

능이버섯 (*Sarcodon aspratus*)으로부터 분리한 저분자 화합물의 화학구조

강희철 · 윤봉식 · 유승현¹ · 유익동*

생명공학연구소 항생물질연구실, ¹충남대학교 농생물학과

초 록 : 식용버섯 유래의 저분자 대사산물을 탐색하던 중 충남 계룡산 일대에서 채집한 능이버섯(*Sarcodon aspratus*)으로부터 7종의 화합물을 분리하였다. 능이버섯을 메탄올에 추출한 후 용매분획하여 그 중 화합물이 많이 함유된 chloroform층과 ethyl acetate층에 대하여 각각 silica gel 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였다. 주요 대사산물을 함유하고 있는 분획물을 TLC 및 분취용 HPLC를 사용하여 최종적으로 정제하여 7종의 화합물을 분리하였다. 이들 화합물은 ¹H NMR, mass 분석 및 문헌 data와 비교하여 각각 4-hydroxybenzoic acid methyl ester, 4-hydroxybenzaldehyde, cyclo(Ala-Pro), adenosine, nicotinamide, BL V, linoleic acid으로 동정되었다. (2000년 7월 9일 접수, 2000년 9월 7일 수리)

서 론

버섯의 주요성분은 1차 대사산물로 필수아미노산을 포함한 단백질, 지방, 비타민, 탄수화물, 섬유질, 미네랄, 핵산 등으로 크게 구분할 수 있으며, 또한 다양한 구조의 생물활성을 지닌 저분자 2차 대사산물들을 포함하고 있다. 이들 성분들의 역할은 버섯의 생육 또는 기주체의 생육과 관련하여 광범위하게 알려져 있다. 최근 버섯의 자실체, 균사체 및 대사산물을 의약품 및 기능성식품 등으로 이용하려는 연구가 다방면으로 진행되고 있다.

능이버섯(*Sarcodon aspratus* (Berk) S. Ito)은 민주름버섯목(Aphyllophorales) 굴뚝버섯과(Thlephoraceae)에 속하는 담자균류로 크기는 10~20 cm, 갓의 직경은 10~20 cm이며 중심부가 깊이 파여 있는 특징을 지니고 있다. 또한 포자는 유구형으로 담갈색을 띄며 직경이 약 5~6 μm의 크기이다. 균근균으로서 인공배양은 안되며 배양 균사체로부터 자실체를 얻기 위한 연구가 진행 중에 있다.

능이버섯은 예로부터 육류를 섭취한 후 체한데 복용하면 큰 효능이 있다는 민간요법에 따라 이들이 생산하는 소화효소를 추출, 정제하여 특성을 밝히는 연구가 다수 진행되었다. 즉 Lee 및 Eun 등은 능이버섯이 생산하는 protease 및 cellulase등의 소화효소의 역가, 소장내 가수분해정도, 위산에 대한 안정성등을 조사하여 단백 소화 효소제로서의 제품개발 가치성 및 제제화에 관한 연구를 보고한 바 있다.^{1,3)} 그 외에 Park은 능이버섯의 아미노산 조성 및 미량금속의 함량을 보고한 바 있다.^{4,5)} 이같이 능이버섯의 고분자 생리활성물질 및 아미노산, 미량금속에 관한 연구는 다수 진행되었으나 생리활성 저분자 화합물에 관하여는 연구된 바 없다.

저자들은 한국 자생버섯으로부터 저분자 화합물을 분리하고 이들의 생물활성을 조사하는 연구를 수행하여 왔다.^{6,12)} 이 과정에서 충남 동학사 주변에서 채취한 식용버섯인 능이버섯으로부터 다수의 저분자 화합물을 분리 정제하고 화학구조를 규명하였기에 보고한다.

재료 및 방법

실험재료

능이버섯(*Sarcodon aspratus*)은 충남 공주군 계룡산 근교에서 채집한 것으로 음건 세절한 다음 분리 정제용 시료로 사용하였다.

