

LC-MS/MS를 이용한 표고 균주별 에리타데닌 함량 분석

박영애¹ · 이경태² · 박원철^{1*} · 김명길¹ · 가강현¹ · 구창덕³

¹국립산림과학원 미생물자원연구과, ²바이오에너지연구과, ³충북대학교 산림과학부

Eritadenin Contents Analysis in Various Strains of *Lentinula edodes* using LC-MS/MS

Young-Ae Park¹, Kyoung-Tae Lee², Won-Chull Bak^{1*}, Myung-Kil Kim¹, Kang-Hyeon Ka¹
and Chung-Duck Koo³

¹Division of Forest Microbiology

²Division of Bioenergy, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

³Department of Forest Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received 4, November 2011., 1st Revised 8, November 2011., Accepted 20, November 2011)

ABSTRACT: Eritadenine, a potent compound of hypocholesterolemic activity, was investigated in relation to its content in domestic cultivars and wild types of shiitake (*Lentinula edodes*). Eighteen strains of shiitake were tested for the quantification of eritadenine by LC-MS/MS analysis. Among the strains, wild type-40 was highest as the content was 3.912 mg/g. Also, Soohyangko was 3.352 mg/g, Sanlim No. 9 3.008 mg/g, Chunbaegko 2.832 mg/g, Gaeulhyang and KFRI 675 both 2.792 mg/g as high-content strains. Soohyangko and Chunbaegko are applied strains for registration in 2010. Soohyangko is high-temperature type with concentrated fruiting, and 90% of production occurs in the first year, thus, recovery of cost is very fast. Chunbaegko is mid-temperature type with concentrated flushing, and produces "hwago", the best quality, in spring. Wild type-40 is excellent in productivity and is prepared for registration. Wild type-40 could be used as parent strain to make new strain with high eritadenine content.

KEYWORDS : Eritadenine, Functionality, Hypocholesterolemic activity, *Lentinula edodes*

버섯은 고대부터 전세계에서 다양한 종류가 소비되고 있으며 단백질 보충식품은 되지 못하였지만 많은 나라에서 비타민과 미네랄을 섭취할 수 있는 좋은 영양원으로 사용되었을 뿐 아니라 특별한 향을 이용하여 왔다. 그 후 산업화로 인하여 주로 식품으로 이용되던 버섯에서 식품뿐 아니라 약용버섯으로 관심이 확대되고 다양한 효능 및 그 기능성 물질을 찾게 되었다.

표고는 우리나라에서 가장 많이 소비하는 버섯종 하나이며, 아시아 지역에서 식용 및 약용버섯으로 취급되어 왔고, 최근 표고에 함유되어 있는 많은 성분들은 의약품의 원료로 이용되거나 건강 보조제로 개발되고 있다(박 등, 2008; Chang *et al.*, 1993). 표고에 함유된 렌티난 성분은 위암 주사제, 에리타데닌 성분은 혈장 콜레스테롤을 저하시켜 혈소판 응집작용을 억제, 렌테민 성분은 항바이러스 작용, 다당체는 인터페론의 활성을 유도하여 항암작용, 비타민 D는 구루병을 예방하는 등 매우 다양한 기능을 갖고 있는 것이 밝혀지고 있다(大橋, 1999; 河岸, 2006; Lee *et al.*, 2009).

특히, 표고버섯의 기능성 중 콜레스테롤 저하작용에 대해서는 1966년 Kaneda 등에 의해 소개되었으나 활성물질에

대한 규명은 이루어지지 못하였다. 그 후 1969년에 Chibata 등에 의해 비형광성 물질인 에리타데닌(eritadenine : 2(R),3(R)-dihydroxy-4-(9-adenyl)-butyric acid)으로 규명되었다(Chibata *et al.*; Kamiya *et al.*; Fig. 1).

