

느타리버섯과 구름버섯의 아미노산 구성에 관한 연구

이현아¹ · 김병각¹ · 현진원^{2*}

¹서울대학교 약학대학, ²제주대학교 의과대학,
방사선응용과학연구소

Amino Acids of *Pleurotus ostreatus* and *Coriolus versicolor*

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

¹College of Pharmacy, Seoul National
University, Seoul 151-742, ²Department of
Biochemistry, College of Medicine and
Applied Radiological Science Research
Institute, Cheju National University, 66
Jejudaehakno, Jeju, 690-756, Korea

*Address correspondence to: Jin Won Hyun, Ph.D.
Department of Biochemistry, College of
Medicine and Applied Radiological Science
Research Institute, Cheju National University,
66 Jejudaehakno, Jeju, 690-756, Korea
Tel : (064) 754-3838 Fax : (064) 726-4152

Abstract

To find active components in Basidiomycetes, 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 derivatized with PITC derivative reagent and PITC amino acid was obtained. Then, they were analyzed by

RP-HPLC. The basidiocarps used were *Pleurotus ostreatus* and *Coriolus versicolor*. In this study, 23 amino acids were analyzed in standard amino acid, 16 amino acids in *Pleurotus ostreatus*, 7 amino acids in *Coriolus versicolor*.

Key words : Basidiomycetes, amino acid, RP-HPL

서 론

담자균류는 고등균류에 속하며 여러 용도로 사용되고 있고 많은 연구가 이루어져 왔다. 유효 성분
에 관한 연구로는 Ford 등 (1909)이 *Amanita*속
에서 amanitotoxin을, 항암 성분에 관해서는
Roland 등 (1960)이 *Calvatia gigantea*에서
calvacin을 보고한 이래 많은 연구가 진행되고 있
다. 우리나라에서는 Lee 등 (1959)이 처음 담자균
류의 분류를 시작한 이래 [1] 고등균류의 성분 연
구로는 Kim 등 (1971, 1975)이 alkaloids를 확인하
였고 [2] 또한 Kim 등 (1977)이 아미노산 함량분
석도 실시하는 것으로부터 그 성분과 약효에 관
한 연구가 계속되어 왔다 [3]. 본 실험실에서는 한
국산 고등 균류에 관한 실험을 계속 연구하였으
며 최근엔 여러 기기들의 발달로 성분분리가 용
이해 짐에 따라서 한국산 고등균류의 성분 연구
에 대한 관심이 높아지고 있다. 운지는 우리나라
에서 구름버섯으로 불리우며, Polyporaceae에 속
하는 균주로 그 학명은 *Coriolus versicolor*이다.
이 버섯에 관해 많은 연구가 이루어졌는데 특히
암세포인 sarcoma 180에 대해서는 강력한 종양
억제작용이 보고되었으며, 항암 기전과 항암 성분
에 관한 많은 연구가 진행되어 일본에서는 PS-K,
즉 krestin이란 상품명으로 시판되고 있다. 느타리
버섯은 식용버섯으로서 항암작용이 있음이 보고
되었으며 그 학명은 *Pleurotus ostreatus*이다.
Amino acid란 Amino group, NH₂, acid carboxyl
group, COOH를 함유한 유기 화합물로서 단백질을
구성하는 아미노산과 유리 아미노산으로 분류
할 수 있다. 유기 체내에선 일반적으로 양극성을

떠는 특징을 가지기 때문에 무기염에서의 아미노산 분리는 매우 어렵고 [4] 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, pipercolic acid 등을 들 수 있다. 일반적으로 유리 아미노산은 동물과 식물의 대사과정에서 생성되며 Harbone (1984)에 따르면 식물계에는 약 200 여종 이상의 유리 아미노산이 존재한다고 보고하였다 [5]. 유리 아미노산은 free pool amino acids라고도 불리우며 다른 중간에 free pool amino acids의 질적, 양적인 차이가 존재하리라고 생각되며 그 다양성의 의미는 매우 크다고 할 수 있다. 종간의 아미노산의 다양성은 유기체의 chemotaxonomy 연구에 있어 중요하리라 사료된다고 보고하였다 [6]. 그 예로서는 von Brand (1973)가 상관관계가 있는 유기체 즉, 상어의 촌충과 rat의 촌충 (*Hymenodipis dimenuta*)의 free pool amino acids의 차이를 보고한 논문이 있는데 상어의 촌충에서 가장 많은 아미노산은 glycine과 taurine이었으나 rat의 촌충에서 가장 많은 아미노산은 alanine과 glutamic acid이었다. Free pool amino acids 결정에 있어 많은 종류의 분석 기술이 사용되어야 하며 분석 방법에 따라서 분석되는 종류와 양은 차이가 있을 수 있다고 한다. 현재까지도 free amino acids에 관한 연구는 많이 되어있지 않으며 가장 많이 알려진 free pool amino acids의 역할은 곤충 등에서 근육계의 신경 전달 물질 억제제로 사용된 GABA (γ -aminobutyric acid) 정도이다.

