

Inonotus obliquus 균의 정지배양이 균사체의 화학적 조성분에 미치는 영향*¹

신 유 수*² · 寺澤實*² · 조 남 석*^{3†}

Chemical Constituents of Stationary Cultured Mycelia of *Inonotus obliquus**¹

Yu-Soo Shin*² · Minoru Terazawa*² · Nam-Seok Cho*^{3†}

요 약

본 연구는 액체 정지배양한 *Inonotus obliquus*의 균사체 조성분을 분석하였으며, *I. obliquus*의 균핵과 진탕배양한 균사체의 성분조성을 비교하였다. *I. obliquus* 균의 정지배양 균사체가 생산하는 화학성분을 분석한 결과, 단리된 화합물은 lanosterol(1), inotodiol(2), trametenolic acid(3), 3 β ,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene(6), 3 β ,22-dihydroxy-lanosta-8,24-diene(A), 3 β -hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al(B) 및 methyl trametenolate(C)이 확인되었다. 액체진탕배양 균사체가 생산하는 화합물과의 비교에 의해, 공통화합물은 lanosterol(1)이었고, ergosterol(7)과 ergosterol peroxide(8)는 액체진탕배양, lanosterol(1)의 C-21치환화합물과 C-22치환화합물은 정지배양함으로써 얻어짐을 알 수 있었다.

ABSTRACT

Seven compounds were isolated from stationary cultured mycelia of *Inonotus obliquus*, of which several of them showed certain antitumor activities. Seven compounds were identified as lanosterol(1), inotodiol(2), trametenolic acid(3), 3 β ,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene(6), 3 β ,22-dihydroxy-lanosta-8,24-diene(A), 3 β -hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al(B) and methyl trametenolate(C), respectively. The precursor compound of sclerotium obtained from shaking-cultured and stationary-cultured mycelia of *Inonotus obliquus* is lanosterol. Ergosterol

*¹ 접수 2004년 3월 4일, 채택 2004년 5월 20일

*² 일본북해도대학 농학부 산림자원과학연구그룹. Research group of Forest Resources Science, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan

*³ 충북대학교 산림과학부. School of Forest Resources, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

† 주저자(corresponding author) : 조남석(e-mail: nscho@chungbuk.ac.kr)

and ergosterol peroxide were obtained by shaking-culture, and the substituted compounds of C-21 and C-22 of lanosterol were obtained by stationary culture.

Keywords: *Inonotus obliquus*, lanosterol type triterpene, antitumor, shaking-culture, stationary-culture

1. 서 론

Inonotus obliquus 균핵추출물이 HIV-1 및 위종양에 매우 효과적이라는 연구결과(Mizuno 1996)가 알려지면서 항암 및 항종양 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 256 carcinosarcoma 및 MCF-7 human mammary adenocarcinoma에 대한 강한 항암효과가 *I. obliquus*의 *n*-hexane 추출성분 가운데 함유된 triterpenoids 성분 때문이라는 연구결과가 보고되었다(Kahlos 등, 1984b; Kahlos 등, 1986; Kahlos 등, 1987; Kahlos 등, 1989). 동유럽의 경우에는 이 버섯의 균핵을 16세기, 17세기경부터 민간약으로 사용하여 왔다(Kahlos & Hiltunen, 1983). 한편 서부시베리아지역에서는 이 버섯을 심장병, 간질환, 위장병 및 결핵의 치료에도 사용하고 있다(Saar, 1991).

항암효과 및 항 HIV-1 활성이 있다고 알려져 있는

I. obliquus 균핵으로부터 3종의 신규 triterpene, 3 β -hydroxy-8,24-dien-lanosta-21,23-lactone(4), 21,24-cyclopenta-lanosta-3 β ,21,25-triol-8-ene(5), 3 β ,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene(6)과 기지화합물 lanosterol(1), inotodiol(2), trametenolic acid (3)를 포함한 여섯 개의 lanosterol type의 화합물의 존재를 보고하였다(Kahlos 등, 1984a; Shin 등, 2000a; Shin 등, 2001a; Shin 등, 2001b). 또한 액체진탕배양 후의 균사체로부터 전구체 화합물인 lanosterol(1), ergosterol(7), ergosterol peroxide(8), glucositol(9), 3 β ,22-dihydroxy-lanosta-7,9(11), 24-triene(10), sesquiterpene의 5-(2'-etene-6',6'-dimethyl-cyclohexa)-3-methyl-pentanol(11) 등이 확인되었다(Fig. 1) (Shin 등, 2001c; Shin 등, 2002). 그리고 단리한 lanosterol type의 화합물중 C-21에 치환된 화합물보다 C-22에 치환된 화합물이 높은 항암효과를 가지고 있음을 보고