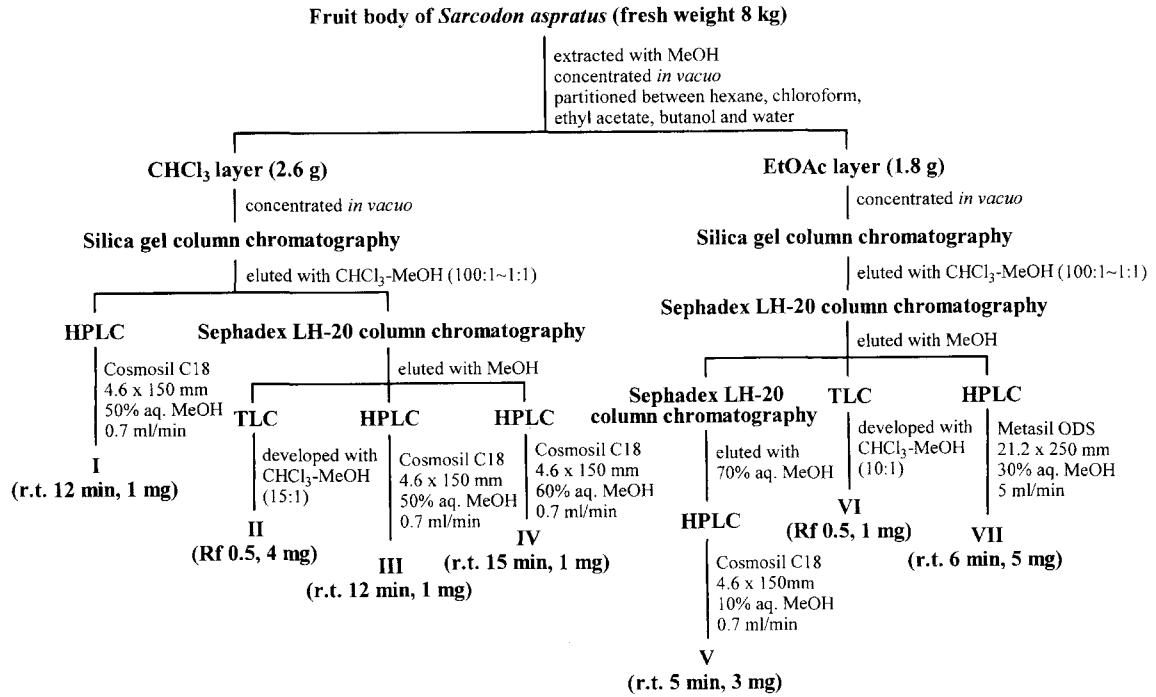
추출 및 분리

Chloroform 층을 감압농축한 후 농축물 2.6 g을 silica gel에 흡착시켜 chloroform : methanol = 100 : 1~1 : 1을 전개용매로 하여 단계적으로 silica gel column(Merck, φ4×20 cm) chromatography를 실시하였다. 그 결과 두 개의 분획물을 얻었으며 그 중에 하나를 Cosmosil C18 column을 사용, HPLC를 수행하여 화합물 I 1 mg을 분리하였다. 다른 분획물은 메탄올을 전개용매로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 세 개의 분획물을 얻었다. 이들 각각의 분획물을 preparative TLC 및 HPLC로 정제하였으며 그 결과 화합물 II 4 mg, III 및 IV 각각 1 mg을 분리하였다. 또한 ethyl acetate 층을 감압 농축한 후 농축물 1.8 g을 chloroform : methanol = 100 : 1~1 : 1을 전개용매로 하여 silica gel column chromatography를 수행하고 계속하여 메탄올을 전개용매로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였다. 그 결과 세 개의 분획물을 얻었으며 첫 번째 분획물로부터는 70% MeOH을 용매로 하여 재차 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시한 후 HPLC를 수행하여 화합물 V 3 mg을, 두 번째 분획물로부터는 chloroform:methanol = 10 : 1을 전개용매로 하여 preparative TLC로 정제하여 화합물 VI 1 mg

찾는 말 : 능이버섯(*Sarcodon aspratus*), 4-hydroxybenzoic acid methyl ester, 4-hydroxybenzaldehyde, cyclo(Ala-Pro), adenosine, nicotinamide, BL V, linoleic acid

*연락처 : Tel : 82-42-860-4330; Fax : 82-42-860-4595

E-mail : idyoo@mail.kribb.re.kr



Scheme 1. Isolation procedure of compounds I-VII.

