

韓國產 高等 菌類의 成分 研究(XVIII)

*Russula pseudodelica*와 *Microporus affinis*의 成分

閔 洪 基 · 崔 應 七 · 金 炳 珏

서울大學校 藥學大學 微生物藥品化學教室

Studies on the Constituents of the Higher Fungi of Korea(XVIII)

Components of *Russula pseudodelica* and *Microporus affinis*

Hong Ki Min, Eung Chil Choi and Byong Kak Kim

Department of Microbial Chemistry, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract: To investigate constituents of *Russula pseudodelica* Lange and *Microporus affinis*(Blume et Nees) Kuntze, quantitative analyses of free and total amino acids were carried out with G. L.C. and an amino acid autoanalyzer. Polysaccharides of the two mushrooms were extracted with hot water and the filtrate was concentrated. The addition of three volumes of ethanol to the concentrate formed precipitation of crude polysaccharides which were analyzed by G.L.C. and H.P.L.C. Sixteen amino acids and four monosaccharides were identified in the protein-bound polysaccharides of the two mushrooms. The polysaccharides of *M. affinis* showed antineoplastic activity against sarcoma 180 implanted in mice.

緒 論

버섯은 오래전 부터 우리 생활과 밀접한 관계를 가지서 약용 및 식용으로 사용되어 왔으며, 간혹 독버섯에 의한 중독사고도 발생하였으나, 한국산 버섯성분의 분석에 대해서는 외국에 비해 상당히 늦어 60년 경부터 연구 보고가 발표되기 시작했다. 본 교실에서는 알칼로이드, 지방산, 아미노산, 스테로이드 등에 대하여 발표하였다. 아미노산에 대하여는 1958년 김이 한국산 버섯의 식용 버섯류 15종에 대하여, 1960년 허가 식용 버섯 27종에 대하여, 1974년 노등은 식용 버섯 11종에 대하여, 1974년 정 등은 식용 버섯 6종에 대하여, 1977년 저자들은 2종의 버섯에 대하여 각각 확인 정량하여 발표하였다.

특히 근년에 들어와 구름버섯, 송이버섯, 표고버섯, 팽나무버섯, 나도팽나무버섯, 화경버섯 등의 향암성분

에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 표고버섯의 경우 그 항암작용의 기전이 면역반응을 촉진하는 것에 기인한다는 것이 발표되었다.

이에 저자들은 *Russula pseudodelica*(젓버섯아재비) 및 *Microporus affinis*(매꽃버섯)의 두가지 한국산 야생 버섯의 성분에 대해 연구된 바 없음으로 그 유용 성분을 구명기 위하여 그 아미노산에 대해 G.L.C. 및 아미노산 분석기를 이용하여 확인 정량했으며, 다당류 성분에 대하여는 G.L.C. 및 H.P.L.C.을 이용하여 분석하고 항암작용의 유무를 마우스를 사용하여 실험하였으며 그 결과를 얻었기에 보고코자 한다.

實驗 材料 및 方法

1. 實驗 材料

이 實驗에 사용한 材料는 1978년 경기도 수원에서 자라는 젓버섯아재비(*Russula pseudodelica* Lange=R.

japonica Hongo) 및 메꽃버섯 (*Microporus affinis* (Blume et Nees) Kuntze=*Polystictus affinis* Fr.)을 채집한 것이다.

이 논문에서는 略字로 젓버섯아재미를 「RP」로, 메꽃버섯을 「MA」로 표시하기로 한다.

2. 아미노산

1) 유리 아미노산 분석

a) 시약

n-butanol (HCl): n-butanol 100ml에 dry HCl gas을 포화시켜 만듦. methanol (HCl): methanol 100ml에 dry HCl gas을 포화시켜 만듦. methylene chloride (anhydrous): methylene chloride 100ml에 CaCl₂ (anhydrous) 25g을 가하고 재증류하여 만듦.

b) G.L.C. 분석용 유도체의 합성

① 16종의 표준아미노산을 각각 1.5mg 함유한 표준 아미노산 혼합물에 CH₃OH(HCl) 3ml을 가하고 상온에서 30분간 진탕하여 반응시켜 methyl ester을 만든후 60°C감압 증류하여 완전 건조시켰다.

