

영지 버섯의 유리 아미노산 및 유도체에 관한 연구

이현아¹ · 김병각¹ · 현진원^{2*}

¹서울대학교 약학대학

²제주대학교 의과대학

Free Amino Acids and Their Derivatives of *Ganoderma lucidum*

Hyun Ah Lee¹, Byung Kak Kim¹, and Jin Won Hyun^{2*}

¹College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742

²Department of Biochemistry, Cheju National University College of Medicine, 1 Ara-1 dong, Jeju, 690-756, Korea

(Received June 1, 2004 / Accepted June 15, 2004)

ABSTRACT : To find active components in *Ganoderma lucidum*, their free amino acid and free amino acid derivatives were analyzed. After extracting with hot water, the extracts were filtrated by three steps. So, supernatants below 10,000 dalton were obtained. Filtrates were derivativated with PITC (phenylthiocarbamyl) derivative reagent and PITC amino acid was obtained. Then, they were analyzed by RP-HPLC. 13 amino acids were analyzed in cultured Korean Nok-kak ji (one of *Ganoderma lucidum*), 15 amino acids in cultured Korean *Ganoderma lucidum*, 12 amino acids wild *Ganoderma lucidum*, 16 amino acids in cultured Taiwan *Ganoderma lucidum*.

Key words : *Ganoderma lucidum*, amino acid, RP-HPLC, PITC

서 론

담자균류는 고등균류에 속하며 여러 용도로 사용되고 있고 많은 연구가 이루어져 왔다. 유효 성분과 관련한 연구로는 Ford 등 (1909)이 *Amanita*속에서 amanitotoxin을, 항암 성분에 관해서는 Roland 등 (1960)이 *Calvatia gigantea*에서 calvacin을 보고한 이래 많은 연구가 진행되고 있다. 우리나라에서는 Lee 등 (1959)이 처음 담자균류의 분류를 시작한 이래 (Lee et al., 1959) 고등균류의 성분 연구로는 Kim 등이 alkaloids를 확인하였고 (Kim et al., 1971) 또한 Kim 등 (1977)이 아미노산 함량분석도 실시하는 것으로부터 그 성분과 약효에 관한 연구가 계속되어 왔다 (Kim et al., 1977). 본 실험실에서는 한국산 고등 균류에 관한 실험을 계속 연구하였으며 최근엔 여러 기기들의 발달로 성분분리가 용이해 짐에 따라서 한국산 고등균류의 성분 연구에 대한 관심이 높아지고 있다.

영지는 담자균류의 Polyporaceae에 속하고 그 학명은

*Ganoderma lucidum*이다. *Ganoderma* 속은 Karsten (1881)에 의해 처음 명명되었고 Bazello와 Wright는 *Ganoderma lucidum*이 매우 유사한 종들의 복합체라는 연구 결과를 발표하였다. 영지는 불로초 혹은 만년버섯이라고도 불리우는데 전형적인 wood rotting fungi로서 다양한 종이 한국에서 재배 중이다. 그 자실체 추출액은 동양의학에서 중요한 약으로 사용되어 간염, 고지혈증, 고혈압, 위암 등에 응용되어 왔으며 본 실험실에서는 균사체 및 자실체 성분은 항암작용, 항알리지작용, 항고혈압작용, 면역증강작용 등 다양한 생리활성을 규명하였다 (Kang et al., 1989; Park et al., 1987; Lee et al., 1986). 또한 무기성분에 관한 연구와 sterol 성분 연구, protoplast 형성과 재생 등에 관한 연구도 보고되었다 (Shin et al., 1985; Choi et al., 1987). 영지 속의 분류는 자실체의 다양한 모양, 포자의 구조적인 성격에 의해 이루어져 왔는데 균사체 일때는 그 구분이 힘들고 분말이 되었을 때에도 그 분별이 어려워 다른 방법에 의한 종의 결정법이 필요하다. 그래서 각종의 효소를 검출하여 영지 분류에 응용하기도 하였다.

