

상황(*Phellinus linteus*) 배양 균사체의 2차 대사산물에 대한 화학적 연구

송경식 · 조수목 · 고경수¹ · 한만우¹ · 유익동*

한국 과학기술연구원 유전공학 연구소, ¹(주) 한국신약 방촌천연물 연구소

초록: 상황(*Phellinus linteus*) 균사체 배양액의 ethyl acetate 가용성 분획으로부터 silica gel column chromatography 및 preparative thin layer chromatography를 이용하여 6개의 화합물을 분리, 정제하였다. 화합물 1은 표준품과의 비교에 의하여 succinic acid, 화합물 2는 ¹H-NMR 및 EI-MS로부터 *p*-hydroxyphenylacetic acid methyl ester로 동정되었으며, 화합물 3은 ¹H-NMR과 EI-MS에 의하여 *p*-hydroxybenzaldehyde로, 화합물 4와 6은 각종 NMR data와 MS data 및 이들의 아세틸 유도체의 spectral data로부터 각각 2-hydroxymethyl-5-methoxymethylfuran 및 2,5-dihydroxymethylfuran으로 동정되었다. 또한, 화합물 5는 ¹H-NMR data와 EI-MS에서의 m/z 179의 molecular ion peak로부터 *N*-acetyltyramine으로 추정되었으며 이 구조는 무수초산과 tyramine을 이용한 합성에 의하여 최종적으로 확인되었다(1994년 1월 19일 접수, 1994년 2월 28일 수리).

서 론

담자균류는 식용으로서 뿐만 아니라 그 분류학적 특성으로 인해 의약품의 개발 소재로서 많은 주목을 받아왔다.¹⁾ 그 결과 항생물질을 비롯하여^{2,3)} 항변이원성 물질,⁴⁾ 항콜레스테롤성 물질^{5,6)} 등 여러 가지 생리활성을 나타내는 화합물들이 보고되었다. 또한 이들 저분자 물질들 뿐만이 아니라, 항암 면역 활성을 갖는 다당류 Lentinan,⁷⁾ Krestin⁸⁾ 등과 같은 항암제 개발에 이르기까지 활발한 연구가 진행되어, 이들 균류는 생리활성물질의 자원으로서 각광을 받고 있다. 한편 前田⁹⁾ 등은 구름버섯(*Coriolus versicolor*), 혹은 표고버섯(*Lentinus edodes*)보다 Sarcoma 180에 대한 항암효과가 월등한 것으로 담자균류의 하나인 상황(*Phellinus linteus*)을 지목한 바 있는데, 상황은 문헌에 의하면¹⁰⁾ 회귀 한방 약재로서 옛부터 위통, 무릎관절통등에 사용되어 의약품 개발의 자원으로서 그 가능성이 시사되어져왔다. 그러나 상황은 자연계에서 분포 및 발생수가 극히 적어 자실체를 얻기 어려우며 인공배양 역시 어려운 것으로 알려져 이에 대한 화학적, 생화학적 연구가 거의 이루어지지 못하였다. 저

자 등은 최근 상황으로부터 균사체를 분리하고 대량 배양 시스템에 성공하였으며¹¹⁾ 따라서 이들 배양 균사체로부터 생리활성물질을 탐색하기로 하고 우선 균사체 배양액의 2차 대사산물을 조사하기위해 ethyl acetate 가용성 분획에 대한 화학적 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

상황의 배양 및 추출

상황의 배양은 이미 보고된 방법에 따라 실시하였으며¹¹⁾ 48시간 후 수확하여(약 8l) 수확한 배양액은 감압 하에서 Whatman No. 4 여지를 통과하여 여과하였다. 여액에 대하여 동량의 ethyl acetate로 3회 진탕 추출한 다음 ethyl acetate층을 취하고 포화 식염수액으로 씻어 내었다. 이들 ethyl acetate 가용성 분획에 무수 Na₂SO₄를 가하여 탈수, 여과 후 여액을 감압하 증발 건조 하여 암갈색의 추출물 약 2g을 얻었다.

