KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 29, No. 2, pp. 194~197 (1997)

식용 버섯류의 도파민 베타 수산화효소에 대한 저해활성 검색

황금희 · 김현구 · 한용남*
한국식품개발연구원, *서울대학교 천연물과학연구소

Screening of Inhibitory Activity of Edible Mushrooms on Dopamine β-Hydroxylase

Keum Hee Hwang, Hyun-Ku Kim and Yong Nam Han*
Korea Food Research Institute,
**Natural Product Research Institute, Seoul National University*

Abstract

Dopamine β-hydroxylase (DBH) catalyses the enzymatic reaction of dopamine to norepinephrine. For the purpose of screening DBH inhibitory activity from edible mushrooms, *Ganoderma lucidum, Agaricus bisporus* and *Lentinus edodes* were examined by tracing inhibitory activities against bovine adrenal DBH, utilizing tyramine as a substrate. Among the three edible mushrooms tested, *Ganoderma lucidum* showed potent enzyme inhibitory activities above 100% against DBH in chloroform fraction. *Lentinus edodes* and *Agaricus bisporus* showed inhibitory activities in ethylacetate fraction on 79.7% and 64.7%, respectively. Each solvent fraction of these mushrooms were assessed in the aspects of their inhibitory activities against DBH, and their IC_{50} values were calculated. IC_{50} value of chloroform fraction of *Ganoderma lucidum* was 1.60×10^{-4} g, and those of ethylacetate fractions of *Agaricus bisporus* and *Lentinus edodes* were 5.50×10^{-4} g and 2.35×10^{-4} g, respectively.

Key words: bovine adrenal dopamine β-hydroxylase, edible mushrooms, *Ganoderma lucidum, Agaricus bisporus, Lentinus edodes*

서 론

버섯은 단백질, 당질, 무기질 및 각종 아미노산과 비타민 등을 고루 갖춘 영양식품일 뿐만 아니라 각종 효소를 함유하고 있어 소화성이 높은 식품으로 인식되고 있다. 최근에는 국민 식생활이 고급화됨에 따라 각종 서구형의 성인병이 급증하면서 생체의 조절기능에 촛점을 맞춘 이른바 기능성식품의 요구가 증가하는 추세이며 이와 함께 각종 식용버섯들의 생리활성 탐색에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 중추신경계에 대한 작용, 순환계에 대한 작용, 호흡계에 대한 작용, 간장보호 및 항균작용등의 약리작용과 만성기관지염, 기관지천식, 백혈구감소증, 관상동맥성심질환, 부정맥, 급성전염성간염의 치료에 대한 임상예가 중약대사전에 보고되어 있으며[1], 양송이(*Agaricus bisporus*)는 항균작용과 혈당강하, 비특이성 식물혈구응집소의 분리가 중약대사전에, 암의 민간약으로 유망하다는 보고가 세계유용식물사전[2]에 수록되어 있으며 최근의 연구결과로는 돌연변이 억제효과가 보고되었다. 표고(*Lentinus edodes*)는 혈청지질(cholesterol)을 낮추는 작용이 물/에탄올 가용분획에서 관찰되었으며 그 유효성분은 lentine과 eritadenine[3]이라는 보고가 중약대사전에 수록되어 있고 동의보감[4]에는 표고가 토사를 멈추게 한다고 기록되어 있으며 최근의 연구결과로는 항산화작용과 interferon inducer로서의 기능이 보고된 바 있다.

Dopamine β-hydroxylase (DBH) [3,4-dihydroxyphenylethylamine, ascorbate:O_2 oxidoreductase (β-hydroxylating), E.C. 1. 14. 17. 1]는 뇌, 말초 교감신경과 부신수질에서 norepinephrine 합성의 마지막 단계인 dopamine에서 norepinephrine으로의 전환 과정을 촉매 한다[5-8]. 이 효소의 저해물질은 고혈압 및 파킨슨병 등의 치료약물로 알려져 있으며 이러한 저해제들