에리타데닌은 adenosine 유사체로 알려진 3-deazaadenosine과 마찬가지로 S-adenosyl-homocysteine hydrolase (SAH) 조절인자로서 간 조직에서 인지질 대사의 변화에 의해 혈장 콜레스테롤의 제거를 촉진하여 콜레스테롤 저하작용을 하는 것으로 알려져 있으며(Sugiyama, *et al.*, 1995) 표고의 갓과 대에 각각 0.5-0.7 mg/g과 0.3-0.4 mg/g (Saito *et al.*, 1975), 균사체에 0.737 mg/g (Lelik *et al.*, 1997)이 함유되어 있으나, 추출방법과 균주에 따라 함량 차이가 크게 나타나고 있다(Enman *et al.*, 2007). 또한 콜레스테롤 조절물질로 알려진 에리타데닌의 유사체 분리와 합성에 다양한 연구가 1970년대부터 최근까지 활발히 진행되고 있으며 다양한 유사체에 대한 활성검증이 진행되었다.

에리타데닌의 분석은 GC-MS (gas-chromatography mass spectrometry), HPLC (High performance liquid chromatography)에 의해 주로 분석되었으나(Saito *et al.*, 1975; Lelik *et al.*, 1997), 수용성 물질의 분석에 적합한 HPLC의 발달로 LC-MS로 분석이 시도되고 있다(Enman *et al.*, 2007). 나

*Corresponding author <E-mail : wcbak@forest.go.kr>

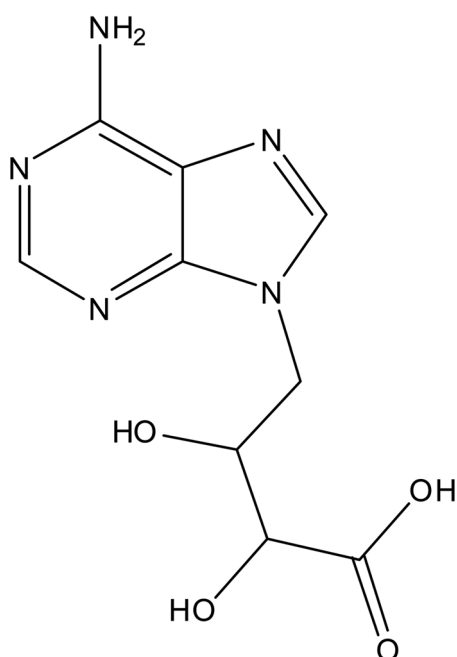


Fig. 1. Chemical structure of eritadenine.

아가 최근 electro-spray ionization(ESI) 기법을 도용한 LC-MS/MS를 통하여 보다 정확성이 증대되었다.

본 연구는 표고버섯의 콜레스테롤 저하 기능에 관여하는 에리타데닌에 대하여 LC-MS/MS를 이용한 분석조건을 제시하고, 국내 재배품종에 따라 함량 차이가 얼마나 있는가를 파악하여 앞으로 기능성이 강화된 신품종 개발에서 에리타데닌 함량이 높은 품종을 개발하고자 할 때 모균주를 선발하는 기초자료를 얻고자 수행하였다.

시료준비 및 추출

표고 시료는 국립산림과학원 내 재배장의 원목에서 수확한 산림1호 등 17품종의 표고를 건조하여 사용하였다. 각 품종 당 25 g을 분쇄기를 이용하여 분쇄한 다음 80% methyl alcohol을 이용하여 80°C에서 2회 환류 추출하고 Whatman No. 5 filter paper로 여과하였다. 추출물을 감압농축기를 이용하여 농축한 후 100 ml의 증류수에 용해시킨 다음 dichloromethane을 이용하여 2회 용매 분획하여 제거하고 수층을 농축하였다. 농축액을 50 ml 물에 용해시키고 100% ethanol 500 ml를 첨가하여 4°C에서 24시간 정치한 후 침전물을 Whatman No. 5 filter paper로 여과하여 여과액을 농축하였다. 여과 후 농축한 시료를 20 ml의 ethanol에 녹여 분석 시료로 사용하였다.

