

G009의 물리 화학적 특성

박만기 · 박정일 · 이미영 · 박인정
김수웅* · 이승룡* · 정 훈* · 이준우* · 한만덕*
서울대학교 약학대학, *일양약품

Physicochemical Properties of G009

Man Ki PARK, Jeong Hill PARK, Mi Young LEE, In Jeong PARK,
Su Ung KIM*, Seong Yong LEE*, Hoon JEONG*
June Woo LEE* and Man Deuck HAN*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742
*Il Yang Pharm. Co., Seoul, 136-130, Korea

(Received September 26, 1994; accepted October 23, 1994)

Abstract—G009, isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum*, has been reported as a potent liver-protecting compound. To characterize this compound, its physicochemical properties were studied. The average molecular weight of the most abundant constituent of G009 was 9.4 kD. The contents of carbohydrate and protein in G009 were 70% and 12.4%, respectively. The main carbohydrate constituents were glucose, xylose, mannose and galactose. Seventeen kinds of amino acid were detected. The contents of carbon, hydrogen, and nitrogen were 40, 5.7, and 1.8%, respectively. Ca, Mg, Zn were also determined.

Keywords □ *Ganoderma lucidum*, physicochemical properties of G009.

영지버섯(*Ganoderma lucidum*(Fr.) Karst)은 예로부터 일명 신지, 옥래, 만년 버섯, 불로초, 불사초라고도 불려 왔으며, 신농본초경에는 영지버섯이 이노, 보견, 강장, 정신 안정 작용, 관절염, 해소 및 기관지염 등의 치료에 광범위하게 사용되었음을 기술하고 있다.

영지는 자연 상태에서 매우 드물게 발생되기 때문에 희귀품으로 취급되어 왔으나, 1972년 중국에서 인공 재배에 성공한 이래, 일본, 한국에서도 인공 재배가 활발히 진행되어 왔고, 그동안 영지버섯의 약효에 관한 관심이 고조되어 그 약효의 규명에 관해서도 많은 연구가 진행되어 왔다.

1979년 Arichi 등(有地滋 등, 1979)이 영지의 열수 추출액이 자연발증 고혈압 쥐의 혈압을 강하시킨다는 결과를 보고한 이후, 영지의 고혈증 개선 효과(九保 등, 1980), 항암 효과(김 등, 1980), 혈전 억제 효과(Kubo 등, 1983; Shimizu 등, 1985), insulin 분비 효과(木村 등, 1983; Hikino 등, 1989), 알러지 예방 효과 및 항염증 작용(Kohoda 등, 1985), 보체계 활성화 효과(이 등, 1990; 정 등, 1990),

혈당 강하 작용(木村 등, 1983; Hikono 등, 1989) 등이 연구되어, 영지버섯에는 다양한 약효를 나타내는 물질이 있다는 것이 보고되었다. 1983년 Toth 등(Toth 등, 1983)은 영지버섯의 배양 균사체에서 lanostane 계통의 새로운 물질 6개를 분리하여 구조를 밝히고 ganoderic acid U, V, W, X, Y 및 Z라 명명하였는데 이중 정상 간세포에는 독성을 나타내지 않았으나 간암세포에는 특이하게 독성을 보이는 물질이 있어, 영지버섯의 배양 균사체가 간장 치료제로서의 개발 가능성이 있음을 입증하였다. 한편 국내에서는 전남 해남에서 채집한 영지버섯의 균사체인 IY009로부터 분리한 G009가 간섬유화 억제효과를 가짐이 보고된 바 있다(Kim 등, 1994).

본 연구에서는 이 G009의 특성을 밝히기 위한 연구의 일환으로 G009의 여러가지 물리화학적 성질을 규명하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

기기 및 시약 : 분석에 사용된 기기는 Shimadzu 2101 PC UV-VIS spectrophotometer, Perkin-Elmer 5500 ICP

* To whom correspondence should be addressed.

spectrometer, Perkin-Elmer 240C elemental analyzer, Hewlett-Packard 5890 Series II gas chromatograph, Beckman 6300 amino acid analyzer 등이다.