② 이 methyl ester에 BuOH(HCl) 3ml을 가하고 150°C에서 5분 및 100°C에서 60분간 반응시킨후 감압 증류하여 완전 건조시켰다.

③ 이 butyl ester에 CH₂Cl₂ (anhydrous) 3ml 및 trifluoroacetic anhydride 1ml을 가하고 90°C에서 60분간 반응시킨 후 감압 증류하여 완전 건조시킨후 CHCl₃에 녹여 1ml로 만들었다.

④ 16종의 표준아미노산 약 1.5mg을 각각 취해 상기와 같은 동일 조작을 행하였다.

c) 시료 추출과정 및 N-TFA butyl ester 합성

건조한 시료 10g에 ethanol 250ml을 가하고 blender로 갈아서 2일간 진탕 추출, 여과한 후 잔사에 ethanol 250ml을 가하고 다시 반복하였다. 여액을 감압 농축하여 ethanol 추출물로서 각각 RP 3.38g과 MA 1.0g을 얻었다.

ethanol 추출물을 물에 녹인후 ethyl ether을 사용하여 지질을 제거했다. 지질을 제거한 수층을 감압 농축하여 RP 추출물 1.26g과 MA 추출물 0.15g을 얻었다. 이중에서 RP 추출물 6.5mg과 MA추출물 20mg을 취해 무수 CH₂Cl₂을 가하여 증발 농축한 후 표준아미노산 혼합물과 같은 조작을 행하였다.

d) 사용기기 및 사용조건

CHCl₃에 녹인 N-TFA butyl ester 용액 1~4μl을 Table I과 같은 조건에서 표준아미노산, RP추출물 및 MA 추출물에 대해 G.L.C.을 행하였다.

2) 총아미노산 분석

Table I. Measurement conditions of G.L.C. for amino acids

Column	3% OV-17 (80~100 mesh shimalite) 3mm φ×2m boronsilicate glass column
Temperature	Injection port 250° Column 100~200° (5°C/min) Detector 270°
Flow rate	N ₂ : 50ml/min H ₂ : 60ml/min Air: 88ml/min
Attenuation	4×10 a.f.s. (ampere full scale)

a) 시료의 처리

건조한 시료 100mg에 6N-HCl 20ml을 가하고 ampule에 넣어 질소로 충전하고 밀봉시켰다. 110±5°C에서 48시간 동안 가수분해시킨후 여과하고 여액을 감압농축하여 완전히 건조시켰다. 이를 0.1N HCl 10ml에 용해시켰다.

b) 표준아미노산 용액

17종의 표준아미노산중 glutamic acid 0.1584μM/ml proline 0.4μM/ml, cysteine 0.1906μM/ml을 제외한 14종의 표준아미노산은 pH 2.2 구연산완충액으로 희석시켜 각각 0.2μM/ml로 만들었다.

c) 사용시기 및 사용조건

Table II와 같은 조건하에서 표준아미노산, 농도를 조절한 RP 및 MA 시료용액 0.5ml을 아미노산자동분석기(Hitachi Model KLA-5)에 주입하였다.

Table II. Measurement conditions (amino acid analyzer)

Column size	9mm ID×550mm 9mm ID×100mm
Ion Exchange Resin	Hitachi-custom ion exchange 2613 Hitachi-custom ion exchange 2611
Flow rate	Buffer solution 60ml/hr Ninhydrin 30ml/hr
Wave length	15mm tubular flow cell 570nm (red) 440nm (green)
Buffer Solution	pH 3.25, pH 4.25, pH 5.28 Na citrate buffer solution
Column temperature	55°C
Reaction bath temperature	100°C

3. 다당류

1) 추출 및 분리

200g의 건조한 RP와 MA를 blender로 갈고 2.5l의 물을 가하여 환류냉각시키며 8시간 추출하고 이과한 후 전사를 다시 1.5l의 물로 8시간 환류냉각시키며 추출한 후 여과하였다. 여액을 100°C에서 약 700ml 정도로 감압농축하고 4~5배의 ethanol을 가하였더니 간색의 구름같은 침전이 생성되었다. 이 침전액을 8000rpm에서 30분간 원심분리하여 침전을 냉동건조시켰다. 냉동건조시킨 침전을 물에 용해하여 Visking tube을 사용하여 지운에서 4일 동안 투석을 실시하고 물에 녹지 않는 부분은 제거하였다. 100°C에서 감압농축한 후 -60°C에서 냉동건조시켜 각각의 무미 무취인 갈색 분말 RP 6.8g 및 MA 21.3g을 얻었다.