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 유도

체화시키는 post column derivatization 방법을 사용했으나 낮은 감도와 느린 속도의 한계를 극복하기 위해 그 반대로 행해지는 pre column derivatization 방법이 개발되어 샘플을 유도체화한 후 분리는 RT-HPLC (reverse phase liquid chromatography)에 의해 하게 되었다. 이에 대해 free amino acids 분석시 충분한 분리, 높은 감도, 빠른 시간 내 측정 방법에 대한 많은 연구 결과가 나왔다. 그 유도체화 시약의 종류인 5 종류의 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 분해된다는 단점이 있다. 두번째로 FMOC-Cl 유도체 시약을 사용하는 방법은 단축된 시간, 2급 아미노산의 검출, 유도체화 시킨 시료의 안정성 등의 장점이 있으나 histidine과 taurine에 있어서 기존 방법의 20%와 30% 밖에 검출이 안되며 UV로 검출해야 한다는 단점이 있다. 세번째로 dansyl-Cl 유도체 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 잡 peak가 적다는 장점이 있다. 마지막으로 PITC 방법은 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 Henrikson등 [7]에 의한 방법이 Water사에 의해 Pico-Tag methods로 개발되었다. 이 방법은 2급 아미노산도 검출이 가능하며 유도체화한 시료가 안전성이 크다는 장점이 있으

나 UV로 검출해야 되며 완전 자동화가 불가능하다는 단점을 가지고 있다. 이에 저자는 한국산 담자균류의 생리 활성 성분의 탐색 작업의 일환으로서 여러 버섯을 대상으로 그 유리 아미노산을 분석할 목적으로 구름버섯 (*Coriolus versicolor*) 과 느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus*)을 열수 추출한 후 그 농축액을 PITC 유도체화 시약으로 유도체화 하여 RP-HPLC로 분리시킨 후 UV detector로 검출하였다.

재료 및 방법

1. 검체의 조제

구름버섯 각 5g, 느타리버섯 각 1g 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 off 되는 centricon-10 (Amicon, INC, USA)를 사용하여 5000 rpm에서 1시간 동안 원심분리시켜 고분자 물질을 여과해낸 후 그 여과액인 분자량 10,000 이하의 물질만 분리시켰다.

2. 유도체화 (Derivatization)

추출액 각 20 μ l를 1시간 동안 농축 증발시켜 잔여 HCl를 제거한 후 10 μ l redrying solution을 넣어 녹였다. 다시 1시간 동안 농축 증발시킨 후 20 μ l coupling solution을 가해 3-4분 vortex시키고 실온에서 20분 동안 방치하였다. 과잉 PITC 시약을 제거하기 위해 1시간 이상 농축 증발시킨 후 buffer인 eluent A에 용해시켰다.

3. 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 μ l, water 200 μ l, triethylamine 100 μ l

(4) Coupling solution : ethanol 140 μ l, water 20 μ l, triethylamine 20 μ l, phenylisothiocyanate 20 μ l

2) 기기

(1) 기기

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

(2) 컬럼

Water Pico Tag column (3.9 x 300 mm, 4 μ m, P/N 10950)

(3) 검출기

254 nm에서 측정

결과 및 고찰

담자균류 중에서 구름버섯과 느타리버섯을 PITC 방법에 의해 분석하였을 때 버섯의 종류에 따라 분석된 유리 아미노산의 종류와 수와 농도가 각각 다르게 나타났다.

표준 아미노산을 PITC 방법에 의해 분석할 때 23종의 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 (Figure 1, Table I). 구름버섯에서는 7 종류의 아미노산이 검출되었는데 그 종류는 aspartic acid, glutamic acid, alanine, proline, tyrosine, valine, leucine이었다 (Figure 2, Table II). 느타리버섯에서는 16 종류의 아미노산이

검출되었는데 그 종류는 aspartic acid, glutamic acid, phosphoethanolamine, serine, glycine, L- α -amino-n-butyric acid, threonine, alanine, proline, tyrosine, valine, methionine, cystathionine, isoleucine, leucine, phenylalanine이었다 (Figure 3, Table III). 이 연구 결과를 토대로 하여 Basidiomycetes의 chemotaxonomy나 버섯의 감별, 다른 버섯과의 혼합여부 등 여러 가지에 응용될 수 있으리라 사료된다.

