

송이즙의 항산화 활성, 혈전용해활성 및 Angiotensin I Converting Enzyme의 저해활성 검색

김영언¹ · 권은경^{2*} · 한대석¹ · 김인호¹ · 구경형¹

¹한국식품연구원

²경희대학교 식품생명공학과

Antioxidant Activity, Fibrinolysis and Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Activity of Pine Mushroom Juice (*Tricholoma matsutake* Sing.)

Young-Eon Kim¹, Eun-Kyung Kwon^{2*}, Daeseok Han¹, In-Ho Kim¹, and Kyung-Hyung Ku¹

¹Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

²Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

Abstract

Pine mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.) is an expensive and highly prized delicacy in Korean and Japanese cuisines with its unique flavor and functional properties. The biological activities of pine mushroom juice (soluble solid contents 4.3°Brix) were evaluated using different tests; DPPH radical scavenging assay for its antioxidant activity, fibrin plate method for fibrinolysis and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity for anti-hypertensive effect. Free radical scavenging activity of the pine mushroom juice was $48.3 \pm 2.2\%$ at the concentration of 1.0 mg/mL. The fibrinolytic activity of pine mushroom was about 2 times greater than that of plasmin used as positive control and the activity increased dose-dependently. The pine mushroom juice inhibited ACE activities dose-dependently and IC₅₀ value of ACE activity was 1.03°Brix. These results suggest that pine mushroom is a healthy delicacy.

Key words: pine mushroom, DPPH radical scavenging, fibrinolysis, ACE inhibition

서 론

송이는 담자균아문(*Basidiomycotina*) 주름버섯목(*Agaricales*) 송이과(*Tricomataceae*)에 속하는 버섯으로 학명은 *Tricholoma matsutake* Sing.이며, 표면은 담황갈색-밤갈색의 섬유상인편으로 덮여있으며, 방사상으로 갈라져 흰색을 보이고 독특한 향기가 있다(1). 버섯은 식품의 맛을 돋우는 조미료로서의 역할뿐만 아니라, 다양한 생리활성을 지니고 있음이 밝혀져 있으며, 특히 송이는 맛과 향기가 뛰어난 고급 기호식품으로서 연간 5,000만 불 이상 수출되어온 고부가가치 작물 중의 하나이다. 송이를 선호하는 나라로는 한국, 일본, 중국 및 홍콩 등이 있으며, 우리나라에서 생산되는 송이 중 내수시장에서 판매되는 일부를 제외하고는 거의 대부분이 일본으로 수출되고 있다.

송이는 등급에 따라 큰 가격차를 보이는데, 이들의 등급별 가격 차이는 1등급 기준으로 2등급은 약 65%, 3등급 생장 정지품이 약 30%, 개산품이 18% 수준이다. 등급별 가격 차이가 매우 심하여 1, 2등급품을 제외하고는 채취 단계에서

단순 소비되고 있다(2). 버섯의 선도 연장을 위한 방법으로 감마선 조사, CA(controlled atmosphere)저장, MA(modified atmosphere)저장 및 빙결저장법 등이 제시되었으나, 저장기간 면에서 크게 연장되지는 못하였다. 특히 송이의 경우, 신선도를 유지하기 위하여 채취 후 3일 이내에 일본 내 판매가 이루어지도록 하고 있으며, 소비되지 못한 경우에는 급속 냉동하여 저장하고 있다(3). 생송이 버섯과 냉동송이 버섯의 품질 및 향기 성분 특성에 대한 연구(3)에 따르면 생송이를 급속냉동하여 6개월을 저장한 후 생송이와 향기패턴의 차이를 전자코를 이용하여 분석하였다. 그 결과 송이의 휘발성 향기 성분 중 하나인 1-octen-1-ol의 함량이 등급이 낮아짐에 따라 낮아졌으나 관능검사 결과로는 동의품을 제외하고는 냉동송이 등급 간에 차이가 없다고 평가하였다. 즉 냉동송이나 그 부산물을 이용해서 품질이 우수한 가공제품 개발이 이루어질 경우 소비자와 생산자 모두가 만족할 수 있을 것으로 예상된다.