Amino acid란 Amino group, NH₂, acid carboxyl

*To whom correspondence should be addressed

group, COOH를 함유한 유기 화합물로서 단백질을 구성하는 아미노산과 유리 아미노산으로 분류할 수 있다. 유기 체 내에선 일반적으로 양극성을 띠는 특징을 가지기 때문에 무기염에서의 아미노산 분리는 매우 어렵고 (Scott 1969) 상당한 샘플의 정제를 필요로 한다. 경우에 따라 아미노산은 수용성인 것과 아닌 것이 존재한다. 일반적으로 단백질의 구성성분으로 20여종의 아미노산이 있으며 단백질의 구성성분이 아닌 아미노산을 유리 아미노산이라고 한다. 이는 동물과 식물의 조직에서 발견되었는데 그 예로 (γ -aminobutyric acid, hydroxyproline, ornithine, pipecolic acid 등을 들 수 있다. 일반적으로 유리 아미노산은 동물과 식물의 대사과정에서 생성되며 Harbone (1984)에 따르면 식물계에는 약 200 여 종 이상의 유리 아미노산이 존재한다고 보고하였다 (Harbone 1984). 유리 아미노산은 free pool amino acids라고도 불리 우며 다른 중간에 free pool amino acids의 질적, 양적인 차이가 존재하리라고 생각되며 그 다양성의 의미는 매우 크다고 할 수 있다. 종간의 아미노산의 다양성은 유기체의 chemo-taxonomy 연구에 있어 중요하리라 사료된다고 보고하였다 (Gilbertson and Schmid 1975). Free amino acids의 정량과 정성은 Moore 등에 의한 ion exchange chromatography 방법에 의해 시작되어 25년 이상 amino acid analyzer를 사용해 분석되어 왔다. Amino acids는 형광성이 없는 single bond로 되어있기 때문에 UV나 visible로 측정되지 않기 때문에 유도체화 과정이 필요하며 유도체 시약은 일반적으로 ninhydrin이 사용되었으며 최근엔 ortho-phthalaldehyde를 사용해왔다. 원래는 우선 컬럼을 통과시킨 후 나온 액을 유도체화시키는 post column derivatization 방법을 사용했으나 낮은 감도와 느린 속도의 한계를 극복하기 위해 그 반대로 행해지는 pre column derivatization 방법이 개발되어 샘플을 유도체화 한 후 분리는 RT-HPLC (reverse phase liquid chromatography)에 의해 하게 되었다 (Turnell and Cooper 1982). 이에 대해 free amino acids 분석시 충분한 분리, 높은 감도, 빠른 시간 내 측정 방법에 대한 많은 연구 결과가 나왔다. 그 유도체화 시약의 종류인 5종류의 pre-column derivatization 방법을 비교해 보면 다음과 같다.

첫번째로 OPA (ortho-phthalaldehyde)유도체 시약을 사용하는 방법은 1971년에 처음 사용되어 RP-HPLC 법에 의한 free amino acid 측정법으로 자동 유도체화시 단축된 시간, 높은 감도 등의 장점이 있어 가장 많이 사용되어 왔으나 UV로만 검출해야 하며 cystine, 2급 아미노산 등은 검출이 안되며, 유도체화 후 그 시료는 불안정하여 실온에서 빨리 분해 된다는 단점이 있다. 두번째로 FMOC-Cl 유도체 시약을 사용하는 방법은 단축된 시간, 2급 아미노산의 검출, 유