을, 세 번째 분획물로부터는 HPLC로 정제하여 화합물 VII 5 mg을 분리하였다. 분리 정제과정을 scheme 1에 나타내었다.

기기분석

정제한 화합물들의 UV spectrum은 methanol을 용매로하여 UVIKON spectrophotometer 930(Kontron instrument)으로 측정하였고 EI-mass는 JEOL JMS-SX102A spectrometer를 사용하여 측정하였다. NMR spectrum은 Varian사의 UNITY300 및 UNITY500 NMR spectrometer를 사용하였으며, 내부표준물질로는 TMS(tetramethylsilane)를, 측정용매로는 CD₃OD 및 CDCl₃를 사용하였다. HPLC는 Waters사의 제품으로 pump는 Waters 510, detector는 Waters 991 photodiode array detector를 사용하여 수행하였다.

시약

능이버섯 추출물로부터 화합물을 분리하기 위하여 사용한 각종수지 및 용매는 다음과 같다. Silica gel은 70-230 mesh 크기의 silica gel을 Merck Co.로부터 구입하였으며, Sephadex LH-20 resin은 Pharmacia Co.로부터 구입 사용하였다. Analytical TLC 및 reverse phase(ODS) TLC는 Merck사의 silica gel 60F₂₅₄ aluminium plate 및 RP-18 F₂₅₄S plate를 사용하였다. HPLC용 column은 Cosmosil C18(φ4.6×150 mm)과 Metasil 5 μ ODS(φ21.2×250 mm)로, 용매는 HPLC용 용매를 구입 사용하였다. 그 외의 시약은 일급시약을 구입하여 정제하지 않고 사용하였다.

결과 및 고찰

능이버섯 8 kg에 메탄올을 가하여 실온에서 2회 추출한 다음

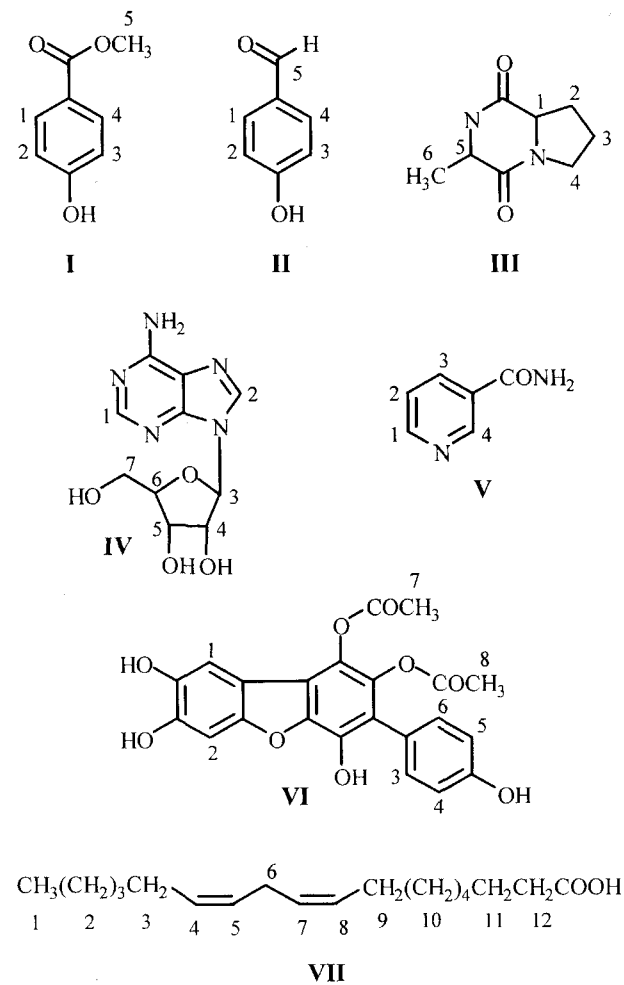


Fig. 1. Structures of compounds I-VII isolated from the mushroom *Sarcodon aspratus*.