최근 국내에서는 의식주의 변화에 따라 비만, 관상동맥질환, 당뇨, 암과 같은 영양과잉이나 영양불균형에서 오는 만

*Corresponding author. E-mail: kwonhappy@hanmail.net
Phone: 82-31-780-9073, Fax: 82-31-780-9073

성 퇴행성 질환이 지속적으로 증가하고 있다. 특히 보건복지부에서 발간한 '2007 보건복지 통계연보'(4)에 따르면 2006년에 혈관질환과 심장질환으로 대표되는 혈액순환기계 질환으로 인한 사망자가 전체 주요 사망원인의 2위를 차지하고 있어 여기에 대한 대비책이 시급한 상황이다. 그중에서도 관상동맥질환(coronary artery disease; CAD)은 심장에 혈액을 공급하는 관상동맥이 막히거나, 좁아져서 발생하며 심근경색증이나 협심증을 유발한다고 알려져 있다. 심혈관질환의 발생과 관련된 위험요인은 고혈압과 고지혈증이 가장 중요하게 여겨지며 다음으로 당뇨와 흡연 등과 같은 생활습관을 꼽을 수 있다(5). 고혈압의 치료제로 사용되는 ACE 억제제는 관상동맥질환과 심근경색의 발생을 감소시키며, neurohormonal effect에 의해 혈관벽에 가해지는 스트레스를 줄여 줌으로써 심혈관계 질환에 효과를 나타낸다고 하였다. 항산화 활성의 경우 혈중의 산화된 LDL 콜레스테롤은 내피세포 기능을 악화시키고 동맥경화반 내에 염증세포를 유인하며 혈소판의 NOS 활성도를 저하시킨다. 게다가 산화 LDL 콜레스테롤은 단핵구의 tissue factor 발현을 항진시켜 혈전형성을 촉진하므로 항산화제의 섭취가 심혈관질환의 예방에 효과적이라 할 수 있다. 또한 혈액 내의 homeostasis가 깨어져 혈전이 생성되면 혈관이 막히게 되고 혈액 순환이 방해받게 되므로, 혈액 내에서 혈전용해를 향상시키면 혈액순환에 도움이 된다(6). 즉 심혈관계 질환의 치료나 예방을 위해서는 특정원인 한가지만을 target으로 하기보다는, 여러 가지 원인들이 상호작용을 하기 때문에 다방면에서 조절을 해주어야 한다. 본 연구는 다양한 원인들 중에서 식품으로 조절이 가능한 고혈압, 항혈전 및 항산화 활성에 대한 송이즙의 효과를 알아보고자 하였다. 송이의 경우 탁월한 풍미만큼이나 우수한 생리활성을 갖고 있는 것으로 밝혀졌으며, 대표적으로 콜레스테롤 강하효과, 항산화, 면역증가 및 항암 활성 등이 보고되었다(2,7-9). 이로 미루어 볼 때 송이즙 또한 이러한 효능이 있을 것으로 기대한다.

본 연구는 장기간 저장을 위해 냉동한 송이를 해동할 때에 유출되는 송이즙으로 제품개발을 함에 있어서 식품가공원료로의 이용가치를 증대시키기 위하여 기능성을 탐색하고자 하였다. 이를 위해 송이즙의 DPPH radical을 이용한 항산화 활성을 측정하고, 혈액응고기전에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈전용해 활성을 측정하였으며, ACE 저해활성을 측정함으로써 항고혈압 활성을 검색하여 전반적으로 혈액순환기계통에 대한 개선효과가 있는지를 살펴보았다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 송이즙은 2007년도 강원도 양양의 (주)양양자연송이농산으로부터 구매한 냉동송이를 해동한 후 탈수기에서 탈수과정을 통해 채취한 것으로 송이즙 채취 과정

중에 물을 전혀 첨가하지 않은 순수한 송이즙만을 시료로 사용하였다. 송이즙의 가용성 고형분 함량은 4.3°Brix이고 이를 적정농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Free radical scavenging activity

송이즙의 항산화 활성은 Gulcin 등의 방법(10)을 이용하여 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH[•], D-9132, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA)를 사용하여 측정하였다. 먼저 1 mL의 0.1 mM DPPH[•] in ethanol에 각각 다른 농도의 시료액(0.1, 0.5, 1, 2 mg/mL) 3 mL를 첨가하였다. 이 혼합액은 강하게 섞어주고 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응액의 흡광도가 낮을수록 free radical scavenging activity가 높다는 것을 의미하며 DPPH radical의 농도는 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{DPPH}^{\bullet} \text{ scavenging effect (\%)} = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

