG, GMPG 고분자 및 저분자, β -1,3-linked triple-helical glucopyranose의 표준 물질인 laminarin (obtained from *Laminaria digitata*, Sigma Co.)을 Saito 등(1987)의 방법으로 구조적 특성을 분석하였다. 일반적으로 β -결합 다당류의 C-1 peak는 103~105 ppm에서 나타나고, 반면 α -결합 구조는 97~101 ppm 부근에서 나타난다. 전형적인 linear β -(1 \rightarrow 3)-glucan 구조인 laminarin을 표준물질로 분석한 결과, β -1,3 anomer를 결정짓는 C-1 peak가 103.3 ppm에서 나타났으며, C-2, C-3, C-4, C-5 및 C-6의 peak는 각각 73.0 ppm, 86.4 ppm, 68.7 ppm, 76.6

ppm, 61.1 ppm에서 peak를 나타냈다. GMPG는 103.6 ppm에서 약한 C-1 peak가 관찰되며, GMPG-UH는 103.4 ppm에서, GMPG-UL은 103.7 ppm에서 각각 C-1 peak가 관찰되었고, GMPG-CH, GMPG-CL는 각각 103.2 ppm, 103.5 ppm에서 관찰되었다. 그러므로 이들은 모두 β -(1 \rightarrow 3) 구조를 갖는 단백다당류임을 알 수 있다. 반면에 GMPG, GMPG 고분자 및 저분자들 모두 97~101 ppm에서 peak가 관찰됨으로서 α -결합이 혼재되어 있는 단백다당류임이 확인되었다. 이는 구성당 분석시의 결과에서 α 와 β -glucose 결합 비율이 0.84~1.14인 것과 같은 결과이다.

GMPG, GMPG의 고분자 및 저분자 분획의 항암효과를 알아보기 위하여 sarcoma 180 고형암에 대한 증식저해율을 측정하여 보았는데, GMPG는 77.6%의 암세포 증식 저해율을 나타내었으며, column chromatography에 의한 분획물인 GMPG-CH와 GMPG-CL은 각각 79.6% 및 63.4%의 암세포 증식 저해율을 나타내었다. 이것은 β -결합 당의 함량이 높은 고분자 분획이 항암활성도 높게 나타나는 것을 알 수 있다. 또한 현재 일본에서 항암제 및 항암 보조제로 상업화되어 있는 krestin(obtained from *Coriolus versicolor*)은 64%의 sarcoma 180 암세포에 대한 증식저해율을 나타내었다. 일반적으로 담자균류 유래 다당류의 항암활성을 위해서는 β -form의 다당류 존재가 알려지고 있다. 이와 같은 결과로부터 GMPG의 항암활성은 풍부하게 존재하는 β -결합 단백다당류가 어떠한 역할을 할 것으로 추정된다.

적 요

항암 효과와 면역 활성 효과가 있는 영지 균사체의 alkali 추출 단백다당류인 GMPG와 이것을 모체로하여 한외여과를 이용한 고분자 단백다당류(GMPG-UH)와 저분자 단백다당류(GMPG-UL) 그리고 column 분획을 이용한 고분자 단백다당류(GMPG-CH)와 저분자 단백다당류(GMPG-CL)를 얻어서, 면역 항암 활성을 연구한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

GMPG, GMPG 고분자 및 저분자 분획들의 총당과 총단백질 함량을 측정한 결과, GMPG는 85.9% 및 12.8%, 한외여과 분획인 GMPG-UH와 GMPG-UL은 75.7% 및 72.7%의 당과 31.3%와 33.6%의 단백질, 컬럼 분획인 GMPG-CH와 GMPG-CL은 당과 단백질이 각각 96.9%와 87.1% 및 1.9%와 8.1%를 함유하고 있었다. 구성 당은 대부분 glucose, mannose, fructose, galactose, xylose와 소량의 ribose 및 arabinose를 함유하고 있었으며, α 와 β -glucose의 결합 비율이 0.84~1.14로 β -glucan이 주를 이루는 단백다당류이고, 저분자보다는 고분자가 더 많은 β -결합을 이루고 있는 것으로 조사되었다. 구성 아미노산의 조성은 공통적으로 산성 아미노산인 Asp와 Glu, 중성 아미노산인 Ala와 Leu이 다량 함유하고 있는 것으로 조사되었다. IR의 경우는 β -당의 결합양식을 결정 짓는 890 cm^{-1} 부근에서의 흡수 peak가 관찰되었다. 또한 ¹³C-NMR spectrum에서 GMPG,