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

이 내인성 norepinephrine의 양을 감소시켜 혈압강하 작용을 한다고 보고되어 있다[9,10,11]. 각종 장기의 질환에 수반되는 혈청중의 DBH 활성의 증감은 각종의 증상과 관계가 있으므로 진단상 중요시 되고 있다. 최근 국내에서도 신약개발연구의 일환으로 민간과 한방에서 상용되고있는 생약들에 대한 각종 생리활성검색에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으나 황 등[12]이 16종의 생약을 대상으로 메탄올 엑스가 bovine adrenal tyrosine hydroxylase 및 DBH 활성(*in vitro*)에 미치는 영향을 보고하였으며 저자 등[13]이 식물성 생약 31종에 대한 DBH 저해활성을 검색하여 그 중 강한 저해활성을 나타낸 상추로 부터 유효성분을 단리하여 보고한 바 있으나[14]국내에서의 DBH 저해작용에 관한 연구 보고는 미약한 편이다. 이와 같이 식용버섯이 식품으로서 뿐 아니라 각종 성인병의 조절식품으로서 가능성을 충분히 갖고 있으나 영지버섯, 양송이, 표고버섯등 식용버섯에 대한 중추신경계에 대한 작용에 관한 연구는 아직 되어있지 않은 상태이다. 본 연구에서는 이들 식용버섯류에 대한 dopamine β-hydroxylase (DBH) 저해활성을 tyramine을 기질로 하여 검색하였으며 그 결과를 버섯의 기능성 식품으로서의 개발 및 이용에 기초자료로서 제공하고자 한다.

재료 및 방법

버섯류의 Dopamine β-hydroxylase의 저해활성 검색

Creveling 등의 방법에 준하여 DBH 저해작용을 측정하였다[15].

DBH의 저해작용 측정

효소원의 조제: 소(牛) 부신 습중량 1 g당 0.25 M sucrose 용액 5 mL를 가하여 waring blender로 2분간 균질화하고 4°C에서 700 g로 10분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 4°C에서 10,000×g로 다시 20분간 원심분리하여 얻은 pellet을 0.25 M sucrose용액 2 mL에 현탁시키고 -15°C 냉장고에 동결보관하였다. 사용시 실온에서 녹여 0.25 M sucrose 용액으로 30배 희석하여 효소원으로 사용하였다.

반응 보조액의 조제: Sodium fumarate, N-ethylmaleimide, iproniazid phosphate 및 ascorbic acid를 각각 0.06, 0.06, 0.006, 0.06 M이 되게 하여 증류수에 함께 녹인 액을 반응 보조액으로 사용하였다.

DBH 저해작용 검색법: 효소원 0.3 mL와 검액 1.0 mL, 0.4% catalase 0.2 mL, 1 M 초산 완충액(pH 5.0) 0.5 mL 및 반응보조액 0.5 mL를 차례로 넣고 37°C에서 15분간 preincubation 하였다. 여기에 0.12 M tyramine HCl 0.5 mL를 가하고 90분간 incubation한 후 3 M trichloroacetic acid 0.4 mL를 가하여 효소반응을 중단시켰다. 반응 중단 후 즉시 700 g로 10분간 원심분리하고 상등액 3.0 mL를 Dowex 50W×8 (H^+ form, 200~400 mesh, Sigma) 컬럼(0.8×3 cm)에 부어넣고 증류수 30 mL로 세척하였다. 4 N NH_4OH 3 mL를 넣어 이 때 용출된 용출액을 따로 시험관에 받아 4% $NaIO_4$ 용액 0.2 mL를 가하였다. 10분 방치 후 20% $Na_2S_2O_3$ 용액 0.2 mL를 가하고 이를 330 nm에서 UV흡광도를 측정하였다. 검액 대신 동량의 증류수를 넣은 대조군과 반응개시점 대신 반응종말점에서 기질용액을 넣은 공시험군, 기질용액 대신 동량의 증류수를 넣은 검액보정군을 함께 실행하였다. 각 군은 모두 2회 반복 실행하여 계산하였으며 아래 수식에 따라 검액의 효소저해율을 계산하였다.

$$\text{효소저해율}(\%) = \frac{\text{대조군} - (\text{A검액군} - \text{A검액보정군})}{\text{대조군} - \text{공시험군}} \times 100$$

검액의 50% 효소저해농도(IC_{50})의 산출: 검액을 단계적으로 희석하여 그 때의 효소저해율을 계산하고 검액의 농도에 대한 효소저해율을 Logit-log paper에 작도하여 50% 효소저해농도를 구하였다.