A₀: 대조구의 흡광도

A₁: 시료구의 흡광도

혈전용해 활성

혈전용해 활성은 Astrup과 Müllertz의 fibrin plate법(11)을 수정하여 사용하였다. 먼저 0.6% bovine fibrinogen (F-4129, in 0.17 M borate-saline buffer, pH 7.8, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA) 10 mL를 10 cm petri dish에 조심스럽게 부은 후 bovine thrombin(T-3399, 20 U/mL, in same buffer, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA) 0.5 mL를 첨가하여 1시간 동안 실온에서 응고시켰다. 응고된 plate 위에 시료 50 µL를 조심스럽게 점적하였다. 대조구로는 시료 대신 plasmin(194078, 1.0 U/mL, ICN Biochemicals Inc., OH, USA)을 사용하였다. 이때 사용된 시료는 송이즙 원액(4.3°Brix)을 기준으로 하여 10배씩 희석하거나 0.8, 0.6, 0.4, 0.2배로 순차적으로 희석하여 농도별로 사용하였다. 이 plate를 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 lytic circle의 크기를 측정하였다. Fibrin plate법에서는 fibrin이 가수분해됨에 따라서 생기는 투명환의 면적을 관찰할 수 있으며 이는 혈전용해능과 비례관계에 있다. 그러므로 혈전용해 활성은 투명환의 면적으로 나타낼 수 있으며, 송이즙의 혈전용해 활성은 다음의 식에 따라 계산하였다(12).

$$\text{Fibrinolytic activity (\%)} = \frac{\text{Dimension of clear zone of sample}}{\text{Dimension of clear zone of plasmin}} \times 100$$

Angiotensin I converting enzyme 저해활성

ACE 저해활성의 측정은 Cushman과 Cheung의 spectrophotometric assay 방법(13)을 응용하여 측정하였다. 먼저 효소원을 준비하기 위해서 rabbit lung acetone powder(L-0756, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA) 10 g을 50 mM potassium phosphate buffer(pH 8.3) 100 mL에 충분히 섞어준 후에 40,000×g에서 40분간 원심분리를 하였

다. 원심분리한 상등액은 활성이 매우 높고 5°C에서 한 달 정도 보관이 가능한 ACE의 효소원이 된다.

ACE 저해활성의 측정은 먼저 0.25 mL assay mixture(100 mM potassium phosphate buffer pH 8.3, 300 mM NaCl, 5 mM hippuryl-his-leu(HHL, H-1635, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA)에 0~10 mU enzyme 0.15 mL를 가하여 30분간 37°C에서 반응시켰다. 이때 반응액의 시료구에는 시료를 60 µL 첨가하고 대조구에는 시료 대신 증류수를 동량으로 첨가하였다. 여기서 사용된 시료는 송이즙 원액(4.3°Brix)을 기준으로 하여 10배씩 희석하여 농도별로 사용하였다. Blank는 효소원을 첨가하기 전에 먼저 0.25 mL 1 N HCl을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 효소원을 첨가하였다. 반응을 끝낸 후 0.25 mL 1 N HCl을 첨가하여 반응을 정지시키고 1.5 mL ethyl acetate를 넣어준 후에 15초간 잘 섞어 900×g에서 15초간 원심분리하여 ethyl acetate 층을 분리하였다. 분리된 ethyl acetate 1 mL를 tube에 담은 후 120°C oil bath에서 15분간 증류 건조시켰다. 건조가 끝나면 2 mL의 증류수에 다시 녹이고 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. ACE 저해활성도는 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{ACE inhibition rate (\%)} = 1 - \left(\frac{S - SB}{C - CB} \right) \times 100$$

- S: O.D. of sample
- C: O.D. of control
- SB: O.D. of sample blank
- CB: O.D. of control blank

효소 1단위(U)는 37°C에서 1분간 HHL에서 hippuric acid 1 µmol을 생산하는 효소의 양으로 하였으며 이때 대조구의 활성은 100%로 간주하였다. IC₅₀ value는 시료농도에 따른 ACE 억제활성도를 용량-활성 곡선을 만들어 거기서 유래하는 곡선의 방정식을 이용하여 계산하였다.