도체화 시킨 시료의 안정성 등의 장점이 있으나 histidine과 taurine에 있어서 기존 방법의 20%와 30% 밖에 검출이 안되며 UV로 검출 해야 한다는 단점이 있다. 세번째로 dansyl-Cl유도체 시약은 1급과 2급 아미노산 검출시 잘 알려진 형광시약으로서 cystine 정량 시엔 가장 좋은 방법이지만 histidine 정량 시엔 10%의 낮은 재현성을 보이고 UV로 검출해야 하는 단점이 있다. 네번째로 Dabsyl-Cl 유도체 시약은 Lin & Lai에 의해 처음 보고되어 1급과 2급 아미노산 검출이 가능하며 UV detector를 사용하지 않고 불순물 peak가 적다는 장점이 있다. 마지막으로 PITC방법은 phenylisothiocyanate (PITC) 유도체 시약을 사용해 free amino acid과 반응시 생성되는 phenylthiocarbonyl (PTC) amino acid를 RP-HPLC로 분리 후 UV로 검출하는 방법이다. Tarr 등이 처음 이 방법을 사용해 정량하였고 1984년 Water사에 의해 상세한 방법이 개발되었으며 같은 해 Henrikson등에 의한 방법이 Water사에 의해 Pico-Tag methods로 개발되었다 (Henrikson and Meredith 1984). 이 방법은 2급 아미노산도 검출이 가능하며 유도체화한 시료가 안전성이 크다는 장점이 있으나 UV로 검출해야 되며 완전 자동화가 불가능하다는 단점을 가지고 있다.

이에 저자는 한국산 담자균류의 생리 활성 성분의 탐색 작업의 일환으로서 여러 영지 버섯을 대상으로 그 유리 아미노산을 분석할 목적으로 한국산 재배 영지버섯, 한국산 야생 영지버섯, 한국산 재배 녹각지, 대만산 영지버섯 등 다양한 영지 버섯(*Ganoderma lucidum*)을 열수 추출 한 후 그 농축 액을 PITC유도체화 시약으로 유도체화 하여 RP-HPLC로 분리시킨 후 UV detector로 검출하였다.

재료 및 방법

검체의 조제

건조된 국산 재배 영지 버섯, 국산 야생 영지 버섯, 국산 재배 녹각지, 대만 재배 영지 버섯 각 0.5g의 자실체를 blender로 균질화 한 후 80°C-90°C의 mantle에서 6시간 동안 열수 추출하였다. 그 추출액을 감압 여과한 후 감압농축해서 다시 0.22 μ m millipore membrane filter로 여과하였다. 그 여과액을 10,000 dalton cut off되는 centricron-10 (Amicon, INC, USA)를 사용하여 5000 rpm에서 1시간 동안 원심 분리시켜 고분자 물질을 여과해 낸 후 그 여과액인 분자량 10,000 이하의 물질만 분리시켰다.

유도체화 (Derivatization)

추출액 각 20 μ ml를 1시간 동안 농축 증발시켜 잔여 HCl를 제거한 후 10 μ ml redrying solution을 넣어 녹였다. 다

시 1시간 동안 농축 증발시킨 후 20 μm coupling solution 을 가해 3-4분 vortex 시키고 실온에서 20분 동안 방치하였다. 과잉 PITC 시약을 제거하기 위해 1시간 이상 농축 증발시킨 후 buffer인 eluent A에 용해시켰다.

시약 및 기구

(1) 시약

1) 아미노산 표준 용액

Pierce H 표준 용액: alanine, ammonium chloride, arginine, aspartic acid, cystine, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tyrosine, valine

Sigma A 2908 표준 용액: alanine, ammonium chloride, arginine, aspartic acid, cystine, cysteic acid, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, norleucine, phenylalanine, proline, serine, taurine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine

Sigma A 6407 표준 용액: L-α-amino-n-butyric acid, alanine, β-alanine, DL-β-aminoisobutyric acid, asparagine, aspartic acid, citrullin, cystathionine, cystine, glutamic acid, glycine, hydroxy-L-proline, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, O-phospho-L-serine, O-phosphoethanolamine, proline, sarcosine, serine, taurine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine, urea

2) Buffer

Buffer A: 0.14 M sodium acetate trihydrate, 0.05% triethylamine, 1L-Milli Q quality water, pH 6.4 with phosphoric acid

Buffer B: 60% acetonitrile (40% Buffer A)

