

모노아민 산화효소에 대한 식용버섯류의 저해활성 검색

황금희 · 김현구 · 한용남*

한국식품개발연구원, *서울대학교 천연물과학연구소

Screening of Inhibitory Activity of Edible Mushrooms on the Monoamine Oxidase

Keum Hee Hwang, Hyun-Ku Kim and Yong Nam Han*

Korea Food Research Institute

*Natural Product Research Institute, Seoul National University

Abstract

The monoamine oxidase (MAO, EC 1.4.3.4) plays a central role in the metabolism of many amines including the neurotransmitter monoamines. MAO is a flavoprotein found exclusively in the mitochondrial outer membrane, occurring in the MAO-A and MAO-B subtypes. MAO-A deaminates serotonin and noradrenaline much better than phenethylamine (PEA) or benzylamine (BA), and is preferentially inhibited by clorgyline, whereas MAO-B prefers PEA and BA as substrates and is preferentially inhibited by deprenyl. MAO inhibitors were among the first drugs used in the treatment of depression, and it is known to be the inhibition of MAO-A which is important for the antidepressant effect of MAO inhibitors. For the purpose of evaluating MAO inhibitory activities from natural resources, three kinds of edible mushrooms were screened by tracing the inhibitory activities against rat brain mitochondrial MAO-A, utilizing serotonin as a substrate and rat liver mitochondrial MAO-B utilizing benzylamine as a substrate. Among the tested mushrooms, *Ganoderma lucidum* and *Lentinus edodes* showed the weak inhibitory activities against MAO-B.

Key words: monoamine oxidase-A, monoamine oxidase-B, edible mushrooms, inhibitory activity, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*

서 론

모노아민 산화효소(monoamine oxidase: MAO, EC 1.4.3.4)는 amine 화합물의 대사를 관장하는 효소로서 그 반응계는 O_2 를 이용하여 amine 기질을 산화시켜 aldehyde product로 전환시키고 부산물로서 NH_3 와 H_2O_2 를 생성하게 된다. 이 효소는 동물조직 중에 널리 분포하여 mitochondria의 외막에 존재하고 prosthetic group으로 flavin을 함유하고 있다. MAO는 기질 선호도에 따라 크게 2가지 형으로 대별된다. 즉, norepinephrine, epinephrine, serotonin 등 생체내 amine류를 주로 대사시키는 MAO-A와 benzylamine, phenethylamine 등 외부로부터 들어오는 생체의 amine류를 주로 대사시키는 MAO-B로 나뉘어지고 있다. 이 효소를 저해하는 MAO-A 저해제는 오래전부터 우울증^(1,2),

parkinsonism^(3,4), 정신분열증⁽⁵⁾, 고혈압⁽⁶⁾ 등의 치료목적으로 사용되어져 왔으나 이들 MAO 저해제를 투여할 경우 장기간에 걸쳐 지속적인 MAO 저해작용이 나타나고 그로 말미암아 동요현상, 환각현상, 과민반응현상 등 심각한 부작용이 야기되며, 특히 투약기간 중 tyramine을 함유한 cheese 등의 음식을 섭취하게 되면 심각한 고혈압의 유발위험 등이 발생할 수 있다. 따라서 이들 기존 MAO 저해제들의 이러한 단점들을 보완할 수 있는 새로운 저해제의 개발이 절실히 요구되고 있으며 최근들어 이러한 새로운 약물개발에 관한 연구가 세계적으로 활발히 전개되고 있다. 이러한 추세와 발맞추어 약물의 개발에 못지않은 기능성 식품에 대한 기대 역시 급증하고 있는 실정이며 잘못된 정보로 인한 식품의 오용과 남용으로 자칫 건강을 더욱 해칠 위험에까지 이르고 있다. 따라서 예로부터 식품으로서 널리 애용되어 오고 있는 식품을 대상으로 생리활성을 검색함으로써 기능성 식품에 대한 올바른 정보를 제공하고 기능성 식품으로 개발하는 일이 필

Corresponding author: Keum Hee Hwang, Korea Food Research Institute, San 46-1, Bakhyun-dong, Bundang-ku, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea

요하다. 따라서 본 연구에서는 식용 버섯류들의 MAO 저해활성을 검색할 목적으로 몇 가지 유기용매를 이용하여 추출분획을 조제하고 이들의 MAO에 대한 저해활성을 검색하였다.

