

영지버섯의 화학적 계통분류를 위한 HPLC분석 방법에 관한 연구

윤대은¹ · 박영진¹ · 권오철¹ · 남재영¹ · 김홍일¹ · 유영복² · 공원식² · 이창수^{1*}

¹건국대학교 글로컬캠퍼스 의료생명대학 의생명화학과, ²국립원예특작과학원 버섯과

Study on HPLC conditions for chemotaxonomy of *Ganoderma* species

Dae-Eun Yoon¹, Young-Jin Park¹, O-Chul Kwon¹, Jae-Young Nam¹, Hong-Il Kim¹,
Young-Bok Yoo², Won-Sik Kong² and Chang-Soo Lee^{1*}

¹Department of Biomedical Chemistry, Konkuk University, Chung-Ju 380-701, Republic of Korea

²Mushroom Research Division, Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Uemseong 369-873, Korea

(Received May 21, 2013. Accepted June 3, 2013)

ABSTRACT – This study was carried out to optimize the conditions for a chemotaxonomic classification of *Ganoderma* species. The mycelia of *Ganoderma* species were extracted with 100% MeOH, and the concentrated extracts were further purified and partitioned with column chromatography (HP20) and *n*-BuOH, respectively. From the result of high-performance liquid chromatography (HPLC), the constituents of the samples were efficiently separated with a Chemco Pak C₁₈ column (250 mm×4.6 mm) by linear gradient elution using water and acetonitrile as mobile phase components at a flow rate of 0.8 ml/min and detector wavelength at 210 nm. However, the samples without purification or partition were not detected the characteristic peaks. This profile could be used to classify and identify the various *Ganoderma* species.

KEYWORDS – Chemotaxonomy, HPLC, *Ganoderma* species

서 론

*Ganoderma lucidum*을 포함한 영지 속 (*Ganoderma*)은 열대, 아열대 및 온대 지방을 포함한 아시아, 유럽 북미주 등 전 세계적으로 널리 분포하고 있는 목재 부후균으로 미국 9종, 일본 5종, 대만 13종, 중국 64종, 한국 4종이 보고되어 있다 (김 등, 2005; 조 등, 2012b). 영지버섯은 오래 전부터 한국, 중국 일본 등 아시아에서 약용버섯으로 취급되어 왔으며, 현재는 항암, 항종양, 고혈압, 당뇨 등과 관련된 여러 약효와 유효성분이 과학적으로 규명되고 있다 (김 등, 2005). 그러나, 온대지방인 우리나라에서 자생하고 있는 영지의 대부분이 아열대열대지방에서 자생하는 *G. lucidum*으로 발표 되고 있어(김 등 2004), 이들의 확실한 종을 구별할 필요가 있다. 영지속 중 *G. lucidum*은 *G. tsugae*의 자실체 형태와 매우 비슷하기 때문에 자실체 형태만으로는 그 분류가 매우 어렵다. 또한, 다양한 지역에서 분리된 많은 수의 영지버섯 수집 균들에 대한 동정 및 판별이 잘못되고 있는 실정이다

(Smith and Sivasithamparam, 2000). 이를 극복하기 위하여 최근에는 분자유전학적 방법인 Ribosomal RNA (rRNA) 유전자의 internal transcribed spacer (ITS) 및 β -tubulin 유전자의 염기서열분석을 통한 영지버섯의 정확한 분류 및 동정이 시도되고 있다 (Park *et al.*, 2012). 그러나 영지버섯은 동일한 종이라도 재배지역 및 생육환경에 따라 2차 대사산물 및 생리활성 물질의 함량에 차이를 보이는 것으로 보고되고 있다 (조 등, 2012a, 2012b). 본 연구에서는 2차 대사산물의 특징에 따른 영지버섯의 특성을 규명하고 프로파일을 구축하기 위한 HPLC 분석기술의 조건을 확립하여 영지버섯에 의해 생산되는 대사산물을 기반으로 한 분류 연구의 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

본 시험에서는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과에서 분양받은 영지버섯균주 영지2호(*Ganoderma*