정제

전술한 대로 얻은 추출물 약 1.8g을 취하여 CHCl₃:

Key words : *Phellinus linteus*(상황), 균사체 배양액, 2차 대사산물, succinic acid, *p*-hydroxyphenylacetic acid methyl ester, *p*-hydroxybenzaldehyde, 2-hydroxymethyl-5-methoxymethylfuran, 2,5-dihydroxymethylfuran, *N*-acetyltyramine

*Corresponding author : I.-D. Yoo

CH₃OH(1:1)의 혼합 용매에 녹였을 때 결정성 물질이 석출되었으며, 이를 여과, 재결정화하여 무색의 침상 결정 1을 얻었다. 한편, 여액은 증발 건조하여 1.5 g의 시료를 얻어 silica gel column chromatography에 의한 정제를 행하였다. Chromatography의 조건은 다음과 같다. 컬럼; Wakogel C-200(4.5×43 cm), 용출액; CHCl₃: CH₃OH=10:1부터 1:1(v/v)까지의 gradient 용출. 이 조작에 의해서 PLB-A부터 PLB-L의 12개의 분획을 얻었으며 이들 분획 중 PLB-C(23 mg)에 대하여 benzene: ethyl acetate=4:1을 전개용매로 하여 preparative thin layer chromatography(Merck, Art. 5715 TLC plate)를 행한 결과 4개의 band를 UV 254 nm와 10% H₂SO₄ 발색에 의하여 확인할 수 있었다. 이들 중 R_f 0.85, 0.78 및 0.42의 band를 각각 끊어내어 CHCl₃로 2회, CH₃OH로 1회 sonicator를 이용하여 추출한 다음 여과지로 여과하고 여액을 농축하여 각각 화합물 2(2.4 mg), 화합물 3(3.3 mg), 및 화합물 4(2.1 mg)를 얻었다. 또한, PLB-F에 대하여서도 prep.-TLC를 행하여 R_f 0.45부근의 band로부터 상기와 동일 조작에 의하여 화합물 5(7 mg)를 얻었으며 이때의 TLC 용매 조건은 CHCl₃: CH₃OH=10:1(v/v)이었다. 비교적 TLC 상에서 단일한 spot를 나타내는 PLB-G에 대하여는 silica gel에 의한 재정제를 행하여 {컬럼; Merck, Art. 7729(2.1×22 cm), 용출액; CHCl₃: CH₃OH=10:1(v/v)} 18.5 mg의 화합물 6을 얻었다.

기기 분석

¹H 및 ¹³C NMR(nuclear magnetic resonance)은 JEOL GSX 270에 의해 측정하였으며 chemical shift는 TMS(tetramethylsilane)를 기준으로 하여 δ(ppm)으로 나타내었다.

1, 6은 methanol-*d*₄에서 측정하였으며 나머지 화합물은 chloroform-*d*₁을 용매로 하여 측정하였다. EI-MS(electron impact-mass spectrometry)는 JEOL JMS-DX 303(70 eV)에서 측정하였으며 FAB-MS(fast atom bombardment-mass spectrometry)는 glycerin을 matrix로 하여 측정하였다.

아세틸화

화합물 5는 tyramine 10 mg에 무수초산 1 ml를 가한 후 곧바로 40°C에서 감압 농축하여 N-아세틸화하여 합성하였다. 화합물 6은 약 4 mg을 1 ml의 피리딘에 녹인 후 무수초산 1 ml를 가하고 TLC상에서 출발 물질이 없어질 때 까지 실온에서 약 2시간 방치 후 증발 건조

하였다. 화합물 4 약 1 mg에 대하여도 6과 동일한 방법으로 아세틸화를 행하였다.