재료 및 방법

버섯류의 추출 및 용매분획

서울 가락시장과 산지 등에서 버섯류를 구입하였다. 생시료는 55°C oven에서 12시간 열풍건조하여 사용하였고 건조시료는 그대로 mixer로 마쇄하여 고운 입자로 한 후 50 g을 취하여 100% 메탄올을 1:10 (w/v)의 비로 가하여 100°C 수욕상에서 환류냉각하면서 3시간 동안 가열 추출하였다. 추출된 시료를 실온으로 냉각한 후 깔때기에 탈지면을 깔고 여과하면서 그 박을 메탄올로 세척하여 여액이 각각 원래 가한 양과 같도록 하고 그 여액을 44°C 수욕상에서 환류냉각하면서 감압 농축하였다. 농축된 메탄올 추출액을 소량의 메탄올이 남아있는 상태로 물에 현탁시킨 후 동량의 클로로포름을 소량씩 가하고 세계 흔들어 섞은 후 방치하여 두층으로 나누어 클로로포름 가용분획을 얻고 이를 45°C 수욕상에서 감압 농축하여 클로로포름 분획을 조제하였다 클로로포름에 불용성인 분획에 다시 소량의 메탄올을 가하고 여기에 5배량의 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 가용분획과 물층으로 나누어 에틸아세테이트 가용분획을 얻었으며 이를 45°C 수욕상에서 감압 농축하여 에틸아세테이트 분획을 조제하였다. 물층에 소량씩 남아있는 클로로포름과 에틸아세테이트를 농축하여 제거하고 메탄올에 녹여 다시 이를 45°C 수욕상에서 감압 농축하여 수용성 분획을 조제하였다.

버섯류의 monoamine oxidase (MAO)에 대한 저해활성

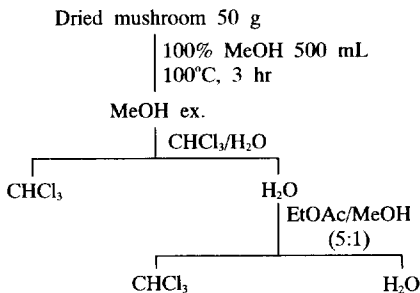


Fig. 1. Preparation of crude extracts from mushrooms.

MAO 저해작용 측정

효소원의 조제: Sprague-Dawley rat (흰쥐) 수컷의 뇌 mitochondria 분획을 상법에 따라 분리하여 효소원으로 사용하였다. 즉, 체중 150-200 g rat를 두부 강타하여 기절시키고 경동맥을 잘라 실험 시킨 후 즉시 두개골을 절개하여 뇌를 적출하였다. 이를 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)으로 세척하고 습중량 1 g 당 9 mL의 차가운 0.25 M sucrose 용액을 가하여 Waring blender로 1 분간 균질화한 후 4°C에서 18,000 g로 20분간 원심분리하였다. 상정액을 버리고 pellet를 PBS 5 mL에 현탁시켜 -15°C 냉장고에 동결보관하고 사용시 실온에서 녹여 효소원으로 사용하였다(Fig. 2).

효소 저해작용 측정: Fig. 2에서 조제한 효소원 0.5 mL와 검액 1.0 mL를 시험관에 넣고 37.5°C 항온조에서 15 분간 incubation한 후 기질용액으로 1.0 mM serotonin 용액 0.5 mL를 가하고 90분간 incubation 시켰다. 95°C 수욕상에 3분간 담그어 반응을 중단시킨 후 즉시 700×g로 원심분리하고 상정액 1.6 mL를 취하여 미리 준비한 Amberlite CG-50 (H⁺ form) 칼럼 (0.6×4 cm)에 부어 넣었다. 증류수로 수지를 충분히 (40 mL 이상) 세척한 후 4 N 초산용액 3 mL를 수지에 부어 넣고 이때 용출액을 시험관에 받아 277 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 3). 검액 대신 동량의 증류수를 넣은 대조군과 반응 개시점 대신 반응 종말점에서 기질용액을 넣은 검액보정군을 함께 실행하였다. 각 군은 모두 duplicate로 실행하였고 아래 수식에 따라 검액의 효소 저해율을 계산하였다⁷⁾.