*Corresponding author: cslee@kku.ac.kr

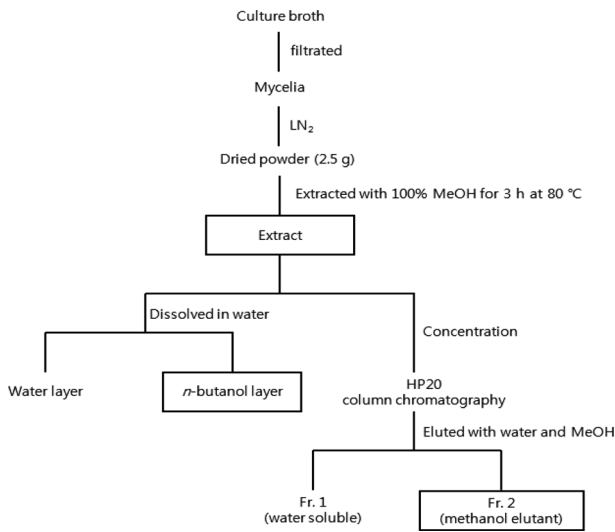


Fig. 1. The process of extraction and fractionation of *Ganoderma* species. Boxes indicate the samples used in HPLC analysis.

lucidum ASI7071), *Ganoderma* sp. ASI7151 농촌진흥청 농업유전자원센터 (Korean Agricultural Culture Collection, RDA) 분양받은 *Ganoderma lucidum* KACC42863 (Canada), *Ganoderma lucidum* KACC42867 (Taiwan) 및 *Ganoderma tsugae* KACC42878 (Canada) 를 공시하였다. 영지의 균사배양은 먼저 감자배지 (Potato Dextrose Agar)에 접종한 후 암상태의 30°C 항온기에서 배양하였다. 15일간 배양 후 균사를 다시 4 l의 PDB배지에 접종하여 30°C에서 120 rpm으로 10 일간 진탕배양 하였다. 배양된 균사는 2겹의 Miracloth

(CalBiochem Co.)로 걸러 배지를 제거한 후 액체질소를 이용하여 마쇄하고 25°C의 dry oven에서 3일간 건조하였다. 건조된 균사시료를 10배의 100% MeOH을 이용하여 80°C에서 3시간 1차 환류추출 하였다. 또한 Fig. 1에 따라 실시하여 추가로 부탄올 분획물과 메탄올에 용출된 분획물을 HPLC분석에 이용하였다. HPLC (DGU 20A5, Shimazu Co.) 분석은 역상 컬럼 (Chemco Pak C₁₈, 250 mm×4.6 mm), SPD-20A dual UV-Vis detector, LC-20AT pumping system, manual injection valve (20 µl loop), LC solution software를 이용하였다. 이동상은 HPLC grade water (A)와 Acetonitrile (B)를 사용하여 0-5 min, 0-5% (B); 5-30 min, 5-11% (B); 30-40 min, 11-70% (B); 40-80 min, 70-90% (B); 80-100 min, 90-100% (B)의 linear gradient program조건으로 수행하였고, 또한, 0분부터 10분단위로 총 110분간 각 10% (B) 농도의 gradient program조건으로 수행하였다.

결 과

우선, 영지버섯의 자실체와 균사체의 spectrum 차이를 비교분석하기 위해, 메탄올추출물의 농도를 50 mg/mL로 일정하게 하여 HPLC분석을 수행한 결과 균사체로부터 추출된 시료에서는 전반적으로 peak가 검출되지 않았다 (Fig. 2a). 그러나, 영지버섯 자실체로부터 추출된 시료에서는 다양한 peak들이 관찰되었다 (Fig. 2b). 이러한 결과는 2차 대사산물 중 당의 상대적 함량이 자실체 보다 균사체가 많음으