3) Redrying solution: ethanol 200 μl, water 200 μl, triethylamine 100 μl

4) Coupling solution: ethanol 140 μl, water 20 μl, triethylamine 20 μl, phenylisothiocyanate 20 μl

(2) 기기

1) 기기

Water U6K injector auto sampler, water 510 pump 2 대, water 680 gradient controller, water 486 absorbance detector, water 746 integrator

2) 컬럼

Water Pico Tag column (3.9×300 mm, 4 μm, P/N 10950)

3) 검출기

254 nm에서 측정

(3) Gradient 조건

Time (min)	Flow	% A	% B
Initial	1	100	0
3	1	100	0
20	1	54	46
26	1	54	46
26.5	1	0	100
27	1	0	100
30	1.5	0	100
31	1.5	100	0
44	1.5	100	0
44.5	1	100	0

결 과

표준 아미노산을 PITC 방법에 의해 분석할 때 23 종의 아미노산이 분석되었다. 이는 Sigma 6407 표준 용액을 분석한 것으로 나온 아미노산의 종류는 phosphoserine, aspartic acid, glutamic acid, hydroxy-L-proline, amino adipic acid, phosphoethanolamine, serine, glycine, sarcosine, taurine, citrullin, alanine, threonine, proline, L-α-amino-n-butyric acid, tyrosine, valine, methionine, cystathionine, cystine, isoleucine, leucine, phenylalanine이었다(Fig. 1, Table 1). 녹각지에서는 12종의 아미노산이 검출되었으며 그 종류는 aspartic acid, glutamic acid, serine, taurine, arginine, alanine, tyrosine, valine, cysteic acid, isoleucine, phenylalanine, lysine이었다(Fig. 2, Table 2). 국산 재배 영지버섯에서는 15종이 검출되었으며 그 종류는 aspartic acid,

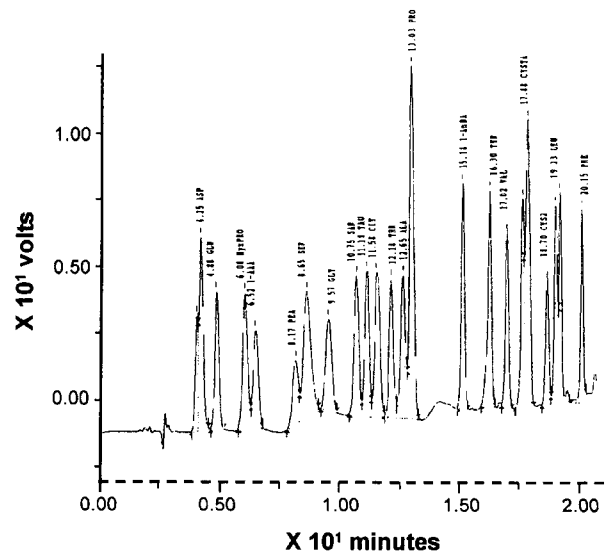
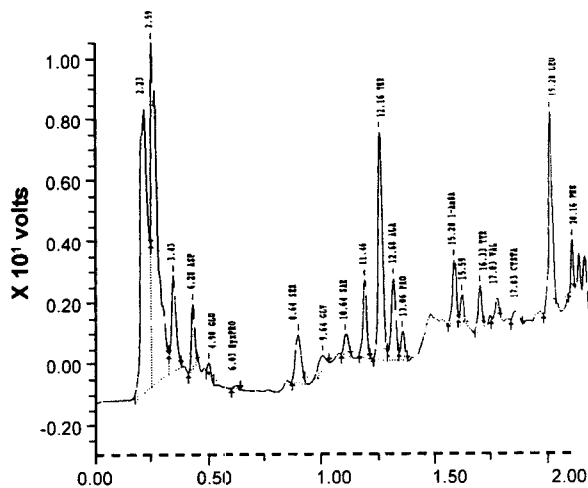


Fig. 1. UV spectrum of PTC-standard amino acid.