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{\left[\frac{\log IC_{50} - x}{\text{slope}} \right]}}$$

HMG(3-hydroxy-3-methyl-glutaryl)-CoA reductase 저해활성

HMG-CoA reductase 저해활성도의 측정을 위해서 먼저 Kleinsek 등의 방법(14)에 따라 효소원을 준비하였다. 실험 동물은 4주령의 SD계 웅성 흰쥐를 일주일간 예비 사육하여 사육실 환경에 적응시킨 후에 AIN-76A diet(Dyets Inc., PA, USA)를 주어 7일간 사육하였다. 사육이 끝난 흰쥐는 밤 11시에 해부하여 간을 적출하여 무게를 측정하였다. 적출한 간은 rat liver 1 g당 ice cold buffer A(50 mM phosphate buffer, pH 7.0 with 0.2 M sucrose, 2 mM DL-dithiothreitol (DTT, D-0632, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA)) 2 mL를 첨가한 후 Potter Elvehjem type glass homoge-

nizer(GlassCol, LLC., IN, USA)로 15초간 full speed로 균질화한 다음 15,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액은 다시 100,000×g에서 75분간 초원심분리하여 상등액을 버리고 흰색의 지방층을 제거하였다. 이렇게 얻은 microsome pellet은 buffer A(containing 50 mM EDTA)를 rat liver 1 g당 1 mL씩 첨가하여 세척하고 100,000×g에서 60분간 원심분리한 다음 상등액은 버리고 -20°C에서 보관하였다. -20°C에서 최소 2시간에서 수주간 보관한 microsome pellet을 실온에서 해동시킨 후에 buffer B(50 mM phosphate buffer, pH 7.0 with 0.1 M sucrose, 2 mM DTT, 50 mM KCl, 30 mM EDTA)를 3 mL/1.5 g rat liver를 가하여 균질화하였다. 다시 같은 buffer를 7 mL/1.5 g rat liver 첨가한 후에 상온에서 15~30분을 방치한 다음 100,000×g, 20°C에서 60분간 초원심분리하여 상등액을 취한 후 효소원으로 하였으며 사용 시까지 -70°C에서 보관하였다.

측정방법은 1 mL cuvette에 시료 20 µL(control은 DMSO 20 µL), 0.5 mM phosphate buffer(pH 7.0), 20 mM DTT 600 µL, 3 mM NADPH(N-1630, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA) 100 µL, 효소원 100 µL를 넣었다. 이때 시료액은 송이즙 원액(4.3°Brix)을 기준으로 하여 10배씩 희석하여 농도별로 사용하였다. 반응액의 온도는 37°C로 일정하게 유지하여 약 10분간 pre-incubation 한 후에 3 mM HMG-CoA(H-6132, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA) 100 µL를 가하여 효소반응을 시작하였다. 반응이 시작됨과 동시에 340 nm에서 5분간의 흡광도 변화를 기록하였다. HMG-CoA reductase의 억제활성은 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{HMG-CoA reductase inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{T}{C} \right) \times 100$$

- T: ΔO.D. of sample
- C: ΔO.D. of blank

통계처리

본 연구의 실험 결과는 실험군당 평균과 표준편차를 계산하였고, SAS V8 프로그램(SAS Institute Inc., NC, USA)을 이용하여 one-way ANOVA를 실시한 후 α=0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군의 평균치간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

Free radical scavenging activity

송이즙과 항산화제인 BHA, BHT 및 ascorbic acid의 DPPH radical의 환원력은 517 nm에서 흡광도의 감소정도로 측정하였으며 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 송이즙의 농도가 1.0 mg/mL일 때 48.3%의 억제활성을 보였으며 농도별로 희석한 송이즙의 DPPH 라디칼 소거능은 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 일반적

Table 1. Free radical scavenging (%) of the different concentrations of pine mushroom juice

	Concentration (mg/mL)	Free radical scavenging activity ¹⁾ (%)
PMJ ²⁾	0.1	8.0±2.8 ⁶⁾
	0.5	38.9±1.3
	1.0	48.3±2.2
	2.0	48.3±1.1
Ascorbic acid ³⁾	0.1	58.5±1.2
BHA ⁴⁾	0.1	91.8±0.5
BHT ⁵⁾	0.1	87.4±1.0

¹⁾The stable free radical, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

²⁾Pine mushroom juice.