효소 저해율(%)=

$$\frac{A \text{ 검액군} - A \text{ 검액 보정군} - A \text{ 대조군}}{A \text{ 공시험군} - A \text{ 대조군}} \times 100$$

검액의 50% 효소 저해농도(IC₅₀)의 산출: 검액을 단계적으로 희석하여 그 때의 효소 저해율을 계산하고

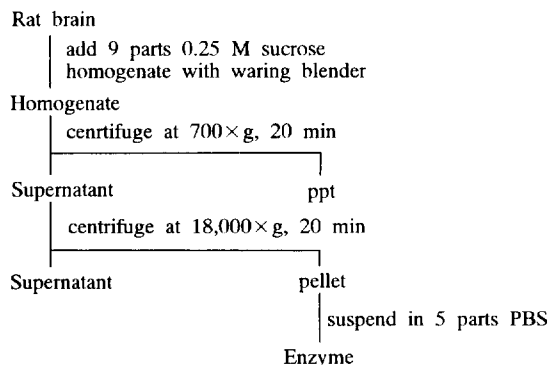


Fig. 2. Preparation of rat brain MAO-A.

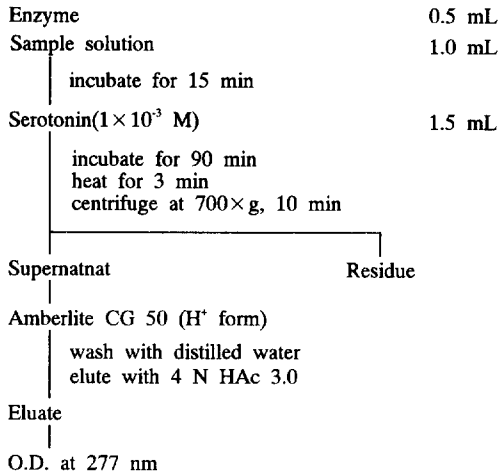


Fig. 3. Assay of MAO-A activity and inhibition.

검액의 농도에 대한 효소 저해율을 logit-log paper에 작도하여 50% 효소 저해농도를 구하였다.

MAO-B 저해작용 측정

효소원의 조제: Rat의 간 mitochondria 분획을 상법에 따라 분리하여 효소원으로 사용하였다. 즉, 체중 150-250 g의 S.D계 웅성 rat를 두부 강타하여 기질시키고 경동맥을 잘라 실험시킨 후 즉시 복개하고 간을 적출하여 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)에 씻고 습중량 1 g당 0.25 M sucrose 용액 5 mL를 가하여 Waring blender로 2분간 균질화한 후 즉시 4°C에서 700 g로 20분간 원심분리하였다. 상정액을 따라 버리고 가라앉은 pellet을 PBS 5 mL에 현탁시켜 -15°C 냉장고에 동결보관하고 사용시 실온에서 녹여 효소원으로 사용하였다(Fig. 4).

효소 저해작용 측정: McEwen 등의 방법에 준하였다⁶⁾. 즉, 효소원 0.5 mL와 검액, 1.0 mL를 시험관에 넣고 37.5°C 항온조에서 15분간 incubation 시킨 후 기질 용액으로 4.0 mM benzylamine·HCl 용액 0.5 mL를 넣고 90분간 계속 incubation하였다. 반응을 중지시키기 위하여 60% perchloric acid 0.2 mL씩을 가하고 동시에 cyclohexane 4 mL를 가하여 진탕시킨 후 $700 \times g$ 로 10분간 원심분리하여 cyclohexane 층을 취하였다. 이 cyclohexane 층을 242 nm에서 흡광도를 측정하였다. 따로 MAO-A에서와 마찬가지로 대조군, 공시험군, 검액보정군을 검액군과 함께 실행하였다(Fig. 5). 각군은 모두 duplicate로 실행하여 그 평균치를 계산하였으며 다음 수식에 따라 효소 저해율을 계산하였다.

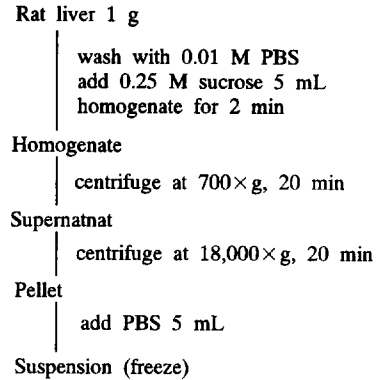


Fig. 4. Preparation of rat liver MAO-B.

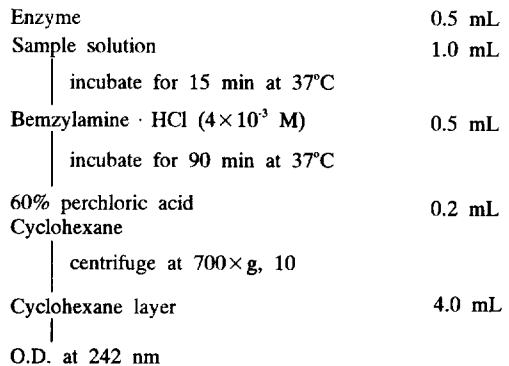


Fig. 5. Assay of MAO-B activity and inhibition.