2) 추출물의 성분 분석

RP 및 MA 추출물에 대해 Anthrone시험, Molish 시험, Ninhydrin시험 및 Lowry Folin 시험을 행하였다.

3) 다당류의 함량 및 구성당류분석

당함량은 Anthrone 시험을 포도당을 대조용으로 하여 계산했다. 구성당류는 시료 20mg을 0.1N HCl 2ml에 용해시키고 ampule에 넣어 질소를 충전시키고 밀봉한 뒤 100±5°C에서 4시간 동안 가수분해시켰다. 여과 농축한 뒤 H.P.L.C.을 행하였다. 또한 시료 5mg을 2ml의 3% HCl-CH₃OH에 용해시키고 ampule에 넣어 질소로 충전하고 밀봉시킨뒤 100±5°C에서 24시간 동안 가수분해시켰다. 여과하고 감압농축시킨뒤 1ml의 pyridine에 용해시켰다. 0.2ml의 hexamethyldisilazane과 0.1ml의 trimethyl chlorosilane을 가하고 30초 동안 맹렬히 진탕시켜서 trimethylation 시킨후 G.L.C.을 행하였다.

4. 항암 실험

A strain mouse 40마리의 오른쪽 겨드랑이에 sarcoma 180 cell 0.1ml (2×10⁶ cell)을 주사하였다. 각군은 8마리씩 하고 대조군, RP 10mg/kg/day ip 및 50mg/kg/day ip 및 MA 10mg/kg/day 및 50mg/kg/day의 5군으로 하였다. 암세포를 이식한 다음날 부터 연속하여 약물을 10일간 주사하고 투여날로부터 28일째 쥐를 죽이고 암을 적출하여 무게를 측정하고 평균치를 얻었다. 이식증양의 저지백분율(I.R.=inhibition ratio)는 다음과 같이 계산했다.

$$I.R. = \frac{C_w - T_w}{C_w} \times 100$$

C_w: 대조군의 평균 종양 무게

T_w: 처치군의 평균 종양 무게

結果 및 考察

1. 아미노산

1) 유리 아미노산

표준아미노산, RP 및 MA 시료처리용액에 대해 G.L.C.을 행하여 각각의 chromatogram을 얻고(Fig. 1~3) 각각의 아미노산을 반치폭법을 이용하여 정량하였다(Table III).

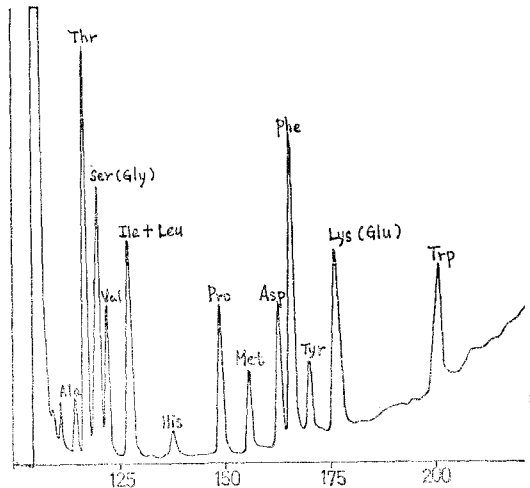


Fig. 1. Chromatogram of standard amino acids (G.C.)