³⁻⁵⁾Positive controls. ⁴⁾Butylated hydroxyanisole. ⁵⁾Butylated hydroxytoluene.

⁶⁾Values are means of triplicate determinations± standard deviation.

으로 알려진 항산화제인 ascorbic acid, BHA 및 BHT를 양성대조구로 사용하였으며 0.1 mg/mL의 농도에서 측정된 DPPH 라디칼 소거능은 각각 58.5, 91.8, 87.4%로 나타났다.

DPPH radical을 이용한 free radical scavenging 모델은 항산화 활성을 측정하는 다른 방법들에 비해 안정적이고 상대적으로 짧은 시간 안에 반응이 일어나기 때문에 널리 쓰여지고 있다. DPPH radical 소거능에 따른 항산화 효과는 DPPH*의 수소 공여능에서 기인하는 것으로 이는 안정적인 자유기이며 전자나 수소를 받아들여 diamagnetic molecule이 된다(9). Lim 등의 연구(2)에서는 국내산 송이버섯을 등급별로 분류하여 항산화 활성을 비교분석하였으며, 그 결과 일등급 송이가 다른 등급에 비해 높은 활성을 보였고, 특히 ethyl acetate 및 n-butanol 분획에서 높은 자유기 소거능을 보여 1 g/mL의 농도에서 47.6~57.3%의 범위에 것으로 나타났다. 식용버섯 추출물의 항산화 활성과 페놀함량과의 상관관계에 대한 연구(15)에서는 표고버섯과 풀버섯 (*Volvariella volvacea*)을 물과 메탄올로 추출한 후에 항산화

Table 2. Fibrinolytic activity of different concentration of pine mushroom juice by fibrin plate method

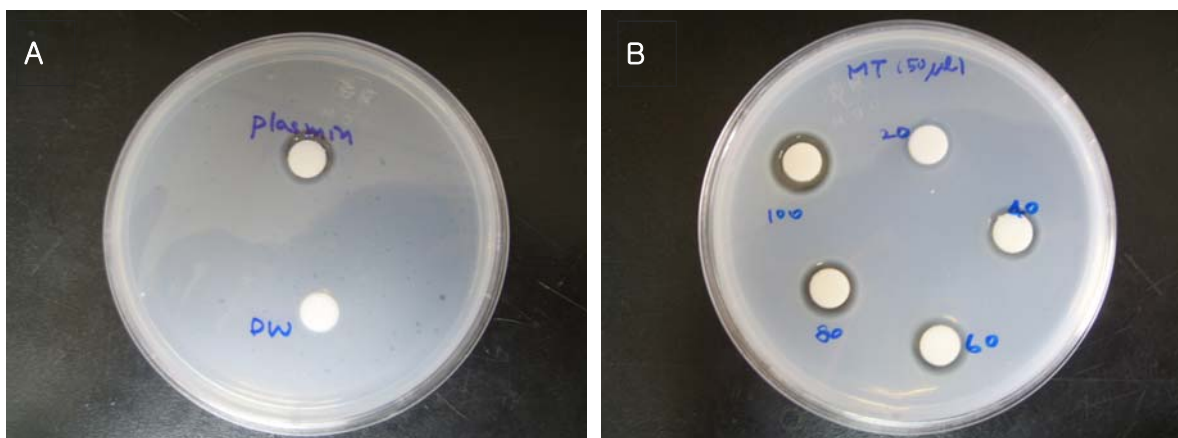
Concentration ¹⁾ (°Brix)	Activity (%)	Concentration (°Brix)	Activity (%)
4.3×10 ⁰	211.6	4.3×1	180.5
4.3×10 ⁻¹	82.6	4.3×0.8	95.2
4.3×10 ⁻²	-	4.3×0.6	95.2
4.3×10 ⁻³	-	4.3×0.4	84.4
4.3×10 ⁻⁴	-	4.3×0.2	66.1

¹⁾Used the concentrations of sample which were 4.3×10^{0, -1, -2, -3, -4}Brix in the first test and 4.3×1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2°Brix in the second, respectively. Plasmin (1 U/mL) was used as positive control.