버섯류의 추출 및 DBH에 대한 저해활성 검색

버섯류의 메탄올추출: 서울시 소재 경동시장의 한약건재상, 도매시장, 백화점과 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 감압농축하였다.

버섯류의 용매분획 조제: 농축된 메탄올 추출액을 소량의 메탄올이 남아있는 상태로 물에 현탁시킨 후 동량의 클로로포름을 소량씩 가하고 세게 흔들어 섞은 후 방치하여 두층으로 나누어 클로로포름 가용분획을 얻고 이를 45°C수욕상에서 감압 농축하여 클로로포름분획을 조제하였다. 클로로포름에 불용성인 분획에 다시 소량의 메탄올을 가하고 여기에 5배량의 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 가용분획과 물층으로 나누어 에틸아세테이트 가용분획을 얻었으

며 이를 45°C 수욕상에서 감압 농축하여 에틸아세테이트분획을 조제하였다. 물층에 소량씩 남아있는 클로로포름과 에틸아세테이트를 농축하여 제거하고 메탄올에 녹여 다시 이를 45°C 수욕상에서 감압 농축하여 수용성분획을 조제하였다.

분획별 DBH 저해활성 검색: 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 깔때기에 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 메탄올 과 에틸아세테이트를 각각 1:5의 비로 가하여 에틸아세테이트 가용분획으로 나누었다. 클로로포름 가용분획 및 에틸아세테이트 가용분획, 남은 물층을 농축하여 각각 1 mg을 취하여 증류수로 녹여 1 mL로 한 후 현탁시켜 검액으로 사용하였다. 조제된 검액을 대상으로 위의 방법에 따라 측정하였으며 이때 공시험군, 대조군은 검액 대신 증류수를 사용하였다.

결과 및 고찰

버섯류의 용매분획별 수율

버섯류 3 종(영지, 양송이, 표고) 각 50 g씩을 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 감압농축하여 얻은 농축액은 영지 2.367 g, 양송이 12.483 g, 표고 11.259 g으로 각각 총 건조중량의 4.7, 25.0, 22.5% 이었으며 이 농축액에 클로로포름과 에틸아세테이트를 가하여 분획하여 얻은 각 분획물에 대한 용매분획별 수율을 Table 1에 나타내었다. 영지의 클로로포름 분획은 1.243 g으로 건조중량의 2.5%이고 에틸아세테이트 분획은 1.060 g으로 2.1% 였으며 물 분획의 경우 0.77 g으로 1.5%를 나타냈다. 양송이의 경우 클로로포름 분획 2.943 g으로 건조중량의 5.9%이고 에틸아세테이트 분획은 0.210 g으로 0.4% 였으며 물 분획의 경우 8.268 g으로 16.5%로 나타났다. 표고버섯은 클로로포름 분획이 3.033 g으로 건조중량의 6.1%이고 에틸아세테이트 분획은 1.334 g으로 16.5% 였으며 물 분획의 경우 8.338 g으로 16.7%로 나타났다. 영지의 경우 클로로포름 분획이, 양송이와 표고버섯의 경우 물 분획의 수율이 가장 높았다.