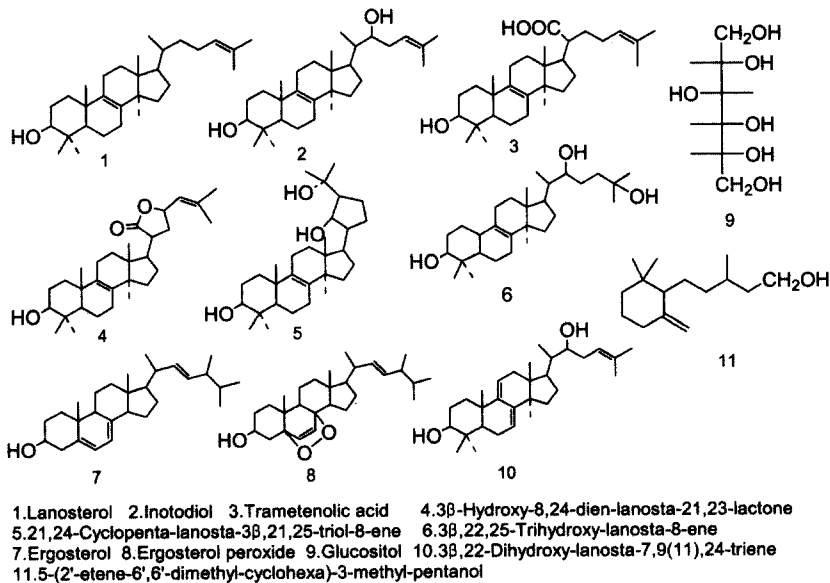


Fig. 1. Structures of isolated compounds from the sclerotium and liquid-cultured mycelia of *I. obliquus*.

하였다(Shin 등, 2000b).

본 연구에서는 액체 정지배양한 *I. obliquus*의 균사체 조성분을 분석하였으며, *I. obliquus*의 균핵과 진탕배양한 균사체의 성분조성을 비교 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시균

Inonotus obliquus NP-1을 사용, 4°C의 조건에서 potato dextrose agar (PDA) 배지에서 유지하였으며, 매 2개월마다 계대배양하였다.

2.2. 배양

MYG[malt extract (0.5%):yeast extract (0.5%):glucose (2%)] 액체배지를 조제 후, 121°C에서 고압 멸균한 다음, PDA배지에서 배양한 *I. obliquus* NP-1 균을 각각의 액체배지에 접종하여 26°C의 항온기에서 2개월간 정지배양하였다.

2.3. 추출, 분획 및 단리

2개월간 정지배양 후, 균사체와 액체를 분리하여 80°C에서 건조시켜 97.1 g의 균사체를 얻었다. 얻어진 균사체를 95% 에틸알코올로 실온에서 24 h 동안 5회 추출하고 농축하였다. 얻어진 에틸알코올추출물은 4.91 g이었다. 에틸알코올추출물 4.91 g을 실리카겔칼럼(Wakogel B-10)으로 분획하였으며, 사용한 전개용매는 *n*-hexane, *n*-hexane:ethyl acetate (EtOAc) (HEA, 4:1, v/v), EtOAc을 순차적으로 사용하였다. 각 가용부를 다시 실리카겔칼럼 크로마토그래피(toluene:formic acid:ethyl formate (SGIII, 5:1:4, v/v)) 및 TLC [(Wakogel B-10, 전개용매 toluene:formic acid:ethyl formate (5:1:4, v/v), 발색제 50% H₂SO₄)에 의해 화합물 1, 2, 3, 6, A, B 및 C를 단리하였다.

2.4. 기기분석

단리한 화합물 1, 2, 3, 6, A, B 및 C의 구조분석은

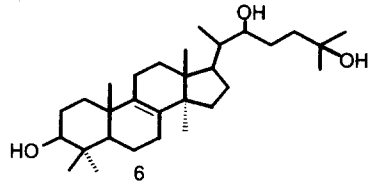
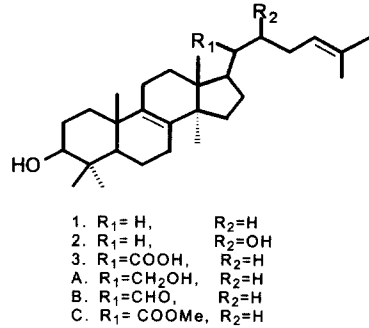


Fig. 2. Structures of isolated compounds from the stationary-cultured mycelia of *I. obliquus*.