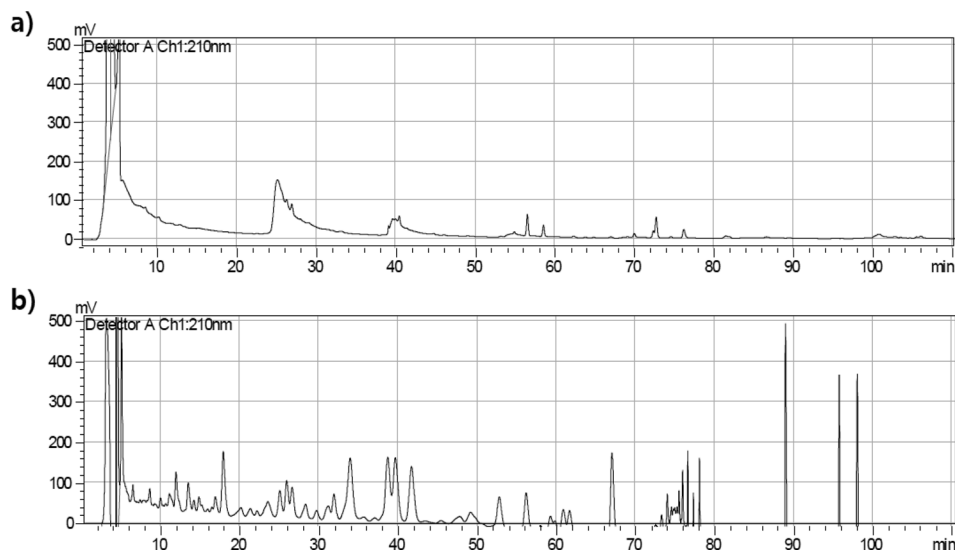


Fig. 2. HPLC profiles with gradient program of the MeOH extract of the *Ganoderma lucidum* ASI7071. a) mycelial extract, b) fruit body extract.

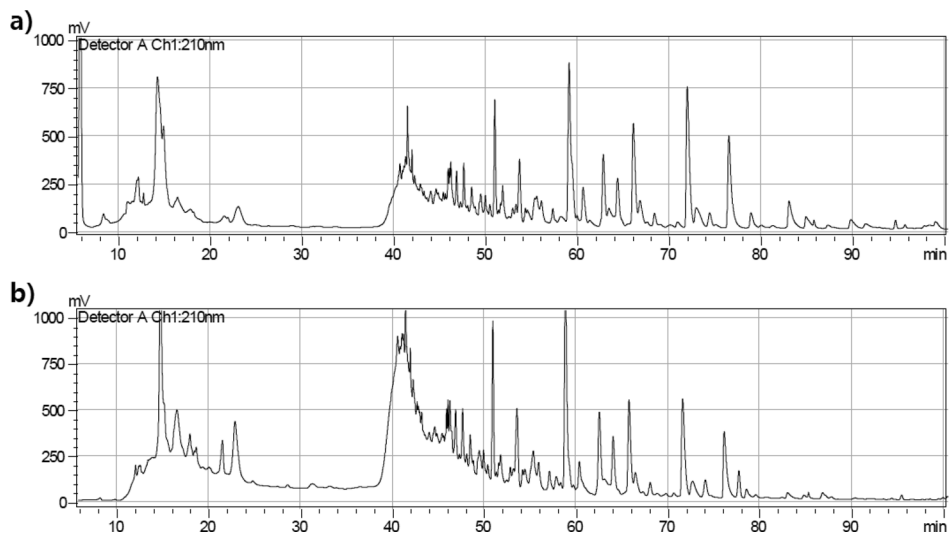


Fig. 3. HPLC profiles with linear gradient program of *Ganoderma* sp. ASI7151. a) n-Butanol partition, b) eluant from HP20 column chromatography.