결과 및 고찰

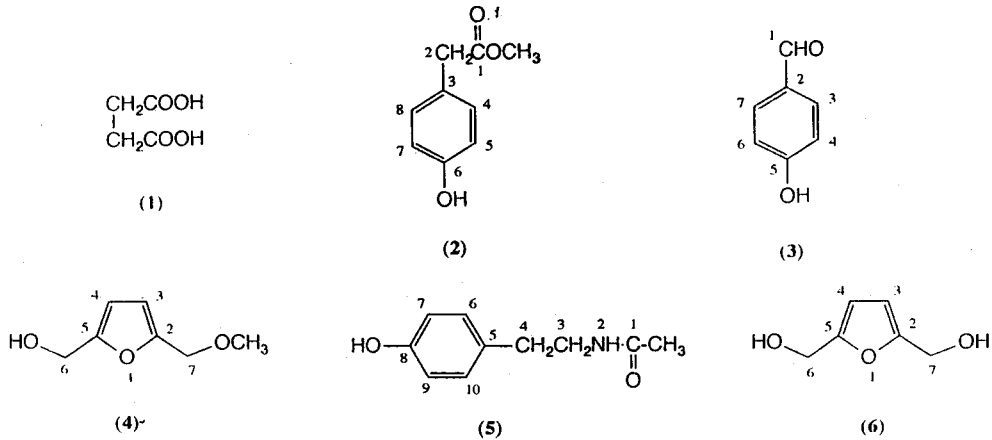
화합물 1은 표준품의 ¹H-NMR data 및 FAB-MS data를 직접 비교함으로써 succinic acid로 동정되었다.

화합물 2는 ¹H-NMR spectrum에서 δ6.77 및 7.13 ppm(각각 *d*, *J*=8.6 Hz)에 전형적인 *p*-치환 benzene ring의 공명을 보여주었으며, δ 5.19 ppm에 NH 혹은 OH에서 유래된 것으로 생각되는 broad singlet, δ 3.69 ppm의 methoxy 유래의 singlet 그리고 δ 3.56 ppm의 singlet methylene proton으로부터 *p*-hydroxyphenylacetic acid methyl ester로 추정되었으며 이는 EI-MS에서의 molecular ion peak([M⁺]=*m/z* 166) 및 base peak로서 검출된 *m/z* 107의 [M⁺]-59 peak(-carboxymethyl moiety)의 결과와도 잘 일치하였다.

화합물 3 역시 ¹H-NMR spectrum의 aromatic region(δ 6.95, 7.81 ppm 각각 2H, δ, *J*=8.6 Hz)에서 *p*-치환된 벤젠고리의 signal을 나타내었으며 δ 9.87 ppm에서 aldehyde 유래로 추정되는 singlet signal이 보여졌다. EI-MS에서 122의 분자량을 갖는 것이 확인되어 *p*-hydroxybenzaldehyde로 추정하였으며 이는 표준품과의 비교에 의하여 확인되었다.

화합물 5는 ¹H-NMR spectrum에서 δ 7.05과 6.78 ppm(각각, 2H, δ, *J*=8.6 Hz)의 *P*-치환된 benzene 유래의 공명과 δ 5.45 ppm의 broad singlet, δ 3.47 ppm(2H, *q*, *J*=6.8 Hz)과, δ 2.74 ppm(2H, *t*, *J*=6.8 Hz)의 methylene proton 및 δ 1.94 ppm의 acetyl singlet signal이 보여졌다. 한편 D₂O 처리에 의하여 δ 5.45 ppm의 signal은 소실되었으며 δ 3.47의 quartet은 triplet으로 변화하였는데 이는 δ 5.45 ppm의 exchangable proton이 δ 3.47 ppm proton과 서로 coupling을 하고 있다는 것을 나타내고 있다. 각각의 proton의 chemical shift와 splitting pattern 및 coupling constant들을 종합하여 판단할 때 이 화합물은 tyramine과 acetyl기가 amide bond로 결합되어 있는 *N*-acetyltyramine으로 추정되었다. 이와 같은 사실은 EI-MS에서의 *m/z* 179의 molecular ion peak와도 잘 일치하였으며 최종적인 동정은 무수초산과 tyramine으로부터 *N*-acetyltyramine을 합성하여 비교함으로써 확인하였다.