분석

표고 추출물은 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였고 분석기기는 Agilent 1100 series HPLC로 Binary Pump G1312A, De-gasser G1379A, Auto-sampler G1313A, Column oven G1316A를 사용하였고 분석에 사용한 Column은 Waters

Symmetry C18 (2.1 × 150 mm 3.5 μm)을 사용하였다. 용매 유속은 0.2 ml/min으로 하였으며 시료주입은 5 μl이다. 그리고 mass는 AB사의 API-2000을 장착하여 사용하였으며 Ion source로 Electro Spray Ion(ESI)를 사용하였고 gass로는 N₂를 이용하였다. 분석에 사용한 Software는 AB사의 Analyst TM 1.4.1를 이용하였고 에리타데닌 표준물질은 Santa Cruz Biotechnology (sc-207632)로부터 구입하여 농도를 0.1 mg/ml로 물에 용해하여 사용하였다.

HPLC 분석은 2% acetonitrile(ACN)에서 retention time(RT) 6.2분에 확인되었으나 peak intensity를 높이기 위해 소량의 강산성을 가진 TFA를 이용하였다. 그 결과 최적 분석조건은 solvent A : 0.05% TFA를 함유한 물과 solvent B : 0.05% TFA를 함유한 acetonitrile을 이용하여 최초 98 : 2에서 RT 4.6분에 확인되었다.

LC-MS 분석은 positive ion mode를 이용하였으며 분자량 확인을 위하여 mass range를 200에서 500까지 Q1MS scan mode를 통해 1초당 스펙트럼을 수집하여 분석 확인한 결과 분자량을 254 [M+H]⁺로 eritadenine을 확인하였다(Fig. 1). LC-MS/MS 분석을 위한 Q3 fragment ion 분석을 실시하였으며 분자량 254(base+)로부터 208, 178, 149, 136, 119의 product ion을 확인하였고(Fig. 2), 이중 2개의 최대 product ion과 MS/MS pairing 분석을 확인하여 254-178과 254-136을 선별하였다. MS/MS 분석을 위한 gas 조건 최적화를 위한

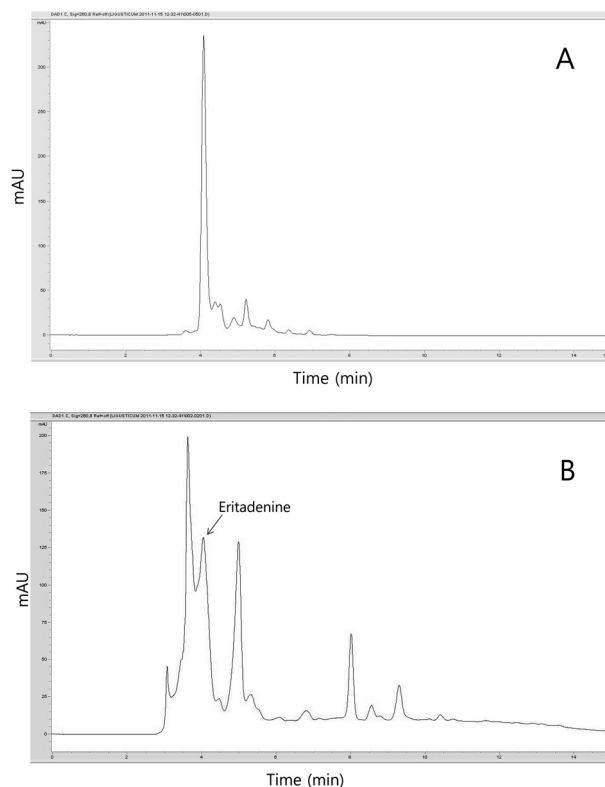


Fig. 2. HPLC chromatograms at 260 nm of extract from shiitake mushroom A. The eritadenine standard, B. The methanol extract from shiitake mushroom.