Table 1. ¹H NMR spectral data of the compounds isolated from *Sarcodon aspratus*

No.	I	II	III	IV
1	7.78 (d, <i>J</i> =8.82 Hz) ^a	7.77 (d, <i>J</i> =8.62 Hz)	4.23 (m)	8.23 (s) ^b
2	6.68 (d, <i>J</i> =8.82 Hz)	6.93 (d, <i>J</i> =8.62 Hz)	2.30 (m), 1.98 (m)	8.12 (s) ^b
3	6.68 (d, <i>J</i> =8.82 Hz)	6.93 (d, <i>J</i> =8.62 Hz)	1.98 (m)	5.92 (d, <i>J</i> =6.12 Hz)
4	7.78 (d, <i>J</i> =8.82 Hz)	7.77 (d, <i>J</i> =8.62 Hz)	3.54 (m)	4.29 (br. s)
5	3.81 (s)	9.77 (s)	4.23 (m)	4.16 (br. s)
6			1.38 (d, <i>J</i> =6.87 Hz)	3.21 (br. s)
7				3.70 (br. d, <i>J</i> =12.8 Hz) 3.80 (br. d, <i>J</i> =12.8 Hz)

No.	V	VI	VII
1	8.69 (br. d, <i>J</i> =4.85 Hz)	7.14 (s) ^c	0.97 (t, <i>J</i> =7.39 Hz)
2	7.47 (dd, <i>J</i> =7.94, 4.85 Hz)	7.07 (s) ^c	1.29 (m)
3	8.26 (dt, <i>J</i> =7.94, 1.75 Hz)	7.21 (d, <i>J</i> =8.61 Hz)	2.05 (m)
4	9.03 (br. s)	6.87 (d, <i>J</i> =8.61 Hz)	5.35 (m)
5		6.87 (d, <i>J</i> =8.61 Hz)	5.35 (m)
6		7.21 (d, <i>J</i> =8.61 Hz)	2.77 (t, <i>J</i> =5.75 Hz)
7		2.45 (s)	5.35 (m)
8		1.99 (s)	5.35 (m)
9			2.05 (m)
10			1.29 (m)
11			1.62 (m)
12			2.29 (t, <i>J</i> =7.52 Hz)

Compounds I, II, III, IV and VII were measured in CD₃OD, and V and VI were measured in a mixture of CDCl₃ and CD₃OD. ^aProton multiplicity and coupling constants in parenthesis (s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; dt, doublet of triplets; br., broad; t, triplet; m, multiplet). ^{b,c}chemical shifts were interchangeable.

감압하에서 용매를 제거하였다. 용매를 제거시킨 잔여물에 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol을 순차적으로 가하여 극성을 높여가며 용매분획을 실시하였다.

Chloroform 층을 감압농축한 후 농축물을 silica gel 및 Sephadex LH-20 column chromatography, preparative TLC, HPLC로 정제하여 화합물 I-IV를 분리하였고 또한 유사한 정제방법에 의하여 ethyl acetate 층으로부터 화합물 V-VII를 분리하였다. 상기 7종의 화합물의 화학구조(Fig. 1)가 다양한 분광학적 방법에 의하여 결정되었으며 각 화합물의 구조적 특성은 다음과 같다.

화합물 I: ¹H NMR spectrum(500 MHz, CD₃OD, Table 1)을 측정된 결과 7.78 및 6.68 ppm에서 각각 2H분의 aromatic doublet proton이 관찰되었고 8.82 Hz의 결합상수로부터 이들 proton은 1,4-disubstituted benzene에 기인하는 것임을 알았다. 또한 3.81 ppm에서 methyl ester proton이 관찰되었다. 이들 결과를 근거로 본 화합물은 4-hydroxybenzoic acid methyl ester로 추정되었다. 따라서 기존에 보고된 4-hydroxybenzoic acid methyl ester의 ¹H NMR spectrum¹³⁾과 본 화합물의 ¹H NMR spectrum을 비교한 결과 spectrum이 동일하고 표준시료와 HPLC의 retention time을 비교한 결과 동일하여 화합물 I의 구조를 4-hydroxybenzoic acid methyl ester로 결정하였다.