Table 1. Concentration of PTC standard amino acid

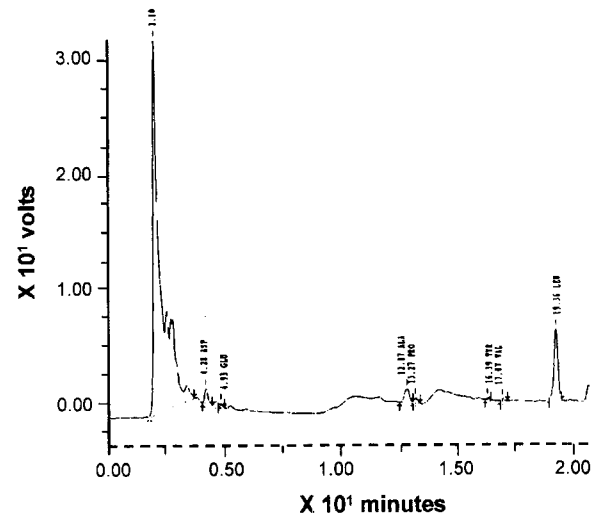
Peak #	Retention time (min)	Area %	Component name
1	4.075	2.11	PSER
2	4.250	4.74	ASP
3	4.883	3.50	GLU
4	6.083	4.29	HyxPRO
5	6.517	3.28	1-AAA
6	8.167	2.46	PEA
7	8.650	6.15	SER
8	9.567	3.71	GLY
9	10.750	4.27	SAR
10	11.183	3.83	TAU
11	11.583	4.28	CIT
12	12.183	3.99	THR
13	12.650	4.30	ALA
14	13.033	9.99	PRO
15	15.183	4.69	1-AnBA
16	16.300	5.25	TYR
17	17.017	3.8	VAL
18	17.667	4.43	MET
19	17.883	7.63	CYSTA
20	18.700	3.72	CYS2
21	19.050	3.79	ILE
22	19.233	3.84	LEU
23	20.150	3.95	PHE

**Fig. 2.** UV spectrum of *Ganoderma lucidum* (Nok-kak Ji).

glutamic acid, serine, glycine, taurine, arginine, proline, tyrosine, valine, methionine, leucine, isoleucine, phenylalanine, lysine이었다(Fig. 3, Table 3). 야생 국산 영지버섯에서는 12종이 검출되었으며 그 종류는 aspartic acid, glutamic acid, serine, glycine, arginine, tyrosine, valine, methionine, leucine, isoleucine, phenylalanine, lysine이었다(Fig. 4, Table 4). 대만 재배 영지버섯에서는 16종이 검출

Table 2. Concentration of Nok kak ji

Peak #	Retention time (min)	Area %	Component name
1	4.250	9.74	ASP
2	4.917	5.99	GLU
3	5.367	1.50	
4	8.708	1.84	SER
5	9.742	2.22	GLY
6	11.492	0.94	TAU
7	12.367	2.55	ARG
8	12.933	1.49	
9	13.433	23.37	ALA
10	16.308	1.20	TYR
11	16.550	16.73	X1
12	16.965	4.25	VAL
13	18.550	1.17	CYS
14	18.900	7.31	ILE
15	19.317	2.98	
16	19.883	0.76	PHE
17	20.267	2.63	
18	20.567	9.33	
19	20.692	4.00	LYS

**Fig. 3.** UV spectrum of Korean cultured *Ganoderma lucidum*.

되었으며 그 종류는 aspartic acid, glutamic acid, serine, glycine, taurine, arginine, alanine, proline, tyrosine, valine, methionine, leucine, isoleucine, phenylalanine, lysine, tryptophan이었다(Fig. 5, Table 5).