효소 저해율(%) =

$$\frac{A \text{ 대조군} - (A \text{ 검액군} - A \text{ 검액 보정군})}{A \text{ 대조군} - A \text{ 공시험군}} \times 100$$

또 검액을 단계적으로 희석하여 그때의 효소저해율을 계산하고 MAO-A와 같은 방법으로 검액의 효소저해농도를 산출하였다.

버섯류의 분획별 MAO 저해활성 검색

검액의 조제: 시판 버섯류의 생시료는 55°C oven에서 12시간 열풍건조시키고, 건조시료는 그대로 mixer로 마쇄하여 고운입자로 한 후 50 g에 100% 메탄올을 1:10 (w/v)의 비로 가하여 100°C 수욕상에서 환류냉각하면서 3시간 동안 가열 추출하고 실온으로 냉각한 후 갈때기에 탈지면을 깔고 여과하면서 그 박을 메탄올로 세척하여 여액이 각각 원래 가한 메탄올의 양과 같도록 한 후 44°C 수욕상에서 감압농축하였다. 여기에 100 mL 증류수를 가하여 현탁시키고 동량의 클로로포름을 가하여 클로로포름 가용분획을 얻고 물층에는 다시 메탄올과 에틸아세테이트를 각각 1:5의 비로 가

하여 에틸아세테이트 가용분획으로 나누었다. 클로로포름 가용분획 및 에틸아세테이트 가용분획, 남은 물층을 농축하여 각각 1 mg을 취하여 증류수로 녹여 1 ml로 한 후 현탁시켜 검액으로 사용하였다(Fig. 1).

MAO-A 저해작용 측정: Fig. 1에서 조제한 각 버섯류의 검액을 사용하여 Fig. 3의 방법에 따라 측정하였으며 이 때 공시험군 및 대조군은 검액대신 증류수를 사용하였다.

MAO-B 저해작용 측정: Fig. 1에서 조제한 각 버섯류의 검액을 사용하여 Fig. 5의 방법에 따라 측정하였으며 이 때 공시험군 및 대조군은 검액대신 증류수를 사용하였다.

결과 및 고찰

버섯류의 추출

버섯류 50 g씩을 종류에 따라 취하여 100°C 수욕상에서 환류냉각하면서 3시간 동안 가열 추출하였다. 추출된 시료를 실온으로 냉각한 후 깔때기에 탈지면을 깔고 여과하면서 그 박을 메탄올로 세척하여 여액이 각각 원래 가한 양과 같도록 하고 그 여액을 44°C 수욕상에서 환류냉각 하면서 감압농축하였다. 이때 얻은 농축액은 양송이 12.48 g, 영지 2.37 g, 표고 11.26 g으로 각각 총 건조중량의 25.0, 1.9, 22.5%이었으며 이 농축액에 클로로포름과 에틸아세테이트를 가하여 분획하여 얻은 각 분획물에 대한 용매분획별 수율을 Table 1에 나타내었다. 메탄올 농축액의 양은 양송이, 표고, 영지의 순으로 많이 추출되었으며 총건조중량에 대한 수율은 양송이, 표고, 영지의 순으로 나타났다.

버섯류의 MAO-A에 대한 저해활성

한방 및 민간에서 각종 성인병의 치료목적으로 이

용하거나 일반 식생활에서 널리 이용되고 있는 식용버섯류 3을 대상으로 serotonin 등의 amine을 산화하여 aldehyde product 및 NH₃, H₂O₂를 생성하는 체내 amine류의 대사에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 MAO-A에 대한 저해활성을 시험관내에서 측정하였으며 그 결과를 Table 2에 요약하였다. 이들 버섯류의 MAO-A에 대한 저해활성을 편의상 80% 이상의 강력한 저해활성을 나타낸 경우 +++로, 65-79%의 중간 정도 저해활성을 나타낸 경우 ++로, 50-64%의 약한 저해활성은 +로, 50% 미만 저해활성을 나타낸 경우 -로 표시하였다. 검색된 3종 버섯류의 유기용매 추출물들은 영지버섯 bud의 CHCl₃ 층을 제외하고는 모두 MAO-A에 대한 저해활성을 나타내지 않았다. 영지버섯의 경우, CHCl₃ 층, EtOAc 층, H₂O 층 모두에서 전혀 MAO-A에 대한 저해활성이 나타나지 않았으나 영지 bud의 경우 CHCl₃ 층에서 비교적 강력한 MAO-A 저해활성을 나타내어 영지 bud의 항암활성이 영지의 항암활성과 비교하여 더욱 강력하다는 기존의 보고⁽⁹⁾와 관련하여 아주 흥미로운 결과로 영지의 성분연구에 아주 중요한 단서를 제공해줄 것으로 생각된다.