화합물 II: 화합물 II의 ¹H NMR spectrum을 측정된 결과 화합물 I과 매우 유사하였다. 그러나 화합물 I에서 관찰되었던 methyl ester proton이 본 화합물에서는 관찰되지 않았고 반면 9.77 ppm에서 aldehyde proton으로 추정되는 methine proton이 부가적으로 관찰되었다. 따라서 본 화합물의 구조를 4-

hydroxybenzaldehyde로 추정하였으며 이는 기보고된 4-hydroxybenzaldehyde의 ¹H NMR spectrum¹³⁾과 잘 일치하였다.

화합물 III: 화합물 III의 ¹H NMR spectrum을 측정된 결과 4.23 ppm에서 2H분의 proton, 3.54 ppm에서 2H분의 proton, 2.30 및 1.98 ppm에서 4H분의 proton 및 1.38 ppm에서 doublet methyl proton이 관찰되었다. 이들 proton의 결합형태를 규명하기 위하여 DQF-COSY를 측정, 해석하였으며 그 결과 본 화합물을 구성하는 두 개의 부분구조 CH₃-CH< 및 >CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-을 밝혔다. 이들 결과로부터 본 화합물은 두 개의 아미노산 즉 alanine과 proline으로 구성된 diketopiperazine 화합물로 추정되었다. 본 화합물의 최종 구조는 EI-mass에 의하여 확인되었으며 EI-mass 측정 결과 *m/z* 168에서 M+ 피크가 관찰되어 본 화합물의 구조를 cyclo(Ala-Pro)로 결정하였다.

화합물 IV: 화합물 IV 1 mg을 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정된 결과 8.23 및 8.12 ppm에서 각각 1H분의 aromatic singlet proton이 관찰되었고 5.92, 4.29, 4.16, 3.80, 3.70, 3.21 ppm에서 각각 1H분의 proton이 관찰되었다. 이들 proton의 결합형태와 5.92 ppm의 anomeric proton으로부터 본 화합물은 5탄당의 부분구조를 지녔음을 알았다. 또한 저자장 영역의 8.23 및 8.12 ppm의 proton은 adenine 특유의 피크들로서 이들을 종합하여 화합물 IV는 adenine과 ribose로 구성된 adenosine으로 추정되었다. 따라서 기존에 보고된 adenosine의 ¹H NMR spectrum¹³⁾과 본 화합물의 ¹H NMR spectrum을 비교한 결과 spectrum이 동일하여 화합물 IV의 구조를 adenosine으로 동정하였다.

화합물 V: 화합물 V의 ¹H NMR spectrum을 측정된 결과

9.03, 8.69, 8.26 및 7.47 ppm에서 각각 1H분의 aromatic proton이 관찰되었고 이들 proton들이 지닌 7.94 및 4.85 Hz의 독특한 결합상수는 본 화합물이 pyridine계 화합물임을 나타내었다. 이들 proton들의 결합상수의 해석으로부터 본 화합물은 3-monosubstituted pyridine으로 추정되었으며 이를 근거로 database를 검색한 결과 화합물 V는 nicotinamide와 동일한 화합물로 동정되었다.

화합물 VI: 화합물 VI의 구조해석을 위하여 UV, ¹H NMR 및 HMBC spectrum을 측정 해석하였다. ¹H NMR spectrum을 측정한 결과 7.21과 6.87 ppm에서 1,4-disubstituted benzene에 기인하는 각각 2H분의 aromatic proton이 관찰되었고 7.14 및 7.07 ppm에서 singlet aromatic methine, 2.45와 1.99 ppm에서 두 개의 methyl기가 관찰되었다. 본 화합물의 화학구조를 규명하기 위하여 HMBC spectrum을 측정 해석하였다. 그 결과 7.14 및 7.07 ppm의 aromatic methine proton으로부터 각각의 ortho- 및 meta-position에 있는 사급탄소에 long-range coupling이 관찰되어 이들 proton은 상호간에 para 위치에 존재하고 있음을 알았다. 또한 2.45와 1.99 ppm의 methyl proton으로부터 각각 carbonyl 탄소에 long-range correlation을 나타내어 구조중에 두 개의 acetyl group이 존재함을 알았다. 이같은 부분구조 및 328, 299, 265 nm에서 최대흡수치를 나타내는 UV spectrum을 근거로 database 검색을 실시한 결과 본 화합물은 버섯 *Boletopsis leucomelas*로부터 분리 보고된 분자식 C₁₈H₁₂O₂, 분자량 340의 terphenyl 화합물인 BL V와 동일한 화합물이었다.¹⁴⁾