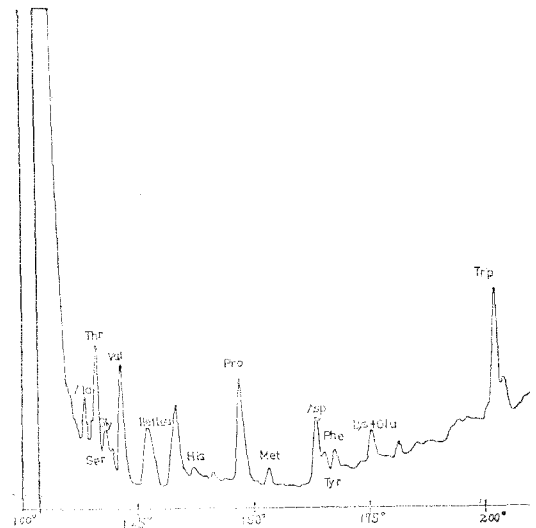


Fig. 2. Chromatogram of amino acids of *Russula pseudodelica* (G.C.)

Table III. Contents of free amino acids (mg/g)

	RP	MA		RP	MA
Ala	3.25	0.22	Pro	3.23	0.28
Thr	0.71	0.16	Met	0.68	1.39
Gly	1.46	0.19	Asp	1.47	0.63
Ser	0.14	0.03	Phe	0.12	trace
Val	4.52	2.41	Tyr	1.11	0.02
Ile (Leu)	0.75	0.15	Lys (Glu)	0.41	0.38
His	2.93	1.28	Trp	2.23	0.21

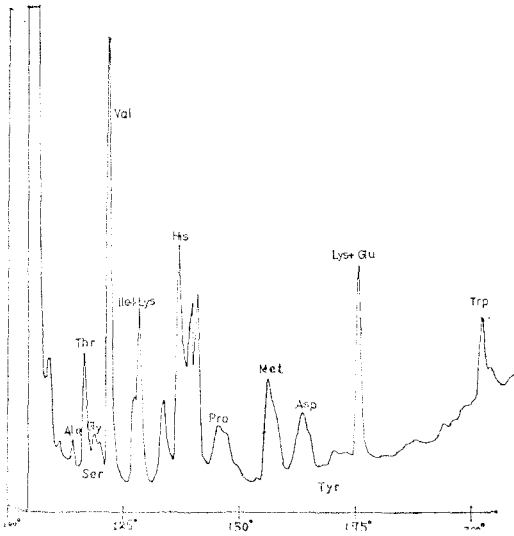


Fig. 3. Chromatogram of amino acids of *Micoporus affinis* (G.C.)

2) 총아미노산

표준아미노산, RP 및 MA 시료용액의 chromatogram 을 얻었으며 (Fig. 4~6) 각각의 총아미노산은 반치폭 법을 이용하여 정량하였다 (Table IV).

2. 다당류

1) 성분 분석 실험

RP 및 MA 추출물에 대한 발색반응은 Table V과 같 으며 이 추출물은 다당류 및 단백질로 구성되어 있는 것을 알 수 있다.

2) 다당류 함량 및 구성당류

Anthrone 실험에 의한 당류 함량 및 G.L.C.에 의한 구성당류의 결과는 Table VI과 같으며 2가지 비석 모 두 glucose가 주성분을 이루고 있다. 이외에 galactose, mannose가 소량씩 검출되었다. MA의 경우 G.L.C.에 서는 xylose가 나타나지 않았으나 H.P.L.C.에서는 xylose peak를 볼 수 있었다.