화합물 6은 ¹H-NMR에서 δ 6.20 및 4.54 ppm에서 두 개의 singlet resonance를 보여주었으며 ¹³C-NMR에서는 각각 한 개의 methylene carbon(δ 57.27 ppm)과 singlet

Fig. 1. Structures of the compounds isolated from the mycelial culture broth of *P. linteus*.Table 1. ¹H-NMR data* of the compounds isolated from the mycelial culture broth of *P. linteus*

No.	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	9.87 (s)**				
2		3.56 (s)		5.45 (<i>br.t</i>)	
3	7.81 (<i>d</i>)		6.25 or 6.28 (<i>d</i>)	3.47 (<i>q</i>)	6.20 (s)
4	6.95 (<i>d</i>)	7.13 (<i>d</i>)	6.25 or 6.28 (<i>d</i>)	2.74 (<i>t</i>)	6.20 (s)
5		6.77 (<i>d</i>)			
6	6.95 (<i>d</i>)		4.60 (s)	7.05 (<i>d</i>)	4.54 (s)
7	7.81 (<i>d</i>)	6.77 (<i>d</i>)	4.38 (s)	6.78 (<i>d</i>)	4.54 (s)
8		7.13 (<i>d</i>)			
9				6.78 (<i>d</i>)	
10		7.05 (<i>d</i>)			
CH ₃	3.69 (s)			3.90 (s)	1.94 (s)

*Measured in CDCl₃ and chemical shift are given in δ ppm relative from TMS.

**s, *d*, *br.t*, *t* and *q* in parenthesis represent singlet, doublet, broad triplet, triplet and quartet, respectively.

carbon(δ 154.00 ppm) 및 olefin carbon(δ 108.5 ppm)의 signal을 확인할 수 있었다. 이들 olefin 유래의 carbon 및 proton resonance의 화학이동치는 furan의 그것과 잘 일치하였다.¹²⁾ EI-MS에서 이 화합물은 128의 분자량을 나타내었으며 분자량에서 17이 빠진 111의 fragment가 보여 hydroxyl기를 함유하고 있음을 알 수 있었다. 또한, 2-D NMR에서 C-H long-range COSY에 의한 carbon과 proton과의 상관 관계를 조사한 결과 δ 154.00 ppm의 carbon이 δ 6.20 ppm의 olefin proton 및 δ 4.54 ppm의 methylene proton과 correlation spot를 나타내는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 사실들로 미루어 볼 때 화합물 6은 furan의 2, 5번 위치에 hydroxy methyl이 대칭형으로 붙어있는 2,5-dihydroxymethylfuran으로 사료되었다. 화합물 6은 피리딘과 무수초산에 의해 쉽게 아세틸화되었

으며 이는 ¹H-NMR에서 δ 2.06 ppm의 singlet methyl signal과 EI-MS의 *m/z* 212에 의하여 두개의 acetyl group이 도입되었음을 확인하였다.

화합물 4는 ¹H-NMR에서 δ 6.25 및 6.28 ppm(각각 ¹H, *d*, *J*=3.2 Hz)의 olefinic proton과 δ 4.60 및 4.38 ppm의 singlet methylene proton, 그리고 δ 3.90 ppm의 methoxy singlet resonance를 나타내어 이 화합물이 6과 매우 유사한 구조를 가지고 있는 비대칭형의 화합물임을 시사하였다. NMR data와 EI-MS에서 *m/z* 142의 molecular ion peak로 미루어 볼 때 4는 6의 한쪽 hydroxyl group이 methoxy로 치환된 화합물로 추정되었으며 acetyl화에 의하여 한 개의 acetyl기가 도입됨을 ¹H-NMR spectrum의 δ 2.05 ppm의 methyl signal과 EI-MS에서의 *m/z* 156 peak로부터 확인함에 따라 화합물 4는 2-hydroxy-

methyl-5-methoxymethylfuran임을 동정하였다. 이들 각 화합물들의 구조는 Fig. 1에 나타내었으며 ¹H-NMR의 data는 Table 1에 요약하였다.