화합물 VII: 화합물 VII의 ¹H NMR spectrum을 측정한 결과 5.35 ppm에서 olefinic proton이 관찰되었고 2.77 ppm에서 triplet의 methylene proton, 2.3-1.2 ppm사이에 다수의 methylene proton 및 0.97 ppm에서 triplet의 methyl proton이 관찰되었다. 1.29 ppm에서 다수의 methylene으로 구성된 alkyl chain의 존재와 2.29 ppm에서 지방산의 carboxylic acid에 결합한 methylene proton으로부터 본 화합물은 불포화 지방산 화합물로 추정되었다. 따라서 불포화 지방산을 대상으로 화합물을 검색한 결과 화합물 VII은 linoleic acid와 동일한 화합물로 결정되었다.

능이버섯(*Sarcodon aspratus*)은 한국과 일본등지에 분포하는 버섯으로 향기, 향암, 항알레르기 성분을 함유한 것으로 보고된 바 있다.¹⁵⁾ 비록 같은 *Sarcodon*속인 *Sarcodon scabrosus*로부터 scabronines A-G¹⁶⁾가 분리된 바 있고 또한 *Sarcodon leucopus*의 자실체로부터 p-terphenyl 계열의 항균활성물질¹⁷⁾이 분리 보고된 바 있으나 능이버섯으로부터의 저분자 화합물에 관한 연구는 보고된 바 없다. 비록 분리된 화합물 I-VII은 이미 천연물 및 미생물의 대사산물로부터 분리 보고된 바 있으나 이들 화합물들은 버섯에서 가장 흔히 분리되는 것으로 버섯 저분자 화합물에 관하여 연구하는 연구자들에게 화합물의 분리 동정에 도움이 되고자 화학구조적 특성 및 NMR 분석을 근거로 기술하였다. 각 화합물의 ¹H NMR 피크의 귀속을 Table 1에 나타내었다.