NMR (Bruker AMX-500, ¹H: 500 MHz; ¹³C: 125 MHz), 2차원(2D) NMR은 ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C COSY, HMQC 및 HMBC는 Bruker AMX500(¹H: 500 MHz; ¹³C: 125 MHz)를 사용하여 수행하였으며, Field desorption-mass spectrometry (FD-MS) data는 JEOL JMS-SX102A Mass Spectrometer를, Electron ionization-mass spectrometry (EI-MS) 및 EI-high resolution(HR)-MS 스펙트라는 JEOL JMS-AX500 Mass Spectrometer를 사용하여 얻었다. 박층 크로마토그래피(TLC)는 Wakogel B-10으로 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

정지배양한 균사체의 HEA (4:1, v/v)추출물로부터 화합물 1, 2, 3, 6, A, B 및 C가 단리되었다. 기기 분석의 결과로부터 화합물 1, 2, 3 및 6은 lanosterol, inotodiol, trametenolic acid, 3β,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene으로 동정하였다(Fig. 2).

화합물 A, B 및 C는 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 스펙트라를 lanosterol의 스펙트라와 비교한 결과, 동종의

Table 1. ¹³C-NMR spectral data (δ) of compounds A, B, and C

	Compound A	Compound B	Compound C
1	35.6	35.6	35.4
2	27.8	27.9	27.9
3	78.9	78.9	80.7
4	38.9	38.9	37.8
5	50.4	50.4	50.5
6	19.1	19.1	19.2
7	29.2	29.2	28.8
8	134.7	134.7	134.3
9	134.3	133.9	134.1
10	37.1	37.1	36.9
11	20.8	20.8	20.8
12	26.5	26.5	26.3
13	44.3	44.3	44.2
14	49.5	49.4	49.5
15	30.6	30.6	32.4
16	29.7	29.6	30.3
17	45.3	45.3	47.5
18	16.8	16.8	16.0
19	18.2	18.2	20.8
20	55.5	55.4	50.5
21	60.4	206.1	176.0
22	26.8	26.8	27.0
23	25.7	25.7	25.9
24	123.5	123.5	123.5
25	132.4	132.4	132.3
26	25.7	25.6	25.7
27	17.7	17.7	17.6
28	15.4	15.4	16.5
29	27.8	27.8	28.8
30	24.2	24.2	24.2
COOCH ₃			47.2

lanosterol type의 triterpene으로 동정되었다. 화합물 A의 ¹³C-NMR에서는 lanosterol의 C-21위치의 메틸기의 케미칼시프트가 존재하지 않고, δ 62.6의 -CH₂OH를 나타내는 케미칼시프트가 존재하였다. 또한, ¹H-NMR에서는 δ 3.71(m)의 케미칼시프트가 존재하고, C-21위치에서 수산기를 가진 화합물로 판단되었다. 화합물 A를 문헌(Kahlos 등, 1984a; Kahlos 등, 1987; Shin 등, 2000a)과의 비교에 의해 3 β , 22-dihydroxy-lanosta-8,24-diene으로 동정하였다. 화합물 B는 ¹³C-NMR에서의 lanosterol의 C-21위치의 메틸기의 케미칼시프트가 존재하지 않고, δ 206.1

의 -HC=O를 나타내는 케미칼시프트가 나타났다. 또한, ¹H-NMR에서는 δ 8.9(m)의 케미칼시프트가 존재하고, C-21위치에서 메틸기가 수산화물 거쳐 산화된 알데히드기를 가진 화합물로 판단되었다. 화합물 B를 문헌(Kahlos 등, 1984a; Kahlos 등, 1987; Shin 등, 2000a)과의 비교에 의해 3 β -hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al로 동정하였다. 화합물 C는 ¹³C-NMR로부터 lanosterol의 C-21위치의 메틸기의 케미칼시프트가 존재하지 않고, δ 171.0의 -COOMe를 나타내는 케미칼시프트가 나타났으며, C-21 위치에서의 trametenolic acid로부터 메틸화된 화합물로서, 문헌(Kahlos 등, 1984a; Kahlos 등, 1987; Shin 등, 2000a)과의 비교에 의해 methyl trametenolate로 동정하였다. 화합물 A, B 및 C의 ¹³C-NMR data를 Table 1에 표시하였다.