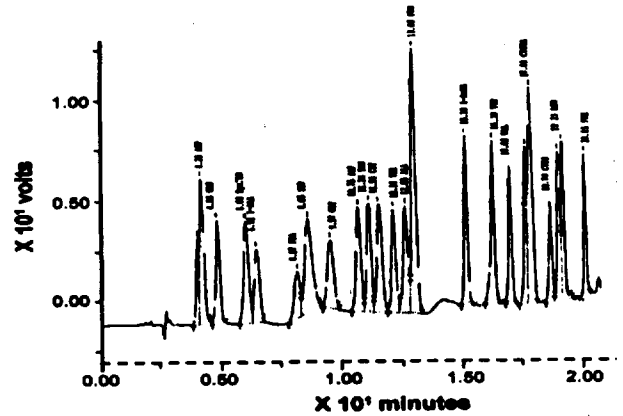


Figure 1. UV spectrum of phenylthiocarbamyl-standard amino acid

Table I. Concentration of PTC standard amino acid

Peak #	Retention time (min)	Area %	Componentname
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

Table II. Concentration of *Coriolus versicolor*

Peak #	Retention time (min)	Area %	Component name
1	2.1	87.3	
2	4.2	1.5	ASP
3	4.9	0.1	GLU
4	12.8	1.9	ALA
5	13.2	0.6	PRO
6	16.3	0.1	TYR
7	17.0	0.1	VAL
8	19.3	8.1	LEU

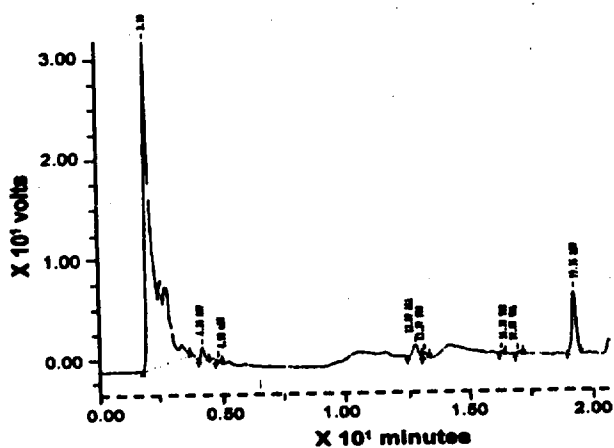


Figure 2. UV spectrum of *Coriolus versicolor*.

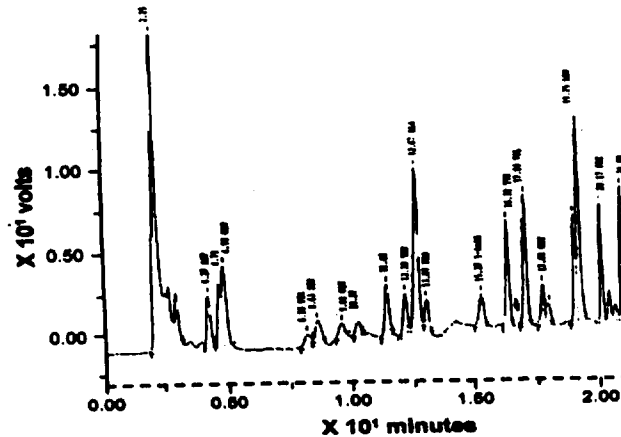


Figure 3. UV spectrum of *Pleurotus ostreatus*.

Table III. Concentration of *Pleurotus ostreatus*

Peak #	Retention time (min)	Area %	Component name
1	2.2	27.1	
2	4.2	2.2	ASP
3	4.7	2.4	
4	4.9	4.6	GLU
5	8.1	0.9	PEA
6	8.6	2.1	SER
7	9.6	1.1	GLY
8	10.2	0.8	
9	11.4	2.9	
10	12.2	2.5	THR
11	12.6	10.7	ALA
12	13.0	2.0	PRO
13	15.2	1.9	1-AnBA
14	16.3	4.6	TYR
15	17.0	5.8	VAL
16	17.6	2.0	MET
17	17.9	1.0	CYSTA
18	19.0	4.2	ILE
19	19.2	8.2	LEU
20	20.1	3.8	PHE
21	21.0	4.2	
22	21.2	4.2	

참고문헌

1. Lee, J. Y., Y. W. Lee and J. H. Lim. 1959. Illustration of fungi of Korea. Baemunkak, Seoul, Korea, 101-114
2. Kim, B. K., J. H. Lim, I. H. Yoon, O. J. Park and H. S. Kim. 1971. Studies on the constituents of the higher fungi of Korea. *Korean J. Pharmacogn.* 2, 31-34
3. Kim, B. K., Y. S. Lee, E. C. Choi, M. J. Shim. And Y. N. Lee. 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
4. Scott, R. M. 1969. Clinical anaysis by thin layer chromatography techniques. Ann Arbor-Humphrey Science Publishers, Ann Arbor.
5. Harbone, J. B. 1984. Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis, 2nd ed. Champman & Hall, London
6. 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
7. Heinrikson, R. L and S. C. Meredith. 1984. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* 136, 65-74