Table 1. The yields of solvent extraction and fractionation for three kinds of edible mushrooms

Fractions	*Ganoderma lucidum*	*Agaricus bisporus*	*Lentinus edodes*
Dried weight (g)	50	50	50
MeOH extract (g)	2.367	12.483	11.259
$CHCl_3$ extract (g)	1.243	2.943	3.033
EtOAc extract (g)	1.060	0.210	1.334
H_2O layer (g)	0.770	8.268	8.338

버섯류의 DBH 저해활성 검색

한방 및 민간에서 각종 성인병의 치료목적으로 이용하거나 일반 식생활에서 널리 이용되고 있는 식용버섯류 중 영지, 양송이, 표고, 3종의 버섯을 대상으로 catecholamine생합성의 마지막 단계인 dopamine을 norepinephrine으로 전환시키는데 관여하는 효소인 DBH에 대한 저해활성을 검색하였다(Table 2). 영지버섯은 클로로포름 분획에서 100% 이상의 현저한 저해활성을 나타내었으며 표고와 양송이는 에틸아세테이트 분획에서 각각 79.7%와 64.7%의 저해활성을 나타내었고 영지의 에틸아세테이트 분획 및 물 분획, 양송이와 표고의 클로로포름 및 물분획에서는 DBH 저해활성이 약하거나 없었다. 한편, 이들 버섯류의 각 용매분획에 대하여 DBH 저해활성을 검색하여 각 분획의 IC_{50}을 구하고 용매분획 총량의 specific activity를 비교한 결과를 Table 3에 나타내었다. 영지버섯의 경우 클로로포름분획, 에틸아세테이트 분획 및 물 분획의 IC_{50}은 각각 1.60×10^{-4}, 1.23×10^{-3}, 5.40×10^{-4} g으로 클로로포름 분획과 물 분획에서 DBH에 대한 저해활성을 나타내었고 양송이는 클로로포름 분획에서는 DBH에

Table 2. Inhibition of various fractions of three kinds of mushrooms on dopamine β-hydroxylase

Mushrooms	Inhibition (%)		
	$CHCl_3$ ext[1]	EtOAc ext	H_2O layer
Ganoderma lucidum	109.3	43.9	61.2
Agaricus bisporus	20.9	64.7	21.6
Lentinus edodes	12.7	79.7	53.7

[1]Each fraction obtained from 50 g of mushrooms was taken 10 mg of each extraction and diluted with distilled water to make 10 mL of test solution. One mL of it was taken and assayed for examing DBH inhibitory activity as described in the experimental method.

Table 3. DBH inhibitory activities of three kinds of dried mushrooms (solvent extraction and fractionation)

Mushrooms	Solvents extraction	IC_{50} (mg)	Total activity	Specific activity
Ganoderma lucidum	$CHCl_3$	0.16	7770	6250
	EtOAc	1.23	8620	813
	H_2O	0.54	1430	1850
Agaricus bisporus	$CHCl_3$	-	-	-
	EtOAc	0.55	382	1820
	H_2O	1.70	4860	588
Lentinus edodes	$CHCl_3$	-	-	-
	EtOAc	0.24	5680	4260
	H_2O	0.80	10400	1250

[1]One unit is defined as a sample amount to give 50% inhibition against DBH activity.

대한 저해활성이 확인 되지 않았으며, 에틸아세테이트 분획 및 물 분획의 IC_{50}은 각각 5.50×10^{-4}, 1.70×10^{-3} g으로 나타났다. 표고버섯의 클로로포름 분획에서도 DBH에 대한 저해활성은 확인되지 않았으며 에틸아세테이트 분획 및 물 분획의 IC_{50}은 각각 2.35×10^{-4}, 8.0×10^{-4} g으로 검색되었다. 영지버섯의 클로로포름 분획과 표고버섯의 에틸아세테이트 분획의 IC_{50}이 각각 1.60×10^{-4}과 2.35×10^{-4} g으로 가장 강한 저해활성을 갖는 것으로 나타났으므로 이를 활성성분 연구의 기초자료로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

영지버섯과 표고버섯에 대한 연구로는 주로 영지의 다당체에 기인하는 항암활성[16]과 면역증강 작용[17] 등에 관한 보고들과 표고의 항산화 활성[16]에 대한 보고들이 주를 이루고 있으나 본 연구에서는 영지와 표고의 저분자 물질 분획에서 효소활성을 저해하는 작용이 검색된 것으로 지금까지와는 다른 차원에서 버섯류의 생리활성 연구가 가능하다는 근거를 제시하는 결과로 중요한 의미를 갖는 것으로 생각된다.