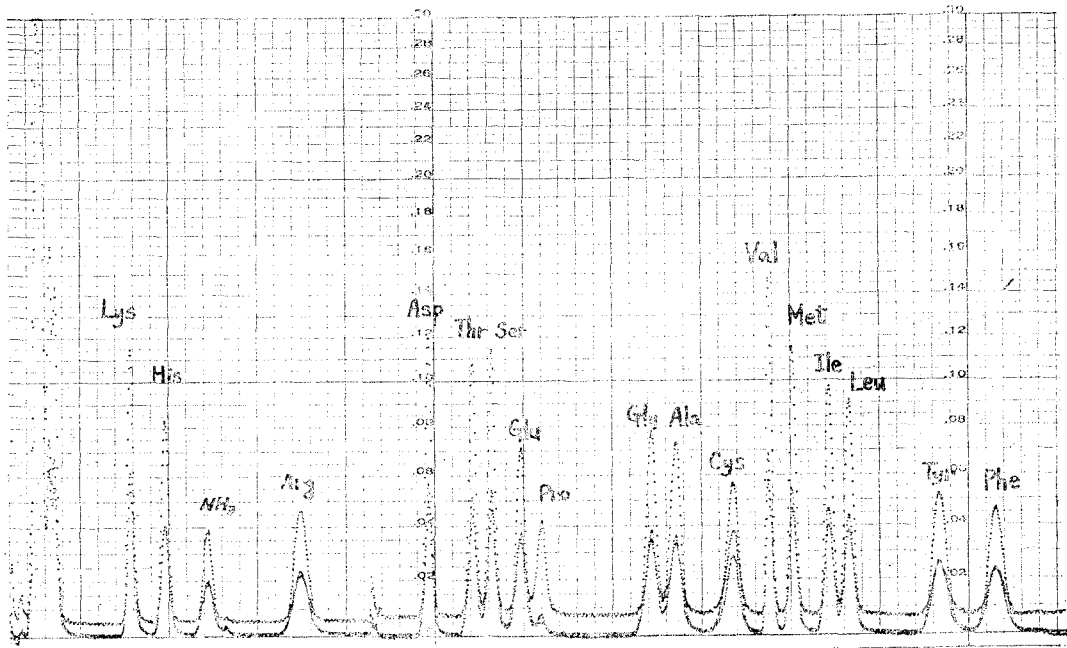


Fig. 4. Chromatogram of standard amino acids (A.A.A.)

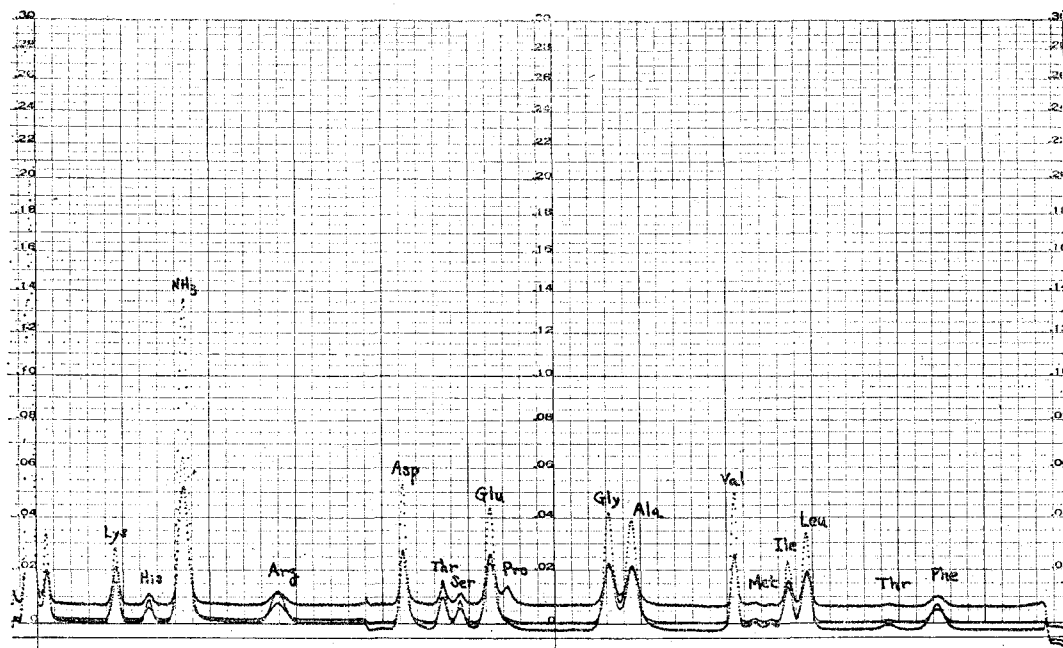


Fig. 5. Chromatogram of amino acids of *Russula pseudodelica* (A.A.A)