버섯류의 MAO-B에 대한 저해활성

한방 및 민간에서 각종 성인병의 치료목적으로 이용하거나 일반 식생활에서 널리 이용되고 있는 식용버섯류 3종을 대상으로 benzylamine 등의 체외로부터 섭취된 amine을 산화하여 aldehyde product 및 NH₃, H₂O₂를 생성하는 체외 amine류의 대사에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 MAO-B에 대한 저해활성을 시험관내에서 측정하였으며 그 결과를 Table 3에 요약하였다. 이들 버섯류의 MAO-B에 대한 저해활성을 편의상 80% 이상의 강력한 저해활성을 나타낸 경우

Table 1. Yields¹⁾ of solvent extracts and fractionation of edible mushrooms

| Mushrooms | Dried weight (g) | MeOH, CHCl ₃ , EtOAc, H ₂ O ex (g) | | | |
|---------------------------------------|------------------|--|--------------------------|--------------|-------------------------|
| | | MeOH ex (g) | CHCl ₃ ex (g) | EtOAc ex (g) | H ₂ O ex (g) |
| <i>Agaricus bisporus</i> (양송이버섯) | 50 (100) | 12.48 (25.0) | 2.94 (5.9) | 0.21 (0.4) | 8.27 (16.5) |
| <i>Ganoderma lucidum</i> (영지버섯) | 50 (100) | 0.95 (1.9) | 0.50 (1.0) | 0.42 (0.8) | 0.31 (0.6) |
| <i>Ganoderma lucidum</i> Bud (영지 bud) | 50 (100) | - | 1.36 (2.7) | 0.25 (0.5) | 0.55 (1.1) |
| <i>Leninus edodes</i> (표고버섯) | 50 (100) | 11.26 (22.5) | 3.23 (6.5) | 1.33 (2.7) | 8.34 (16.7) |

¹⁾The ratio of extracts to dried weight of mushrooms.

Table 2. Inhibition of various solvent fractions of some kinds of edible mushrooms on monoamine oxidase-A

| Mushrooms | MAO-A Inhibition (%) ¹⁾ | | |
|----------------------------------|------------------------------------|----------|------------------|
| | CHCl ₃ | EtOAc | H ₂ O |
| <i>Agaricus bisporus</i> (양송이버섯) | 1.6 (-) | 11.3 (-) | 4.6 (-) |
| <i>Ganoderma lucidum</i> (영지버섯) | 0.8 (-) | 3.0 (-) | 29.7 (-) |
| <i>Ganoderma lucidum</i> Bud | 79.1 (++) | 20.1 (-) | 1.7 (-) |
| <i>Leninus edodes</i> (표고버섯) | 9.4 (-) | 37.8 (-) | 21.0 (-) |

¹⁾Each fraction (10 mg) obtained from 50 g of mushrooms was taken and diluted with distilled water to make 10 ml of test solution. One ml of it was taken and assayed for examining MAO-A inhibitory activity as described in the experimental method.

+++ : >80%, ++ : 65-79%, + : 50-64%, - : <50%.

Table 3. Inhibition of various solvent fractions of some kinds of edible mushrooms on monoamine oxidase-B

| Mushrooms | MAO-B Inhibition (%) ¹⁾ | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|----------|------------------|
| | CHCl ₃ | EtOAc | H ₂ O |
| <i>Agaricus bisporus</i> (양송이버섯) | 14.3 (-) | 41.3 (-) | 3.2 (-) |
| <i>Ganoderma lucidum</i> (영지버섯) | 48.6 (-) | 48.1 (-) | 21.4 (-) |
| <i>Ganoderma lucidum</i> Bud | 0.6 (-) | 51.3 (+) | 10.8 (-) |
| <i>Lentinus edodes</i> (표고버섯) | 25.3 (-) | 55.9 (+) | 3.1 (-) |

¹⁾Each fraction (10 mg) obtained from 50 g of mushrooms was taken and diluted with distilled water to make 10 ml of test solution. One ml of it was taken and assayed for examining MAO-B inhibitory activity as described in the experimental method.