I. obliquus 균으로부터 생성되는 화합물들과의 상관관계를 검토하여 이번에 분리된 화합물들의 생성추경로를 Fig. 3에 표시하였다. lanosterol(1)은 *I. obliquus* 균으로부터 생산되는 화합물들의 전구체 화합물이며, lanosterol(1)은 C-21에서 수산화되어 3 β ,21-dihydroxy-lanosta-8,24-diene(A)이 생성된다. 화합물 A는 산화되어 3 β -hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al(B)가 생성된다. 화합물 B는 산화되어 trametenolic acid(3)이 생성되고, trametenolic acid가 C-21에서 메틸화하여 methyl trametenolate(C)가 생성된다. lanosterol(1)은 C-22에서 수산화되어 inotodiol(2)가 생성되고, inotodiol이 C-25에서 수산화되어 3 β ,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene(6)이 생성된다.

이전에 보고한 *I. obliquus*의 균핵(Kahlos 등, 1984a; Shin 등, 2000a; Shin 등, 2001a; Shin 등, 2001b) 및 액체진탕배양 균사체로부터 분리한 추출물(Shin 등, 2001c; Shin 등, 2002)과 정치배양 균사체의 추출물로부터 분리한 화합물을 비교하면, 전구체인 lanosterol(1)은 균핵, 액체진탕배양 균사체 및 정치배양균사체로부터 추출되었지만, 항암효과를 나타내는 ergosterol(7)과 ergosterol peroxide(8)는 정치배양 균사체의 추출물로부터는 분리되지 않았다. 그러나 정치배양에 의해 항암효과를 나타내는 lanosterol(1)과 inotodiol(2), C-21 치환화합물 3, A, B,

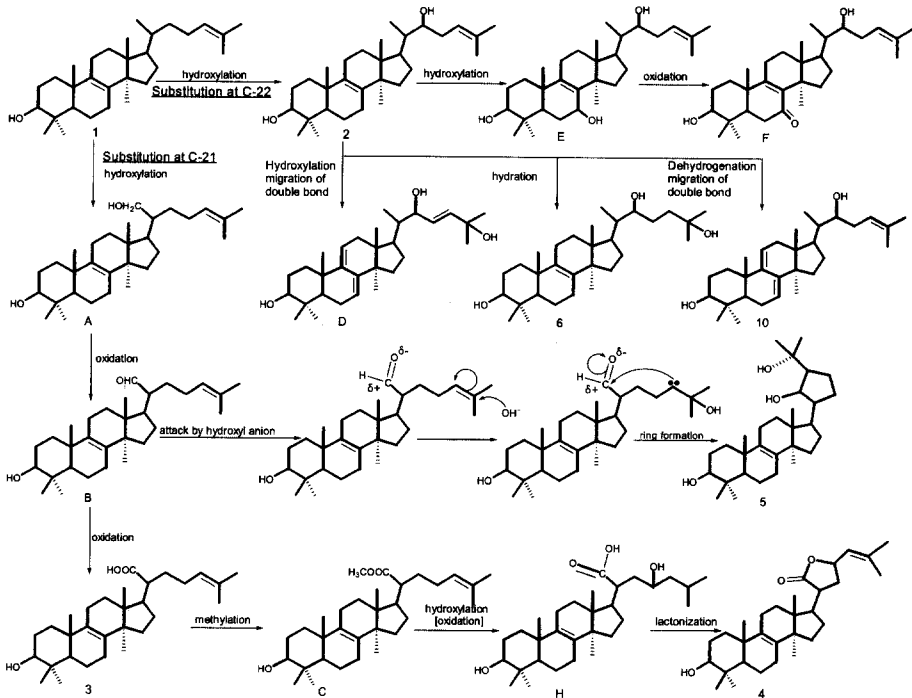


Fig. 3. Hypothesized biogenetic pathway of the isolated compounds from the stationary-cultured mycelia of *I. obliquus*.

Table 2. Comparison of isolated compounds of the sclerotium, shaking- and stationary-cultured mycelia of *I. obliquus*

	Sclerotium	Shaking cultured mycelium	Stationary cultured mycelium
Lanosterol(1)	O	O	O
Inotodiol (2)	O	X	O
Trametenolic acid (3)	O	X	O
3β-hydroxy-8,24-dien-lanosta-21,23-lactone(4)	O	X	X
21,24-cyclopenta-lanosta-3β,21,25-triol-8-ene(5)	O	X	X
3β,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene(6)	O	X	O
ergosterol(7)	X	O	X
ergosterol peroxide(8)	X	O	X
3β,22-dihydroxy-lanosta-7,9(11)24-triene(10)	O	O	X
3β,21-dihydroxy-lanosta-8,24-diene(A)	O	X	O
3β-hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al(B)	O	X	O
methyl trametenolate(C)	O	X	O

C 및 C-22 치환화합물 6이 단리되었다. 이러한 결과는 *I. obliquus* 균이 공기와 접촉하면, ergosterol(7), ergosterol peroxide(8)를 생산하고, 공기와 접촉하

지 않으면 lanosterol(1)의 C-21 치환화합물과 C-22 치환화합물을 생산하는 것을 알 수 있었다(Table 2).