GMPG 고분자 및 저분자, β -1,3 anomer를 결정 짓는 C-1 peak가 103~105 ppm에서 나타나 β -(1 \rightarrow 3)-glucan구조를 갖는 단백다당류임을 알 수 있었다. GMPG-CH와 GMPG-CL은 sarcoma 180 고형암에 대해 각각 79.6% 및 63.4%의 암세포 증식 저해율을 나타내었는데, 이것은 β -결합 당의 함량이 높은 고분자 분획이 항암활성도 높게 나타났다.

참고문헌

- Baker, S. A., E. Bourne, J. and Whiffen, D. H. 1956. Use of infrared analysis in the determination of carbohydrate structure. *Methods Biochem. Anal.* **3**: 213-245.
- Brock, K. and Pedersen, C. 1983. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **41**: 25-36.
- Dubois, M., K. Gilles, A., Hamilton, J. K., Robers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* **28**: 350-356.
- Han, M. D., Jeong, H., Lee, J. W., Baek, S. J., Kim, S. U. and Yoon, K. H. 1995. The composition and bioactivities of Ganoderan by mycelial fractionation of *Ganoderma lucidum* IY009. *Kor. J. Mycol.* **23**(4): 285-297.
- Hirofani, M., Ino, C., Furuya, T. and Shiro, M. 1986. Ganoderic acids T, S and R, new triterpenoids from the cultured mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**(5): 2282-2285.
- Kikuchi, T., Kanomi, S., Kadota, S., Murai, Y., Tsubono, K. and Ogita, Z. I. 1986. Constituents of the fungus *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. I. Structures of ganoderic acid C2, E, I, and K. lucidenic acid F and related compounds. *Chem. Pharm. Bull.* **34**(9): 3695-3712.
- Kim, B. K., Chung, H. S., Chung, K. S. and Yang, M. S. 1980. Studies on the antineoplastic components of korean basidiomycetes. *Kor. J. Mycol.* **8**(2): 107-113.
- Kohda, H., Tokumoto, W., Sakamoto, K., Fujii, M., Hirai, Y., Yamasaki, K., Komoda, Y., Nakamura, H., 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., Shimizu, M., Sonoda, Y. and Sato, Y. 1989. Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**(2): 531-533.
- Lee, J. W., Baek, S. J., Bang, K. W., Kim, Y. S., Han, M. D. and Ha, I. S. 1999. Characteristics of polysaccharide isolated from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. *Kor. J. Mycol.* **27**(6): 424-429
- Miyazaki, T. and Nishijima, M. 1981. Studies on fungal polysaccharides (XXVII), structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **29**: 3611-3616.
- 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 "Reishi," the fruit body of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Noeikagaku Kaishi* **58**(9): 871-880.
- Nishitoba, T., Sato, H., Kasai, T., Kawagishi, H. and Sakamura, S. 1984. New bitter C27 and C30 terpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi). *Agric. Biol. Chem.* **48**: 2905-2907.
- Saito, H., Tabeta, R., Yokoi, M. and Erata, T. 1987. A high-resolution solid-state ^{13}C NMR study of the secondary structure of linear (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans: A conformational elucidation of noncrystalline and crystalline forms by means of conformation-dependent ^{13}C chemical shifts. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **60**: 4259-4266.
- Smith P. K., Krohn, R. I., 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.
- Sone Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A. 1985. Structures and antitumor activities of the polysaccharide isolated from fruit body and growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Arig. Biol. Chem.* **49**(9): 2641-2653.
- Tomoda, M. and Gonda, R. 1986. Glycan structures of Ganoderan B and C, hypoglycemic glycans of *G. lucidum* fruit body. *Phytochem.* **25**(12): 2817-2820.
- Toth, J. O., Luu, B. and Ourisson, G. 1983. Les acides ganoderiques T a Z: triterpens cytotoxiques de *Ganoderma lucidum*. *Tetrahedron Letters* **24**(10): 1081-1084.