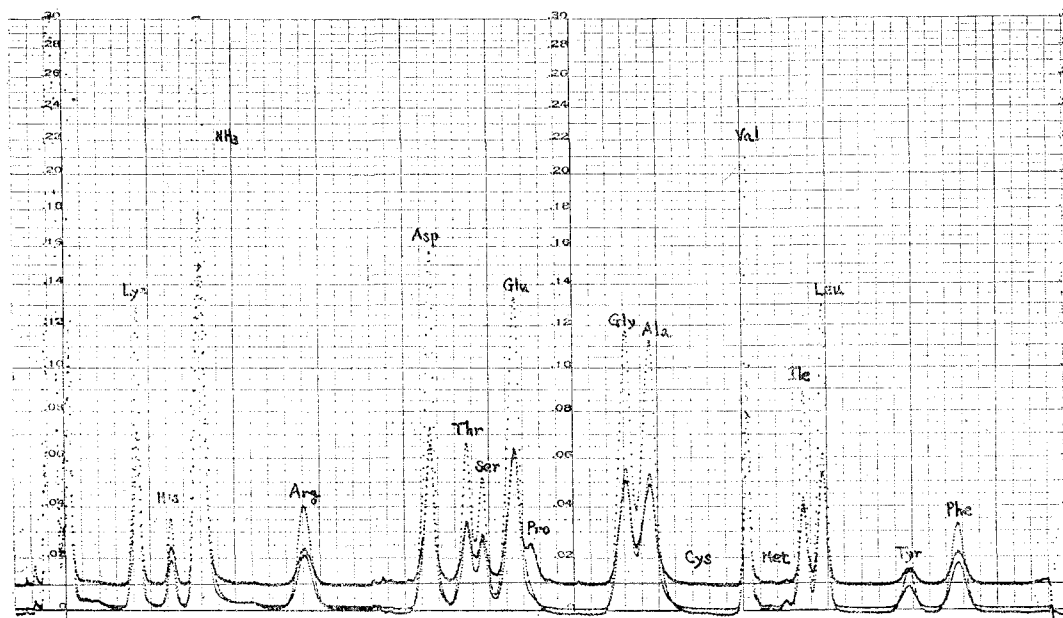


Fig. 6. Chromatogram of amino acids of *Microporus affinis* (A.A.A)

Table IV. Contents of total amino acids (mg/g)

Sample	R P	MA	Sample	R P	MA
Amino Acid			Amino Acid		
Lys	9.01	3.58	Ala	10.95	3.27
His	3.38	1.34	Cys	trace	trace
Arg	10.50	3.12	Val	9.63	2.56
Asp	15.60	4.55	Met	0.55	trace
Thr	3.70	1.69	Ile	5.24	1.93
Ser	2.19	0.76	Leu	11.76	3.77
Glu	21.43	7.36	Tyr	1.12	1.01
Pro	3.75	0.28	Phe	6.49	2.24
Gly	8.63	2.81			

Table V. Results of various color reactions

	R P	MA
Anthrone	## dark green	##
Molish	## purple	##
Ninhydrin	—	—
Ninhydrin test after acid hydrolysis	## red violet	##
Lowry Folin	## dark blue	##

Table VI. Contents of the sugars of the polysaccharides

	R P	AM
Total content (%) (after Anthrone test at 620nm)	56.8	74.6
Monosaccharide content(%)		
Glucose	74.2	91.5
Galactose	13.1	1.4
Mannose	10.0	7.2
Xylose	2.8	—

3. 함양 실험

평균 체중 25g의 마우스에 대한 실험결과는 Table VII과 같다. *R. pseudodelica* 10mg 및 50mg의 경우 저지 백분율이 각각 85% 및 78.6%이었으나 생존마리수가 각각 3마리, 2마리였으므로 확정적 함양효과로 판정할 수는 없다.

*M. affinis*의 10mg은 저지백분율이 92.76%이었고 생존마리수가 6마리이었기 때문에 함양작용이 있는 것으로 사료된다.