활성을 비교하였는데, 특히 가장 활성이 높게 나타난 표고버섯 물추출물의 경우 DPPH 라디칼 소거능이 3 mg/mL 농도에서 45.1±1.45%로 본 연구에서 사용한 송이즙의 항산화 활성에는 못 미치는 수준이었다. 이러한 결과로 볼 때 송이즙은 송이 추출물의 항산화능에 준하는 우수한 활성을 지닐 수 있었다.

혈전용해 활성

농도별로 희석한 송이즙이 혈액응고기전에 미치는 영향을 알아보기 위하여 fibrin plate method를 이용하여 용해환의 면적을 plasmin의 면적과 비교하였다. Table 2에는 송이즙의 혈전용해도를 plasmin과 비교하여 수치화하였다. 송이즙 원액인 4.3°Brix에서 약 180.5~211.6% 정도로 plasmin에 비해 약 2배 정도 높은 활성을 보였으며 반면에 4.3×10⁻²Brix 이하의 농도에서는 활성을 보이지 않았다. 또한 농도별로 희석한 경우에 송이즙의 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 혈전용해 활성이 증가하는 경향을 보였다. Fig. 1은 송이즙을 농도별로 희석하여 대조군인 증류수와 plasmin(1 U/mL)을 같이 점적하여 용해면적을 상대 비교할 수 있도록 한 것이다. 그림에서 알 수 있듯이 송이즙의 fibrin 용해정도는 농도가 증가할수록 높아짐을 알 수 있었다.

**Fig. 1. Fibrinolytic activities of pine mushroom juice.**

A: Plasmin (1 U/mL) and DW (distilled water) were used as controls, B: Pine mushroom juice with serial dilution (4.3×1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2°Brix, respectively).

생체내의 혈액은 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루고 있으며 정상적으로 순환되고 있을 때에는 혈전이 생성되지 않는다. 그러나 여러 가지 원인으로 균형이 깨져 혈전이 생성되면 혈관이 막히게 되고 혈액 순환이 방해되어 영양분과 산소공급에 영향을 끼쳐 심부전증이나 심장질환 등의 혈전증(thrombosis)으로 사망에까지 이르게 된다(16). 이와 같은 혈전형성을 방지하기 위해 혈소판응집을 억제하거나 혈전을 용해할 필요가 있고 그 역할을 하는 항혈소판제제, 즉 혈소판 활성화 억제제 등 항혈전제가 요구된다. 혈전증(thrombosis)의 치료제로는 urokinase, streptokinase, tPA (tissue type plasminogen activator), nattokinase, plasminogen activator 등이 알려져 있다(17). 혈전용해능을 갖는 버섯류의 탐색에 관한 보고(18)에서는 국내에 자생하는 50여종의 버섯류를 메탄올로 추출한 후 농축하여 버섯 추출물을 조제한 후에 혈전용해 활성을 검색한 결과 5종의 버섯에서 높은 활성이 나왔으며, 특히 모래발 버섯(*Pisolithus tinctorius*)의 경우 약 4.71 plasmin unit/mL로 가장 높은 활성을 보였다. 단 사용된 버섯 추출물의 농도를 정확히 알 수 없어 본 연구와 직접적으로 비교할 수는 없었다. Kim 등의 연구(19)는 야생에서 자생하는 55종의 버섯을 메탄올로 추출한 후 100 mg/mL의 농도로 희석하여 혈전용해 활성을 측정하였다. 그 결과 14종의 버섯에서 활성을 확인하였으며, 그중 흰가시광대버섯이 3.9 plasmin units로 가장 컸으며 나머지는 2.8~0.3 plasmin units 정도의 범위를 보였다.