참고문헌

- Eun, J. S., Yang, J. H., Cho, D. Y. and Lee, T. K. (1988) Studies on higher fungi in Korea(I). Activity of proteolytic enzyme from *Sarcodon aspratus*(Berk) S. Ito. *J. Kor. Pharm. Sci.* **18**, 125-131.
- Eun, J. S., Yang, J. H., Lee, T. K. and Choi, D. S. (1989) Studies on higher fungi in Korea(V). N-terminal amino acid sequence and some properties of proteolytic enzyme from *Sarcodon aspratus*. *Yakhak Hoeji* **33**, 339-344.
- Lee, T. K., Eun, J. S., Yang, J. H., Jo, D. Y. and Yang, H. C. (1989) Studies on higher fungi in Korea(III). Purification and stability of proteolytic enzyme in *Sarcodon aspratus*(Berk) S. Ito. *J. Kor. Pharm. Sci.* **19**, 81-86.
- Park, W. H. (1983) Studies on the components of *Sarcodon aspratus*(I). *Kor J. Mycol.* **11**, 85-89.
- Park, W. H. (1983) Studies on the components of *Sarcodon aspratus*(II). *Kor J. Mycol.* **11**, 159-162.
- Hwang, J. S., Song, K. S., Kim, Y. S., Seok, S. J., Lee, T. H. and Yoo, I.-D. (1996) Lipid peroxidation Inhibitors from *Polyzellus multiplex*. *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* **24**, 591-596.
- Kim, J.-P., Yun, B.-S., Shim, Y.-K. and Yoo, I.-D. (1999) Inoscavin A, a new free radical scavenger from the mushroom *Inonotus xeranticus*. *Tetrahedron Lett.* **40**, 6643-6644.
- Koshino, H., Lee, I. K., Kim, J. P., Kim, W. G., Uzawa, J. and Yoo, I.-D. (1996) Agrocybenine, novel class alkaloid from the Korean mushroom *Agrocybe cylindrocea*. *Tetrahedron Lett.* **37**, 4549-4550.
- Lee, I.-K., Jeong, C.-Y., Cho, S.-M., Yun, B.-S., Kim, Y.-S., Yu, S.-H., Koshino, H. and Yoo, I.-D. (1996) Illudins C₂ and C₃, new illudin C derivatives from *Coprinus atramentarius* ASI20013. *J. Antibiotics* **49**, 821-822.
- Lee, S.-J., Yun, B.-S., Cho, D.-H. and Yoo, I.-D. (1999) Tylopeptins A and B, new antibiotic peptides from *Tylopilus neofelleus*. *J. Antibiotics* **52**, 998-1006.
- Yun, B.-S., Lee, I.-K., Kim, J.-P. and Yoo, I.-D. (2000) Curtisians A-D, new free radical scavengers from the mushroom *Paxillus curtisii*. *J. Antibiotics* **53**, 114-122.
- Yun, B.-S., Lee, I.-K., Kim, J.-P. and Yoo, I.-D. (2000) Two p-terphenyls with free radical scavenging activity from the mushroom *Paxillus panuoides*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 233-237.
- Pouchert, C. J. and Behnke, J. (1993) In 'The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra,' 1st Ed., pp. - , Aldrich Chemical Company, Inc., New York, USA.
- Takahashi, A., Kudo, R., Kusano, G. and Nozoe, S. (1992) 5-lipoxygenase inhibitors isolated from the mushroom *Boletopsis leucomelas*(Pers.) Fayod. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 3194-3196.
- Fujimoto, D., Takahashi, H., Morita, J. and Tateishi, K. (1986) Extraction of antiallergy koustin from mushrooms. Japan patents JP 61-200923, JP 63-297400, JP 4-45793, JP 61-207339.
- Obara, Y., Nakahata, N., Kita, T., Takaya, Y., Kobayashi, H., Hosoi, S., Kiuchi, F., Ohta, T., Oshima, Y. and Ohizumi, Y. (1999) Stimulation of neurotrophic factor secretion from 1321N1 human astrocytoma cells by novel diterpenoids, scabronines A and G. *Eur. J. Pharmacol.* **370**, 79-84.
- Tringali, C., Piattelli, M., Geraci, C., Nicolosi, G. and Rocco,

- C. (1987) Previously unreported *P*-terphenyl derivatives with antibiotic properties from the fruiting bodies of *Sarcodon leucopus*(Basidiomycetes). A two-dimensional nuclear magnetic resonance study. *Can. J. Chem.* **65**, 2369-2372.

Chemical Structures of the Compounds Isolated from the Edible Mushroom *Sarcodon aspratus*

Hee-Chol Kang, Bong-Sik Yun, Seung-Hun Yu¹ and Ick-Dog Yoo*(*Antibiotics Research Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Yusong, Taejon 305-600; ¹Department of Agricultural Biology, Chungnam National University, Yusong, Taejon 305-764, Korea*)

Abstract : In our investigation on chemical constituents of edible mushrooms, seven compounds **I-VII** have been isolated from the methanolic extract of the fruit body of *Sarcodon aspratus*. The methanolic extract was separated by solvent partition, silica gel column chromatography and Sephadex LH-20 column chromatography, and compounds **I-VII** were finally purified by preparative HPLC or TLC. Their structures were assigned as 4-hydroxybenzoic acid methyl ester, 4-hydroxybenzaldehyde, *cyclo*(Ala-Pro), adenosine, nicotinamide, BL V, linoleic acid, respectively, on the basis of mainly ¹H NMR spectra.

Key words: *Sarcodon aspratus*, 4-hydroxybenzoic acid methyl ester, 4-hydroxybenzaldehyde, *cyclo*(Ala-Pro), adenosine, nicotinamide, BL V, linoleic acid

*Corresponding author