Table VII. Effects of the aqueous extracts of mushrooms on mice bearing sarcoma-180

	Average tumor weight (g)	Inhibition ratio (%)	100% regression
Control (8mice/group) i.p. saline	701.8±252.2		
R P			
10mg/kg	105±77	85.0	1/8
50mg/kg	150	78.6	1/8
MA			
10mg/kg	72.4±20.6	89.7	2/8
50mg/kg	38	94.6	2/8

結 論

1. *Russula pseudodelica*에 함유된 유리아미노산은 alanine, threonine, glycine, serine, valine, isoleucine, leucine, histidine, proline, methionine, aspartic acid, phenylalanine, tyrosine, lysine, glutamic acid, tryptophane의 16종이고, *Microporus affinis*에 함유된 유리아미노산은 alanine, threonine, glycine, serine, valine, isoleucine, leucine, histidine, proline, methionine, aspartic acid, phenylalanine, tyrosine, lysine, glutamic acid, tryptophane의 16종이었다.

2. *R. pseudodelica*에 함유된 총아미노산은 glutamic acid 21.43mg/g가 가장 많았고, *M. affinis*에 함유된 총아미노산도 역시 glutamic acid 7.36mg/g가 가장 많았다.

3. *R. pseudodelica* 및 *M. affinis*의 추출물의 주성분은 단백질과 다당류가 결합된 것이며, 각 다당류는 4가지 당, 즉 glucose, mannose, galactose 및 xylose로 구성되어 있다.

4. *M. affinis*의 추출물이 sarcoma 180에 대하여 항암작용을 나타냈다.

감사의 말씀

이 연구에 소유되는 경비의 일부는 문교부 79년도 대학원 육성 연구조성비로 충당되었으며 이에 감사 드리는 바이다. 이 실험에 협조하여준 박동우 학사 및 미생물약품화학 교실의 여러분에게 감사한다.

References

Kim, B.K. (1968): *Yakhak Hoeji* 12, 85.

Min, Choi and Kim: Constituents of Higher Fungi(XVIII)

- Kim, B.K. (1978): *Yakhak Hoeji* 22, 91.
- Kim, B.K., Kim, N.D., Choi, N.J., and Lee, Y.N. (1970): *Yakhak Hoeji* 14, 15.
- Kim, B.K., Choi, E.C., and Chi, H.J. (1973): *Korean J. Pharmacogn.* 4, 39.
- Kim, B.K., Choi, H.K., and Choi E.C. (1976). *J. Natl. Acad. Sci. Republ. Korea* 15, 212.
- Kim, B.K., Kang, C.Y., Choi, E.C., and Kim, K.H. (1976): *Korean J. Mycol.* 4, 27.
- Kim, B.K., Lee, Y.S., Choi, E.C., Shim, M.J., and Lee, Y.N. (1977): *Korean Biochem. J.* 10, 47.
- Kim, B.K., Lim, J.H., Yoon, I.H., Park, O.J., and Kim, H.S. (1971): *Korean J. Pharmacogn.* 2, 31.
- Kim, B.K., Jang, S.Y., and Shim, M.J. (1978), *Korean J. Mycol.* 6, 1.
- Kim, B.K., Shim, M.J., and Sohn, J.S. (1978): *Korean J. Mycol.* 6, 53.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y., and Fukuoka, F. (1970): *Cancer Res.* 30, 2776.
- Choi, E.C., and Kim, B.K. (1975): *Korean J. Pharmacogn.* 6, 1.
- Gehrke, C.W., Kuo, K., and Zumwalt, R.W. (1971): *J. Chromatog.* 57, 207.
- Huh, B.S. (1960): M.S. thesis, Graduate School, Chung Ang Univ., Seoul, 31pp.
- Ikekawa, T., Nakanishi, M., Vehara, N., Chihara, G., and Fukuoka, F. (1968): *Gann* 59, 155.
- Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M., and Fukuoka, F. (1969): *Cancer Res.* 29, 734.
- Rees, M.W. (1946): *Biochem. J.* 40, 632.
- Shibata, S., Nishikawa, Y., Mei, C.F., Fukuoka, F., and Nakanishi, M. (1968): *Gann* 59, 159.
- Turner, W.B. (1971): *Fungal Metabolites*, 466 pp., Academic Press, London and New York.
- Zumwalt, R.W., Kuo, K., and Gehrke, C.W. (1971): *J. Chromatog.* 55, 207.

<Received 3 October 1979>