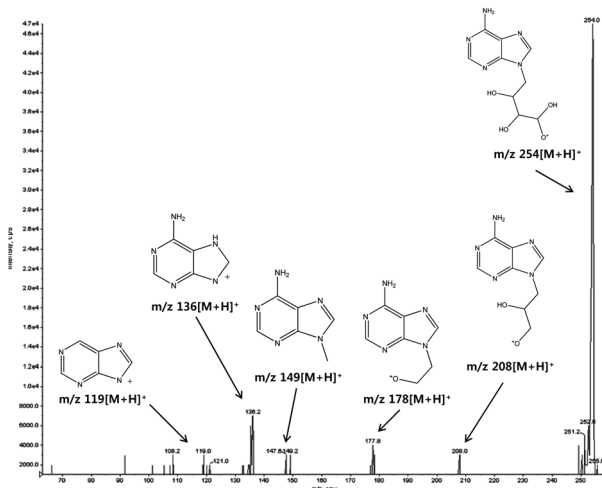


Fig. 3. Chromatogram of eritadenine ion fragments by Q3MS mode.

FIA optimize를 시행하였으며 Ion source gas (gas 1), Heater gas (gas 2), Curtain gas (CUR), Collision gas (CAD), Ion spray voltage (IS), Collision energy (CE), Collision cell exit potential (CXP), Declustering potential (DP), Focusing potential (FP), Entrance potential (EP), Collision cell entrance potential (CEP)를 10 차이별로 조건 확인하여 최종적으로 최종 gas 조건을 확립하였다. 이상의 최종 분석조건을 이용하여 총 18종의 표고균주 분석하였으며 에리타데닌의 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다.

에리타데닌 함량은 Table 1에서 표고균주 야생형 40에서 가장 높은 3.912 mg/g, 수향고에서 3.352 mg/g, 산림 9호에서 3.008 mg/g, 천백고에서 2.832 mg/g, 가을향과 야생형 675에서 2.792 mg/g 순으로 분석되었다. 신품종 출원한 표고 품종 특성에서 2009년 “가을향”은 중온성 다수확품종이고 2010년 “수향고”는 고온성, 조기 집중 발생형(1년차에 90% 생산), 2010년 “천백고”는 중온성 집중 발생형, 봄철에 화고 생산 가능 품종이다.

저온성 품종의 에리타데닌 함량은 낮은 반면, 중온성 품종은 상대적으로 고르게 높은 경향성을 나타냈다. 그리고 고온성 품종은 품종별 차이가 심했다. 에리타데닌 함량이 높은 기능성 표고를 육종할 때, 가장 많은 에리타데닌 함량을 갖는 야생형-40 균주를 모균주로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

표고 자실체의 부위별 에리타데닌의 함량 차이를 보기위해 산림 10호에서 갓과 대를 구분하여 에리타데닌 함량을 분석하였는데, 갓과 대에서 총 2.808 mg/g으로 분석되었으며 갓(1.944 mg/g)보다 대(2.304 mg/g) 부위에서 다소 높게 분석되었다(Table 2). 이 결과는 에리타데닌 함량이 표고의 갓 부위가 대보다 높다는 Saito 등(1975)의 보고와는 상반된 결과이다. 또한 Enman 등(2007)이 표고버섯에서 에리타데닌 함량이 3.17-6.33 mg/g 포함된 것과 유사한 결과를 얻었다. 갓과 대에서 에리타데닌 함량의 차이는 분석 점수가 적어 비교하기 어려웠지만, 버섯에서 에리타데닌 차이는 60-70년

Table 1. Eritadenine content measured in shiitake mushrooms

Cultivar name	Temperature type	Eritadenine content (mg/g)
Sanlim No.1	Low	1.800
Sanlim No.2	High	1.656
Sanlim No.3	Low	2.088
Sanlim No.4	High	1.960
Sanlim No.5	High	1.696
Sanlim No.6	High	2.680
Sanlim No.7	High	1.824
Sanlim No.8	Medium	2.784
Sanlim No.9	High	3.008
Sanlim No.10	Medium	2.808
Chunbaegko	Medium	2.832
Gaeulhyang	Medium	2.792
Soohyangko	High	3.352
Wild type-40	Medium	3.912
Wild type-55	-	2.840
Wild type-354	High	1.728
Wild type-674	-	2.056
Wild type-675	-	2.792

Table 2. Eritadenine content measured in shiitake mushroom

Fruit body	Pilus	Stipe
2.808 mg/g	1.944 mg/g	2.304 mg/g

대 분석법에 비해 현재의 분석법이 개량되고, 더 정밀한 기기를 사용하기에 나타난 결과로 생각된다.