탈이온수는 Millipore super Q, RO-60(Millipore, 미국)으로 제조하여 사용하였고, GC 측정을 위한 유도체화 반응에 hexamethyldisilazane(HMDS, TCI, 일본), trimethylchlorosilane(TMCS, Nakarai chemical Ltd., 일본)을 사용하였다. 단백질 정량 시약인 BSA protein assay reagent는 Pierce사로부터, 겔 여과 크로마토그래피용 Sepharose CL-4B(dry bead diameter 60~140 μm) 및 dextran(9.4 kDa, 66.7 kDa, 476 kDa)은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

G009의 제조 : 영지 균사체 IY009를 종균 배양하여 얻어진 종균을 미리 조제된 배양액이 담겨진 발효조에서 6일간 배양하였다. 배양 균사체를 수산화나트륨(약 1 M) 처리하여 실온에서 방치후 초산으로 중화하여 원심분리한 후 여액을 분자량 10,000의 한외여과막을 통하여 분리된 농축물을 동결 건조하여 제조하였다(Scheme 1).

무기원소분석 : 시료 약 1 g을 취하여 질산 20 ml, 과염소산 10 ml를 가해 섞은 후 가열하여 유기물을 분해한 후 이 액을 25 ml 용량플라스크에 옮기고 탈이온수로 표선을 채워 검액을 제조하였다. ICP를 이용하여 검액 중의 Na, K, Mg, Ca, Al, Fe, Cu, Zn을 정량했다.

유기원소분석 : 건조한 시료 약 1 mg을 정밀히 취하여 원소 분석기를 이용하여 시료중의 C,H,N의 비율(무게%)을 측정했다. 표준물질로는 acetanilide를 사용했다.

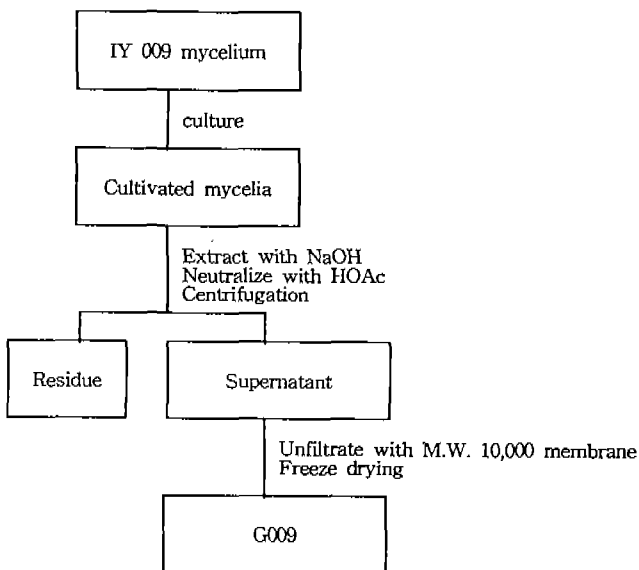
당의 정량 분석 : 시료중 당의 총함량은 glucose를 표준 용액으로 하여 페놀-황산법(Duboise 등, 1956)에 의해 측정하였다.

당 성분의 분석 : 시료중 포함된 당을 분석하기 위해 시료 10 mg을 2 M CF_3COOH 3 ml에 녹여 앰플에 옮기고 내부를 질소로 치환하여 앰플을 봉한 후 100°C에서 4 시간 동안 가열하여 가수분해한 액을 10 ml 용량플라스크에 옮기고 탈이온수로 표선을 채웠다. 그 중 5 ml를 냉동건조시킨 잔사에 무수피리딘 150 μl , HMDS 100 μl , TMCS 50 μl 를 가하고 100°C에서 45분간 반응시켜 GC용 검액으로 하였다. OV-1 컬럼(3%, 12 m)을 이용하여 150°C에서 분석하였고 FID로 검출하였다.

단백질의 정량 분석 : 단백질은 BSA를 표준 물질로 사용하여 BSA protein assay reagent를 사용하여 정량하였다(Smith 등, 1985). 건조한 시료 약 10 mg을 2 M-NaOH 3 ml에 녹이고 염산으로 중화한 후 이 액을 50 ml 용량플라스크에 옮기고 탈이온수로 표선을 채워 검액을 제조하고 BSA를 표준용액으로 하여 Coomassie blue G 250시약(0.06% solution in 2.2% HCl)과 반응시킨 후 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 탈이온수 : Coomassie blue G250시약 % 1:1 혼액을 대조액으로 하였다.