결 론

영지버섯을 PITC방법에 의해 분석하였을 때 학명은 *Ganoderma lucidum*으로 모두 같으나 한국산 재배 영지버

Table 3. Concentration of cultured Korean *Ganoderma lucidum*

Peak #	Retention time (min)	Area %	Component name
1	4.250	7.61	ASP
2	4.867	4.78	GLU
3	8.267	3.29	
4	8.717	4.52	SER
5	9.717	1.70	GLY
6	11.383	1.35	TAU
7	12.383	3.93	ARG
8	12.950	2.79	
9	13.050	2.03	THR
10	13.467	13.22	ALA
11	13.867	0.91	PRO
12	15.800	8.85	
13	16.317	2.47	TYR
14	16.550	1.93	XI
15	16.967	6.22	VAL
16	17.583	0.31	MET
17	18.908	4.33	ILE
18	19.017	7.79	LEU
19	19.283	2.41	
20	19.600	2.41	
21	19.883	8.45	PHE
22	20.400	0.71	
23	20.692	8.03	LYS

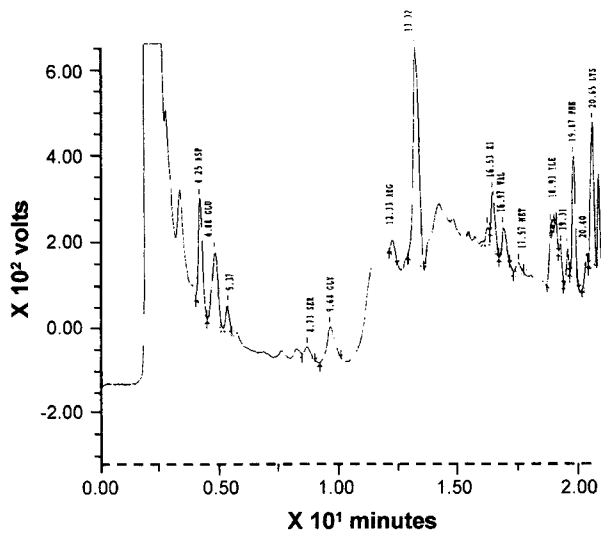


Fig. 4. UV spectrum of wild Korean *Ganoderma lucidum*.

섯, 야생 국산 영지버섯, 녹각지, 대만산 재배 영지버섯에서 각각 다른 종류와 수와 농도의 유리 아미노산이 분석되었다. 특히 영지버섯에서는 한국산 재배 영지버섯, 녹각지, 대만산 재배 영지버섯에서 taurine이 미량 검출되었으나 야생 국산 영지버섯에서는 taurine이 검출되지 않았다. 이 연구 결과를 토대로 하여 Basidiomycetes의 chemotaxonomy나 버섯의

Table 4. Concentration of wild Korean *Ganoderma lucidum*

Peak #	Retention time (min)	Area %	Component name
1	4.250	8.58	ASP
2	4.883	8.48	GLU
3	5.367	2.17	
4	8.725	1.14	SER
5	9.683	5.88	GLY
6	12.333	1.38	ARG
7	13.317	26.69	
8	16.308	1.08	TYR
9	16.533	4.76	XI
10	16.967	2.89	VAL
11	17.567	0.85	MET
12	18.933	3.57	ILE
13	19.042	2.45	LEU
14	19.117	3.74	
15	19.308	2.20	
16	19.600	2.16	
17	19.867	9.27	PHE
18	20.400	1.79	
19	20.650	10.92	LYS