이는 본 연구에서 사용한 송이즙의 농도보다 시료농도가 높음을 감안한다면, 송이즙의 혈전용해 활성이 다른 버섯들 만큼 높다는 것을 알 수 있었다. 즉 고가인 송이의 부산물인 송이즙의 경우에 혈전용해 활성이 매우 우수한 것으로 나타났으며 기능성을 지닌 식품소재로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

ACE 저해활성

송이즙이 고혈압의 작용기전에 미치는 영향을 알아보기

위하여 angiotensin I converting enzyme의 저해활성을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 Table 3에 나타내었다. 송이즙을 농도별로 희석하여 ACE 저해활성을 측정한 결과, 4.3°Brix에서 약 91.5%의 저해활성을 보였으며, 10배씩 희석한 경우에 농도가 감소함에 따라 ACE 저해활성이 감소하는 경향을 보임을 알 수 있었다. Table 3에는 송이즙과 captopril의 ACE 저해활성을 농도별로 측정하여 IC₅₀값을 산출할 수 있도록 sigmoid curve를 그리기 위한 각종 parameter들을 나타내었으며, 이 parameter에 기초하여 Fig. 2의 sigmoid curve가 완성되었다. 그리고 여기서 알 수 있듯이 비교약물로 사용된 captopril의 IC₅₀은 45.68 nM이었으며 송이즙의 IC₅₀은 1.03°Brix 정도로 나타났다.

고혈압이 발생하는 기작에서 renin-angiotensin system은 혈압조절에 매우 중요한 역할을 한다. Angiotensin I converting enzyme은 angiotensin I에서 angiotensin II를 합성하는 마지막 단계에 관여하는 효소로 Angiotensin II (A-II)는 A-II 수용체와 결합하여 동맥과 소동맥을 수축시키고, 부신피질을 흥분시켜 알도스테론의 유리가 촉진되어

Table 3. Parameters of the fitted four-parametric logistic dose-activity curves for ACE inhibition by pine mushroom juice and captopril

	PMJ ⁵⁾	Captopril ⁶⁾
Min ¹⁾ (%)	0.38	0.18
Max ²⁾ (%)	97.97	97.31
IC ₅₀ ³⁾ (°Brix or nM)	1.03	45.68
Hill slope ⁴⁾	8.8555	0.2386
R ²	0.9836	0.9935

The data were fitted by a four parametric logistic model using the Marquardt-Levenberg algorithm (Sigmaplot 8.0). Parameter ¹⁾min equals the baseline of 100% inhibition, ²⁾max the plateau of 100% activity. Parameter ³⁾IC₅₀ gives the transition center. The ⁴⁾hill slope determines the slope of the curve at the transition center. IC₅₀ value of PMJ was expressed in °Brix and captopril was in nM. ⁵⁾Pine mushroom juice. ⁶⁾Positive control.

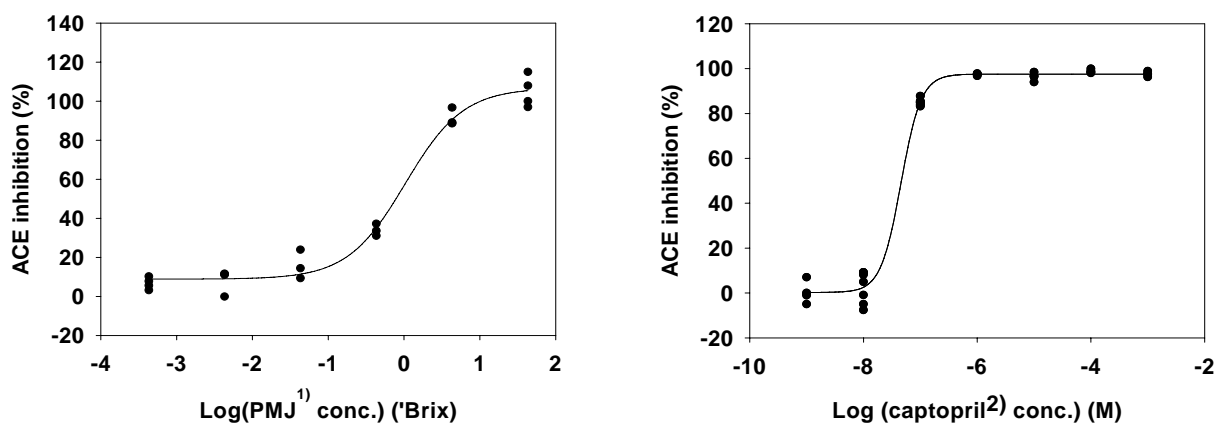


Fig. 2. ACE inhibition of pine mushroom juice in the optimized ACE inhibition assay. Data were fitted by a four-parametric logistic model. ¹⁾Pine mushroom juice. ²⁾Positive control.