아미노산 분석 : 시료중의 아미노산 분석을 위해 시료 4 mg을 1 ml의 6 M HCl에 용해시켜, 질소를 충전한 후 밀봉하여 110°C에서 4시간 가수분해시켰다. 여과하여 침전을 제거한 후 감압농축하여 건조된 시료를 0.08 M sodium citrate와 0.2 M HCl이 함유된 완충용액 2 ml에 용해시킨 후, 이중 50 μl 를 아미노산 분석기에 주입하여 분석하였다.

분자량 분포의 측정 : 분자량은 Sepharose CL-4B 컬럼을 이용하여 측정하였다. 이때 분자량 표준품으로 분자량 9.4, 66.7, 476 kDa의 dextran을 사용하였으며 당의 검출은 페놀-황산법을 이용하였다.



Scheme 1. Preparation of G009 from cultivated mycelia of *Ganoderma lucidum* IY009.

Table I. Relative content of amino acids of G009.

Amino acids	Composition(%)
Aspartic acid	2.21
Threonine	6.02
Serine	6.71
Glutamic acid	1.80
Proline	8.36
Glycine	13.74
Alanine	11.06
Cysteine	0.37
Valine	9.30
Methionine	0.83
Isoleucine	8.18
Leucine	12.65
Tyrosine	0.41
Phenylalanine	1.63
Histidine	1.90
Lysine	5.29
Arginine	4.66
Others	4.88

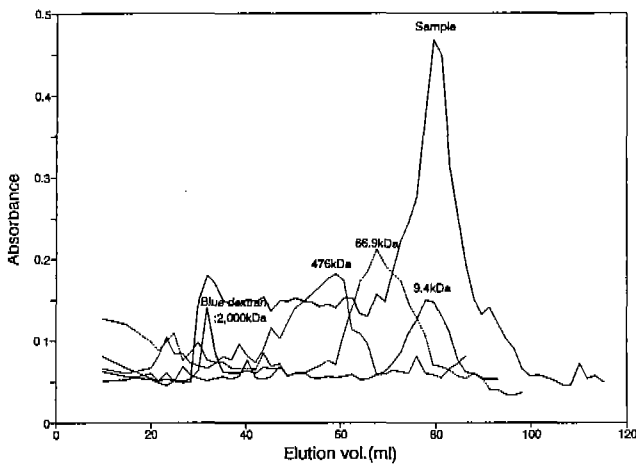


Fig. 1. Gel chromatogram of G009.

결과 및 고찰

G009의 무기원소 및 유기 원소 분석 결과, 분석 대상으로 한 금속 원소중 Mg, Al, Fe, Cu, Zn 등이 각각 16.0, 1.64, 5.48, 5.69, 9.81 ppm 검출되었으며, Ca은 386.0 ppm으로 상당량 포함되어 있는 것으로 나타났다. 한편 유기 원소 분석 결과는 탄소, 수소, 질소의 무게비가 39.80%, 5.70%, 1.84%임을 보여 주었다.

페놀-황산법에 의한 당의 정량 결과, glucose로 환산하였을 때 약 70%의 함량을 나타내어, G009의 상당 부분이 당으로 구성되어 있음을 알 수 있었다. GC에 의해 구성 당 성분을 분석한 결과, 상대적 함량은 xylose 12%, galactose 8%, mannose 9%, glucose 70%였다.

한편, 단백질은 약 12.4% 포함되어 있는 것으로 나타났다. 구성 아미노산은 Table I과 같이 alanine, glycine, leucine 등을 주로 하는 17종이 포함되어 있음을 알 수 있었다.

분자량 분포를 조사하기 위해 구한 표준용액 및 검액의 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. G009의 겔 여과 크로마토그램은 분자량 2000 kDa 및 9.4 kDa에 해당하는 분획에서 큰 피크를 나타내었는데, 이 중 9.4 kDa에 해당하는 분획은 이 시료에 대하여 약 48%의 함량을 보였다.