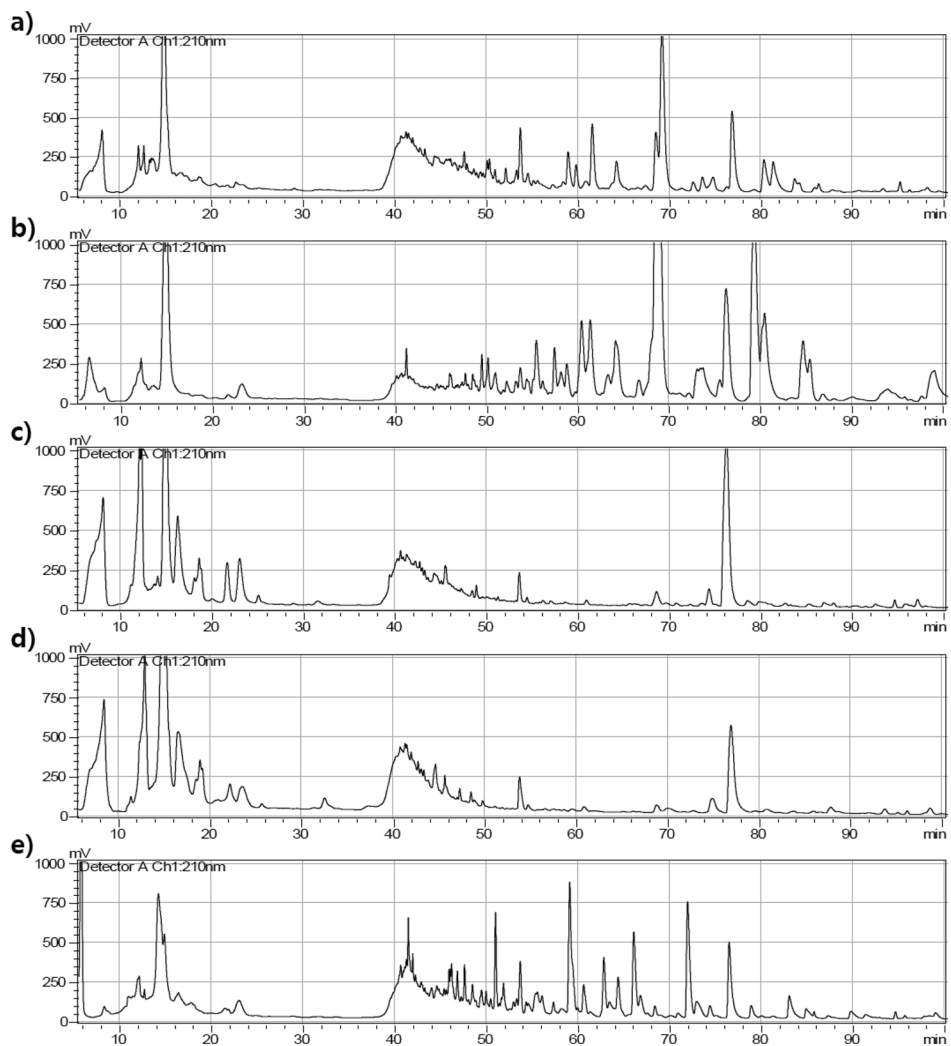


Fig. 4. HPLC profiles with linear gradient program of the n-Butanol fraction of the *Ganoderma* species mycelia. a) *G. lucidum* ASI7071, b) *G. lucidum* KACC42867 (Taiwan), c) *G. lucidum* KACC42863 (Canada), d) *G. tsugae* KACC42878 (Canada), e) *Ganoderma* sp. ASI7151.

로써 나타나는 것으로 사료된다 (이 등, 1999; 차 등, 2004). 또한 일반적으로 톱밥 혹은 원목을 이용하여 재배되는 영지버섯의 자실체와는 달리 균사체는 배지 상에서 성장하여 2차 대사산물의 조성에 차이가 있는 것으로 사료된다. 본 연구에서는 이러한 결과를 재확인 하고, 또한 분석의 효율성을 비교하기 위하여 부탄올분획과 HP20 column chromatography를 이용하여 친수성인 당을 제거한 후 각 시료를 다시 HPLC분석을 수행한 결과 두 가지 방법으로 처리되어 당이 제거된 각 시료 모두에서 다양한 peak들을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 추출된 2차 대사물질 중 친수성인 당 성분만의 분리를 위해 극성별 용매분획의 역순으로 부탄올 분획을 수행하였다. 이러한 결과는 영지버섯 균사체로부터 추출된 시료 중 다양한 저분자 물질들에 대한 HPLC분석은 상대적 함량이 높은 고분자 물질인 당을 제거한 후 수행해야 한다는 것을 의미하는 것이다. 상기의 방법 중 당을 제거하기 위하여 부탄올분획을 수행한 5종의 영지버섯(*G. lucidum* ASI7071, *G. lucidum* KACC42867, *G. lucidum* KACC42863, *G. tsugae* KACC42878, *Ganoderma* sp. ASI7151)시료에 대한 HPLC분석을 수행한 결과 다양한 peak를 확인할 수 있었고, 또한 각 시료의 특징적인 peak도 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 그 중 *G. lucidum* ASI7071 (영지 2호)와 *G. lucidum* KACC42867 (Taiwan)의 시료에서만 공통적인 peak (retention time 69 min)가 관찰되었다. 또한 모든 영지버섯 시료에 공통적인 peak(retention time 77 min)도 관찰되었다. 이러한 결과는 동일한 종이라도 지역적 차이에 의해 그 성분이 다르게 나타날 수 있다는 것을 의미한다 (조 등, 2012a, 2012b). 상기의 특이적 peak 들은 추후에 물질 분리 및 동정 등의 추가적 분석을 수행할 예정이다. 본 연구는 HPLC분석 기술을 이용하여 다양한 영지버섯 속의 2차 대사산물에 대한 HPLC chromatogram을 확인하여 그 차이를 규명하기 위해 수행하였다. 이를 위해서는 상대적 함량이 높은 고분자 물질인 당을 제거하는 것이 효율적인 분석방법임을 확인할 수 있었고, 이러한 분석 방법은 다양한 영지버섯들의 2차 대사산물들에 대한 프로파일 구축을 가능하게 할 것으로 생각되며, 추후 영지버섯연구의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