+++ : >80%, ++ : 65~79%, + : 50~64%, - : <50%.

+++로, 65-79%의 중간정도 저해활성을 나타낸 경우 ++로, 50-64%의 약한 저해활성은 +로, 50% 미만 저해활성을 나타낸 경우 -로 표시하였다. 검색된 3종 버섯류의 유기용매 추출물중 영지 bud, 표고버섯의 EtOAc 층에서 각각 51.3, 55.9%로 약한 정도의 저해활성이 관찰되었으며 그외의 다른 버섯류들에서는 전혀 MAO-B에 대한 저해활성이 확인되지 않았다. 또한 영지버섯의 경우 CHCl₃ 층, EtOAc 층, H₂O 층 모두에서 아주 미약하나마 MAO-B에 대한 저해활성을 나타냈으나 영지 bud의 경우 CHCl₃ 층에서 전혀 MAO-B에 대한 저해활성을 나타내지 않고 EtOAc 층에서 약한 MAO-B에 대한 저해활성이 확인되어 MAO-A와 MAO-B에 대한 영지버섯의 작용성분이 다른 성분일 것으로 추측된다.

요 약

식용버섯류들의 MAO 저해활성을 검색할 목적으로 몇가지 유기용매를 이용하여 추출분획을 조제하고 이들의 MAO에 대한 저해활성을 검색하였다. 검색된 3종 버섯류의 유기용매 추출물들은 영지버섯 bud의 CHCl₃ 층을 제외하고는 모두 MAO-A에 대한 저해활성이 나타나지 않았으나 영지 bud의 경우 CHCl₃ 층에

서 비교적 강력한 MAO-A 저해활성을 나타내어 영지 bud의 항암활성이 영지의 항암활성과 비교하여 더욱 강력하다는 기존의 보고와 관련하여 아주 흥미로운 결과로 영지의 성분연구에 아주 중요한 단서를 제공해 줄 것으로 생각된다. 또한 검색된 3종 버섯류의 유기용매 추출물들은 영지 bud, 표고버섯의 EtOAc 층에서 각각 51.3, 55.9%로 역한 정도의 저해활성이 관찰되었으며 그 외의 다른 버섯류들에서는 전혀 MAO-B에 대한 저해활성이 확인되지 않았다. 또한 영지버섯의 경우, CHCl₃ 층, EtOAc 층, H₂O 층 모두에서 아주 미약하나마 MAO-B에 대한 저해활성을 나타냈으나 영지 bud의 경우 CHCl₃ 층에서 전혀 MAO-B에 대한 저해활성을 나타내지 않고 EtOAc 층에서 약한 MAO-B에 대한 저해활성이 확인되어 MAO-A와 MAO-B에 대한 영지버섯의 작용성분이 다른 성분일 것으로 추측된다.

문 헌

1. Quitkin, F., Rifkin, A. and Klein, D.F.: Monoamine oxidase inhibitors. *Archs. Gen. Psychiat.*, **36**, 749 (1979)
2. Riederer, P., Reynold, G.P., Jellinger, K. and Seemann, D.: Tranylpromine isomers in Parkinson's disease. *Modern Problem Pharmacopsychiat*, **19**, 154 (1983)
3. Birkmayer, W., Knoll, J. Riederer, P. and Youdim, M.B. H.: (-)-Deprenyl leads to prolongation of L-dopa efficacy in Parkinson's disease. *ibid*, **19**, 170 (1983)
4. Stern, G.M., Lees, A.J. Hardie, R. and Sandler, M.: Clinical and pharmacological aspects of (-)-deprenyl treatment in Parkinson's disease. *ibid*, **19**, 215 (1983)
5. Riegal, F. and Zarifian, E.: MAO inhibitors in psychiatric therapy : effects and side effects. *ibid*, **19**, 162 (1983)
6. Blacwel, B.: Tranylcypromine. *Lancet*, **414** (1963)
7. 유시용 : 생약으로부터 단리한 모노아민산화효소 저해성분의 생화학적 연구. 서울대학교 박사학위논문 (1988)
8. McEwen, C. M., Cohen, J. D.: An amine oxidase in normal human serum. *J. Lab. Clin. Med.*, **62**, 766 (1963)
9. 정경수 : 버섯류의 생리활성 성분. 건강 및 기능성식품 국제심포지움 논문집. 한국식품과학회 (1995)

(1996년 9월 3일 접수)