이상의 결과로부터 G009는 9.4 kD의 분자량을 갖는 당화합물을 주성분으로 하는 단백다당체로 사료된다.

결론

Ganoderma lucidum 균사체로부터 얻어진 G009의 이화학적 특성을 규명하였다. G009는 분자량 9.4 kD의 당화합물을 주성분으로 하는 단백다당체로, 당의 함량은 약 70%, 단백질의 함량은 약 12.4%였다. G009의 주요 구성당은 glucose, xylose, mannose, galactose 등이었고,

glycine, leucine, alanine 등 17종의 아미노산이 포함되어 있는 것으로 나타났다. 유기원소 분석 결과 G009는 탄소 약 40%, 수소 5.7%, 질소 1.8%의 구성비를 보였으며, 무기원소로는 Ca, Mg, Zn 등이 확인되었다.

참고문헌

- Duboise, M. K., Gilles, A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). *Anal. Chem.*, **28**, 350.
- Hikino, H., Ishiyama, M., Suzuki, Y. and Konno, C. (1989). Mechanism of hypoglycemic activity of ganoderan B: A glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies, *Planta Med.*, **55**, 423-428.
- Jeong, H., Lee, J. W. and Lee, K. H. (1990). Studies on anticomplementary activity of Korean higher fungi, *Kor. J. Mycol.*, **18**, 145-148.
- Kim, B. K., Chung H. S. and Yang M. S. (1980). Studies on the antineoplastic components of Korean basidiomycetes. *Kor. J. Mycol.* **8**, 107-113.
- Kim, J. B., Sohn, D. H., Kim, K. Y., Park, E. J., Kim, S. U., and Lee, S. Y. (1994). The antifibrotic effect of G009, '94 Annual meeting of KSAP & the 3rd symposium on new drug development, 202.
- Kohoda, H., Tokumato, W., Sakamoto, K., Fugi, M., Hirai, Y., Yamasaki, K., Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S. and Ushida, M. (1985) The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum*(Fr)Karst., histamine release inhibitory triterpenes., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1367-1374(1985).
- Kubo, M., Matsuda, H., Nogami, M., Arichi, S. and Takahashi, T. (1983). Studies on *Ganoderma lucidum*. IV. Effect on the disseminated intravascular coagulation, *Yakugaku Zasshi*, **103**, 871-877.
- Lee, J. W., Chung, C. H., Jeong, H. and Lee, K. H. (1990). Effects of alkali extract of *Ganoderma lucidum* IY007 on complement and reticuloendothelial system, *Kor. J. Mycol.*, **18**, 137-144.
- Shimizu, A., Yano, T., Saito, Y. and Inada, Y. (1985). Isolation of an inhibitor of platelet aggregation from a fungus, *Ganoderma lucidum*, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3012-3015.
- Smith, P. K., Krohn, R. L., Hermanson, G. T., Mallita, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Koeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). *Anal. Biochem.*, **150**, 75.
- Toth, J. D., Luu, B. and Ourisson, G. (1983). Les acides ganoderiques T a Z, triterpens cytotoxiques de *Ganoderma lucidum*(Polyporaceae), *Tetrahedron letters*, **24**, 1081-1084.
- 九保道德, 松田秀秋, 田中基晴, 木村善行, 谿忠人, 有地滋, 奥田拓道, 桐谷纪昌 (1980). 영지(*Ganoderma lucidum*, 자실체)의 연구, 기초와 임상(제3보), 기초와 임상(일본), **14**, 2455-2460.
- 木村善行, 有地滋, 高橋猛 (1983). 영지가 당대사에 미치는 영향, 기초와 임상(일본), **17**(7), 164-167.
- 木村善行, 有地滋, 高橋猛 (1983). 영지가 당대사에 미치는 영향, 기초와 임상(일본), **17**(164), 2127-2130.
- 有地滋, 九保道德 (1979). 영지(*Ganoderma lucidum*, 자실체)의 연구, 기초와 임상(일본), **13**(12), 112-117.