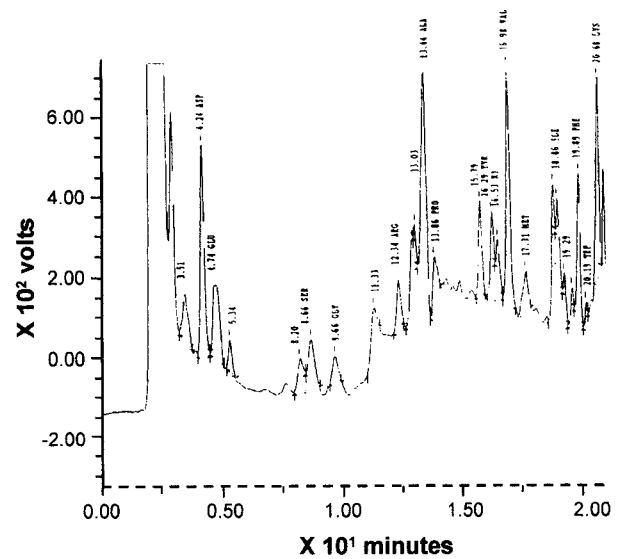


Table 5. Concentration of cultured Taiwan *Ganoderma lucidum*

Peak #	Retention time (min)	Area %	Component name
1	3.508	2.55	
2	4.242	8.81	ASP
3	4.742	5.67	GLU
4	5.342	1.33	
5	8.200	2.26	
6	8.658	3.85	SER
7	9.658	1.95	GLY
8	11.325	2.86	TAU
9	12.342	2.38	ARG
10	12.917	2.78	
11	13.025	3.53	
12	13.442	14.08	ALA
13	13.858	2.13	PRO
14	15.792	3.49	
15	16.292	3.36	TYR
16	16.525	2.59	X1
17	16.975	10.14	VAL
18	17.708	2.22	MET
19	18.858	4.77	ILE
20	19.025	4.74	LEU
21	19.292	1.57	
22	19.608	1.07	
23	19.892	5.06	PHE
24	20.192	0.32	TRP
25	20.675	6.47	LYS

formation and regeneration of *G. lucidum*. *Arch. Pharm. Res.*, **10**, 158-164.

Gilbertson, D.E. and Schmid, L.S. (1975): Free amino acids in the hemolymph of five species of fresh water snails. *Comp. Biochem. Biophys.*, **51**, 201-203.

Harbone, J.B. (1984): *Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis*, 2nd ed. Chapman & Hall, London.

Heinrikson, R.L. and Meredith, S.C. (1984): Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.*, **136**, 65-74.

Kang, C.Y., Shim, M.J., Choi, E.C., Lee, Y.W. and Kim, B.K. (1981): Antitumor constituents of *G. Lucidum*. *Korean Biochem. J.*, **14**, 101-112.

Kim, B.K., Lee, Y.S., Choi, E.C., Shim, M.J. and Lee, Y.N. (1977): Studies on the constituents of the higher fungi of Korea (VI), amino acids from *Amanita spissacea* and *Amanita vaginata*. *Korean Biochem. J.*, **10**, 47-58.

Kim, B.K., Lim, J.H., Yoon, I.H., Park, O.J. and Kim, H.S. (1971): Studies on the constituents of the higher fungi of Korea. *Korean J. Pharmacogn.*, **2**, 31-34.

Lee, J.Y., Lee, Y.W. and Lim, J.H. (1959): Illustration of fungi of Korea. Baemunkak, Seoul, Korea, 101-114.

Lee, M.H., Kim, H. W., Shim, M.J., Choi, E.C. and Kim, B.K. (1986): Studies on the constituents of the higher fungi of Korea, general constituents and immunostimulation of *G. Lucidum*. *Kor. J. Mycol.*, **14**, 149-163.

Park, J.H., Kim, H.W., Kim, Y.S., Choi, E.C. and Kim, B.K. (1987): Studies on anti-hypertensive components of *G. lucidum* in Korea. *Arch. Pharm. Res.*, **10**, 158-164.

Scott, R.M. (1969): *Clinical analysis by thin layer chromatography techniques*. Ann Arbor-Humphrey Science Publishers, Ann Arbor.

Shin, H.W., Kim, H.W., Choi, E.C. and Kim, B.K. (1985): Studies on the constituents of the higher fungi of Korea, Inorganic compounds of *G. lucidum*. *Kor. J. Mycol.*, **13**, 53-55.

Turnell, D.C. and Cooper, J.D. (1982): Rapid assay for amino acids in serum or urine by pre-column derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *Clin. Chem.*, **28**, 527-531.