요 약

식용버섯류 중 국내에서 재배되고 있는 식용버섯류에 대한 생리활성 검색의 일환으로 영지, 양송이, 표고 등 3종의 버섯을 대상으로 dopamine β-hydroxylase (DBH)에 대한 저해활성을 tyramine을 기질로 하여 검색하였다. 각 버섯들의 DBH에 대한 저해활성은 영지버섯은 클로로포름 분획에서 100% 이상의 현저한 저해활성을 나타내었으며 표고와 양송이는 에틸아세테이트 분획에서 각각 79.7%와 64.7%의 저해활성을 나타내었다. 한편, 이들 버섯류의 각 용매분획에 대하여 DBH 저해활성을 검색하여 각 분획의 IC_{50}을 구하고 용매분획 총량의 specific activity를 비교한 결과, 영지버섯의 클로로포름분획의 IC_{50}은 1.60×10^{-4} g으로 DBH에 대한 저해활성을 나타내었고 양송이와 표고버섯의 경우 에틸아세테이트 분획의 IC_{50}은 5.50×10^{-4} g, 2.35×10^{-4} g으로 각각 검색되었다.

문 헌

1. 상해과학기술출판사 소학관 : 중약대사전. 동경, p.2731 (1985)
2. 평범사 : 세계유용식물사전. 동경, p.53 (1989)
3. Chapman & Hall: *Dictionary of Natural Products.* N.Y., p.633 (1990)
4. 학력개발사 : 동의보감. 서울, p.1165 (1987)
5. Schanberg, S.M., Stone, R.A., Kirshner, N., Gunnells, J. C. and Robinson, R.R.: A possible aid in the study and evaluation of hypertension. *Science,* **183**, 523 (1974)
6. Foldes, A., Jeffrey, P.L., Preston, B.N. and Austin, L.: Dopamine β-hydroxylase of bovine adrenal medullae. *Biochem. J.*, **126**, 1209 (1972)
7. Craine, J.E., Daniels, G.H. and Kaufman, S.: Dopamine β-hydroxylase. *J. Biol. Chem.,* **248**, 7838 (1973)
8. Ljones, T. and Skotland, T.: *Copper Proteins and Copper Enzymes,* Lontie, R. (Ed.), vol. 2, CRC Press, Boca Raton, Florida, p.131 (1984)
9. Umezawa, H., Takeuchi, T. and Suda, H.: Inhibition of dopamine β-hydroxylase by fusaric acid (5-butylpicolinic acid) *in vitro* and *in vivo. Biochem. Pharmacol.,* **19**, 35 (1970)
10. Liu, T.Z., Sen, Z.T. and Loken, H.F.: Inhibition of dopamine β-hydroxylase by hydralazine (37796). *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.,* **145**, 294 (1974)
11. Iinuma, H., Matsuzaki, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: Biochemical and biological studies on dopastin, an inhibitor of dopamine β-hydroxylase. *Agr. Biol. Chem.,* **38**, 2107 (1974)
12. 황윤정, 이승호, 김학성, 이경순, 노재섭, 이명구 : 수종의 생약이 bovine adrenal tyrosine hydroxlase 및 dopamine β-hydroxylase 활성에 미치는 영향(II). 한국생약학회지, **25**, 194 (1994)
13. 태동년, 황금희, 한용남 : 식물성 생약의 도파민 베타 수산화효소에 대한 저해활성. 생약학회지, **26**, 62 (1995)
14. 황금희 : 상추로부터 단리한 도파민 베타 수산화효소의 저해성분에 관한 연구. 덕성여자대학교 박사학위논문 (1995)
15. Creveling, C.R., Daly, J.W., Witkop, B. and Udenfriend, S.: Substrates and inhibitors of dopamine β-hydroxylase. *Biochim. Biophys. Acta.,* **64**, 125 (1962)
16. 황금희, 김현구 : 기능성식품 소재로서 생물활성 천연물의 국내 연구동향. 식품과학과 산업, **28**, 75 (1995)
17. 한병훈 : 한국 천연물 생물활성 연구. 천연물과학 논총, **2**, 1 (1994)

(1996년 8월 26일 접수)