적요 및 고찰

본 연구는 영지버섯의 화학적 계통분류를 위한 분석

기술의 조건을 확립하기 위해 수행하였다. 다양한 영지버섯 균사의 물질들을 100% 메탄올을 이용하여 추출하였고, 또한 *n*-Butanol 및 HP20 column chromatography를 이용하여 추가적인 분획 및 정제를 수행하였다. HPLC 분석결과, 시료의 성분들은 Chemco Pak C18 column (250 mm×4.6 mm), 물과 아세트니트릴을 이동상으로 한 linear gradient 조건, 유속 0.8 ml/min, 검출 파장 210 nm에 의해 효과적으로 분리되었다. 그러나, 상기의 방법으로 정제 또는 분획을 하여 당을 제거하지 않은 시료들은 HPLC분석에서 특이적인 peak들이 전혀 관찰되지 않았다. 이러한 선행 연구결과는 추후에 다양한 영지버섯들에 대한 동정 및 판별에 유용한 자료로 사용될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2013년 농촌진흥청 공동연구사업 (과제 번호: PJ907021)에 의하여 수행한 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 김경수, 공원식, 최선규, 유창현, 고미석, 서건식. 2004. 영지버섯 수집균의 배양적 특성 및 자실체 형태에 따른 구분. 한국버섯학회지 **2**: 49-59.
- 김홍규, 김용균, 서관석, 오세현, 김흥기. 2005. 영지버섯 다수확 생산을 위한 최적조건에 관한 연구. 한국버섯학회지 **3**: 154-158.
- 이준우, 백성진, 방광웅, 김용석, 한만덕, 하익수. 1999. *Phellinus linteus* IY001의 자실체와 균사체 배양물로부터 분리한 다당류의 물리화학적 특성 비교. 한국균학회지 **27**: 424-429.
- 조재한, 노형준, 강돈호, 이지영, 이민정, 박혜성, 성기호, 전창성. 2012a. 영지버섯의 항산화 효과와 암세포 성장억제도. 한국버섯학회지 **10**: 203-207.
- 조재한, 노형준, 강돈호, 이지영, 이민정, 박혜성, 성기호, 전창성. 2012b. 영지버섯 균주별 자실체의 아미노산함량 비교 분석. 한국버섯학회지 **10**: 208-215.
- 차월석, 조배식, 박세영. 2004. 동충하초 추출물과 균사체의 성분 분석에 관한 연구. Journal of Life Science **14**: 727-731.
- Smith, B. J. and Sivasithamparam, K. 2000. Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia. Mycol. Res. **104**: 943-951.
- Park, Y. J., Kwon, O. C., Son, E. S., Yoon, D. E., Han, W., Nam, J. Y., Yoo, Y. B and Lee, C. S. 2012. Genetic diversity analysis of *Ganoderma* species and development of a specific marker for identification of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Afr. J. Microbiol. Res. **6**: 5417-5425.