화합물 4와 6은 서양참나무로부터 분리되어 백포도주의 발효와 숙성에 관련하고 있는 것으로 보고된 바 있으며¹³⁾ 저자 등은 화합물 6에 대하여 그 구조상의 특징을 고려하여 각종 금속 이온을 co-factor로 필요로 하는 효소들에 대한 저해작용을 검색 중에 있다. 또한, 화합물 5에 대하여는 이 화합물이 tyrosine과 유사한 구조를 갖고 있음을 고려하여 melanin 생합성과 관련된 tyrosinase의 inhibitor로서의 가능성을 검색하여 보았으나¹⁴⁾ 1000 ppm의 농도에서도 주목할만한 활성을 나타내지 못하였다. 상황균사체 배양액의 2차 대사산물은 비교적 매우 간단하였으며 이는 배양기간이 48시간으로 다소 짧아 대사의 중간 산물에 해당하는 화합물이 분리, 정제된 것으로 생각되어진다. 따라서, 현재 배양시간에 대한 재검토가 이루어지고 있으며 이들이 생산하는 2차 대사산물과 그들의 생리활성에 대하여는 추후 발표할 예정이다 있다.

감사의 글

NMR 및 MS의 측정을 도와 주시고 구조해석에 많은 도움을 주신 일본 静岡大學의 河岸 洋和 教授에게 진심으로 감사합니다.

참 고 문 헌

1. 水野 卓:きのこの化學・生化學, 학회 출판센터, 동경

(1992)
 2. Heim, J. and Anke, T.: J. of Antibiot., 41 : 1752 (1988)
 3. St k, A. and Anke, T.: Z. Naturforsch, 43c : 177 (1988)
 4. Hannan, M. A., Al-Dakan, A. A., Aboul-Enein, H. Y. and Al-Othaimeen, A. A.: Mutagenesis, 4 : 111 (1989)
 5. Tokita, F., Shibukawa, N., Yasumoto, T. and Kaneda, T.: Mushroom Sci., VIII : 783(1971)
 6. Suhadolnik, R. J.: In 'Induction of Hypocholesterolemia', John Wiley and Sons, New York, p.298-310 (1979)
 7. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F.: Cancer Res., 30 : 2776(1970)
 8. 平瀬 進: 藥學 雜誌, 96 : 413(1976)
 9. 前田 幸子: 蛋白質酵素核酸, 21 : 426(1976)
 10. 江蘇新醫學院編: 中藥大辭典, p.28, 상해 과학기술 출판사, 홍콩(1977)
 11. 한만우, 고경수, 정경수: 한국 특허공보 제93-19192호 (1993)
 12. Pretsch, E., Simon, W., Seibl, J. and Clere, T.: In 'Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds (2nd Ed.)', p. C135, Springer-Verlag Berlin(1989)
 13. Chatonet, P., Dubourdieu, D. and Boidron, J. N.: Sci. Aliments, 12 : 665(1992)
 14. Tomita, K., Oda, N., Ohbayashi, M., Kamei, H., Miyaki, T. and Oki, T.: J. of Antibiot., 43 : 1601(1990)

Secondary Metabolites from the Mycelial Culture Broth of *Phellinus linteus*

K.-S. Song, S.-M. Cho, K.-S. Ko¹, M.-W. Han¹ and I.-D. Yoo* (Genetic Engineering Research Institute, Korea Institute of Science and Technology, P.O.Box 105, Yusoung-Gu Taejon, Korea 305-600 and ¹Bangchon Natural Products Research Institute, Han Kook Sin Yak Pharm. Co. Ltd. 610-7 Kwanjeodong Seogu Taejon, Korea 302-243)

Abstract : From the 48 hour-cultured mycelial broth of *Phellinus linteus*, six compounds were isolated by means of ethyl acetate extraction, silica gel column chromatography and preparative thin layer chromatography, consecutively. Compound 1 was identified as a succinic acid by the comparison of its spectral data with authentic sample. Compounds 2 and 3 were identified as *p*-hydroxyphenyl acetic acid methyl ester and *p*-hydroxybenzaldehyde by spectroscopic studies, respectively. NMR and MS studies of compound 6 revealed that it was 2,5-dihydroxymethyl furan. Compound 4, which showed similar NMR absorptions and MS fragmentation pattern with those of compound 6 was identified as 2-hydroxymethyl-5-methoxymethylfuran. These structures were verified by the spectral data of the acetate derivatives of the compounds. Compound 5 was supposed to be a *N*-acetyltyramine from its ¹H-NMR and EI-MS data, and its structure was confirmed by a synthesis starting from tyramine.