적요

본 연구를 통하여 표고버섯의 효능 중 콜레스테롤 조절 물질로 알려진 에리타데닌의 분석은 효과적이고 정밀한 분리 분석 결과를 나타내었는데 MS/MS pairing 분석으로 m/z 254-178와 m/z 254-136 두개의 ion pairing을 이용하여 정확한 분석이 가능하였다. 에리타데닌은 수용성 비형광성 물질로 기존의 GC나 GC-MS를 이용한 분석 방법의 경우 수용성을 휘발성 물질로 전환하기 위해 BATFA와 같은 silylation을 하여야하는 것에 비해 위험성과 편리성에서 뛰어나다. 총 18개 표고균주의 건조시료를 LC-MS/MS를 이용하여 에리타데닌의 함량을 조사한 결과, 표고균주 야생형 40에서 가장 높은 3.912 mg/g, 수향고에서 3.352 mg/g, 산림 9호에서 3.008 mg/g, 천백고에서 2.832 mg/g 가을향과 KFRI 675에서 2.792 mg/g 순으로 분석되었다. 수향고와 천백고는 2010년에 출원된 품종으로써 수향고는 고온성의 집중발생형이며 4년의 재배기간 중 1년차에 수확량이 90%이상이 집중되어 있어 초기 자본 회수가 빠르다. 또한 천백고는 중온성 집중발생형

이며 봄철에 화고를 생산할 수 있는 우수한 품종이다. 야생형 40 균주는 에리타데닌 함량이 높은 표고 신품종을 개발할 때 모균주로 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 국립산림과학원 일반연구과제 “표고 신품종 개발 및 기능성 표고 재배기술 연구”에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 박원철, 윤갑희, 김선철, 홍기성. 2008. 표고의 안정생산을 위한 표고재배 신기술. 국립산림과학원 연구신서 제27호.
- 大橋 康宏. 1999. シイタケ菌糸體培養抽出物LEMの多彩な生理活性. pp. 92-97.きのこ健康讀本2.
- 河岸 洋和. 2006.きのこの機能性的な果. pp. 216-221. 2006年度版きのこ年鑑.
- Chang, S. T., Buswell, J. A. and Miles, P. G. 1993. Genetics and breeding of edible mushrooms. Gorden and Breach Science Publishers, Pennsylvania, U.S.A. pp. 324.
- Chibata, I., Okumura, K., Takeyama, S. and Kotera, K. 1969. Lentinacin: a new hypocholesterolemic substance in *Lentinus edodes*. *Experientia* 25: 1237-1238.
- Enman, J., Rova, U. and Berglund, K. A. 2007. Quantification of the bioactive compound eritadenine in selected strains of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *J. Agricultural and Food Chemistry* 55:1177-1180.
- Kamiya, T., Saito, Y., Hashimoto, M. and Seki, H. 1969. Structure and synthesis of lentysine, a new hypocholesterolemic substance. *Tetrahedron Letters* 10:4729-4732.
- Lee, G. S., Byun, H. S., Yoon, K. H., Lee, J. S., Choi, K. C. and Jeung, E. B. 2009. Dietary calcium and vitamin D₂ supplementation with enhanced *Lentinula edodes* improves osteoporosis-like symptoms and induces duodenal and renal active calcium transport gene expression in mice. *Eur. J. Nutr.* 48: 75-83.
- Lelik, L., Vitanyi, G., Lefler, J., Hegoczky, J., Nagy-Gasztonyi, M. and Vereczkey, G. 1997. Production of the mycelium of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom and investigation of its bioactive compounds. *Acta Alimentaria* 26:271-277.
- Saito, M., Yasumoto, T. and Kaneda, T. 1975. Quantitative analyses of eritadenine in shiitake mushroom and other edible fungi. *J. Jap. Soc. Food Nutr.* 28:503-513.
- Sugiyama, K., Akachi, T. and Yamakawa, A. 1995. Eritadenine-induced alteration of hepatic phospholipid-metabolism in relation to its hypocholesterolemic action in rats. *J. Nutr. Biochem.* 6:80-87.