4. 결론

Inonotus obliquus 균의 정치배양 균사체가 생산하는 화학성분을 분석하였으며, 이들 성분을 균핵 및 진탕배양한 균사체의 조성분과 비교하였다. 정치배양한 균사체로부터 lanosterol(1), inotodiol(2), trametenolic acid(3), 3 β ,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene(6), 3 β ,22-dihydroxy-lanosta-8,24-diene(A), 3 β -hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al(B) 및 methyl trametenolate(C)를 단리 및 동정하였다. 액체진탕배양 균사체가 생산하는 화합물과의 비교에 의해, 공통화합물은 lanosterol(1)이었고, ergosterol(7)과 ergosterol peroxide(8)는 액체진탕 배양함으로써, lanosterol(1)의 C-21 치환화합물과 C-22 치환화합물은 정치배양함으로써 얻어졌다. 이러한 결과는 *I. obliquus* 균이 배양과정에서 공기와의 접촉유무에 따라 생성되는 성분이 달라지는 것을 알 수 있었다.

참고 문헌

1. Kahlos, K. and R. Hiltunen. 1983. Identification of some lanostane type triterpenes from *Inonotus obliquus*. Acta Pharmaceutica Fennica 92: 220~225.
2. Kahlos, K., L. Kangas, and R. Hiltunen. 1986. Antitumor tests of inotodiol from the fungus *Inonotus obliquus*. Acta Pharmaceutica Fennica 95: 173~177.
3. Kahlos, K., L. Kangas, and R. Hiltunen, 1987. Antitumor activity of some compounds and fractions from an *n*-hexane extract of *Inonotus obliquus*. Acta Pharmaceutica Fennica 96: 33~40.
4. Kahlos, K., L. Kangas, and R. Hiltunen. 1989. Ergosterol peroxide, an active compound from *Inonotus obliquus*. Planta Medica 55: 389~390.
5. Kahlos, K., L. Kangas, R. Hiltunen, and M. V. Schantz, 1984b. The antitumor activity of some extracts and compound isolated from *Inonotus*

- obliquus*. Farmaceutisch tidschrift voor Belgie 61(3): 305~306.
6. Kahlos, K., R. Hiltunen, and M. V. Schantz. 1984a. 3 β -Hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al, a new triterpene from *Inonotus obliquus*. Planta Medica 50: 197~198.
7. Mizuno, T., C. Zhuang, K. Abe, H. Okamoto, T. Kiho, S. Ukai, S. Leclerc, and L. Meijer. 1996. Studies on the host-mediated antitumor polysaccharides, part XXVII. Mushroom Sci. Biotechnol. 3(2): 5~12 (in Japanese).
8. Saar, M. 1991. Fungi in Khanty folk medicine. J. Ethnopharmacology 31: 175~179.
9. Shin, Y. S., Y. Tamai, and M. Terazawa. 2000a. Chemical constituents of *Inonotus obliquus* I. A new triterpene, 3 β -hydroxy-8,24-dien-lanosta-21, 23-lactone from sclerotium. Eurasian J. Forest Research 1: 43~50.
10. Shin, Y. S., Y. Tamai, and M. Terazawa. 2000b. Chemical constituents on *Inonotus obliquus*. The Proceedings of the 2nd Joint Symposium between Hokkaido University and Yeoungnam University, 109~113.
11. Shin, Y. S., Y. Tamai, and M. Terazawa. 2001a. Chemical constituents of *Inonotus obliquus* II. A new triterpene, 21,24-cyclopentalanosta-3 β ,21,25-triol-8-ene from sclerotium. J. Wood Sci. 47(4): 313~316.
12. Shin, Y. S., Y. Tamai, and M. Terazawa. 2001b. Chemical constituents of *Inonotus obliquus* III. A new triterpene, 3 β ,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene from sclerotium. International J. Medicinal Mushrooms 2(3): 201~207.
13. Shin, Y. S., Y. Tamai, and M. Terazawa. 2001c. Chemical constituents from culture mycelia of *Inonotus obliquus* IV. Triterpene and sterols from culture mycelia. Eurasian J. Forest Research 2: 27~30.
14. Shin, Y. S., Y. Tamai, and M. Terazawa. 2002. Triterpenoids, steroids and a new sesquiterpene from *Inonotus obliquus*. International J. Medicinal Mushrooms 4(2): 77~84.