결과적으로 혈압의 증가를 가져온다. 따라서 ACE 저해물질은 ACE의 활성을 억제함으로써 고혈압을 직접적으로 억제할 수 있다(20). ACE inhibitor는 일반적으로 고혈압 치료제로 알려져 있으나, 이런 합성 약물은 높은 활성과 특이성 때문에 유의한 부작용을 나타낼 가능성을 가지고 있다. 이러한 부작용을 줄이기 위한 하나의 방편으로 식품 단백질에서 유래하는 ACE 저해활성을 가진 peptide류들을 검색하는 연구가 다양하게 이루어지고 있으며 이들이 ACE 저해 약물들을 대신할 수 있을 것으로 기대된다(21). ACE 저해작용을 가지는 대표적인 약물로는 captopril이 있으며 이 약물의 ACE에 대한 IC₅₀ value는 대체적으로 1.60~8.91 nM의 범위라고 보고되어 있다(20). Hagiwara 등의 연구(22)에 의하면 식용으로 사용되는 노랑느타리 버섯(*Pleurotus cornucopiae*)의 경우 열수추출물은 고혈압이 유도된 흰쥐에서 항고혈압 활성이 있음을 확인하였고, 버섯의 주요한 phytochemical의 하나인 D-mannitol이 그러한 작용을 가진다고 보고하였다. 이에 따르면, 송이즙의 경우에도 ACE 저해활성을 갖는 mannitol을 다량 함유하고 있을 가능성이 있으며 이에 대한 후속연구가 필요할 것으로 보인다.

단, 송이즙의 경우 HMG-CoA reductase의 저해활성은 없는 것으로 나타났다. 이러한 모든 결과를 토대로 기능성을 가진 송이즙의 특성을 살려 그 활용도를 더욱 높여서 고부가가치 송이 가공제품을 개발하는데 초석이 될 수 있을 것이며, 더 나아가 송이 생산 농가나 송이 관련 중소기업에 도움이 될 수 있을 것이다.

요 약

송이(*Tricholoma matsutake* Sing.)는 맛과 향기가 뛰어난 고급 기호식품으로서 연간 5,000만 불 이상 수출되어온 고부가가치 작물 중의 하나이다. 본 연구는 냉동송이의 해동시에 유출되는 송이즙의 생리활성을 탐색하고자 항산화 활성, 혈전용해 활성, 항고혈압 활성 등을 측정하였다. 그 결과로 송이즙의 DPPH 라디칼 소거능은 1.0 mg/mL의 농도에서 48.3±2.2%였으며 농도의존적으로 그 활성이 증가하는 경향을 보였다. Fibrin-plate법을 사용하여 알아본 송이즙의 혈전용해 활성은 양성대조구인 plasmin(1 unit/mL)에 비해 약 2배가량 높은 활성을 보였다. 송이즙의 IC₅₀은 1.03°Brix로 나타났으며 양성대조구로 사용된 captopril의 경우에는 약 45.7 nM이었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, 송이즙은 우수한 생리활성을 보임으로써 좋은 가공원료로 이용할 가치가 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(ARPC)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Shim KM, Ko CS, Lee YS, Kim GY, Lee JT, Kim SJ. 2007. Correlation coefficients between pine mushroom emergence and meteorological elements in Yangyang county, Korea. *Korean J Agric For Meteorol* 9: 188-194.
2. Lim HW, Yoon JH, Kim YS, Lee MW, Park SY, Choi HK. 2007. Free radical-scavenging and inhibition of nitric oxide production by four grades of pine mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). *Food Chem* 103: 1337-1342.
3. Ku KH, Cho MH, Park WS. 2002. Characteristics of quality and volatile flavor compounds in raw and frozen pine-mushroom (*Tricholoma matsutake*). *Korean J Food Sci Technol* 34: 625-630.
4. KNSO. 2007. Annual report on the cause of death statistics. Korea National Statistical Office, Seoul, Korea
5. Galioto A, Dominguez LJ, Pineo A, Ferlisi A, Putignano E, Belvedere M, Costanza G, Barbagallo M. 2008. Cardiovascular risk factors in centenarians. *Exp Gerontol* 43: 106-113.
6. Voet D, Voet JG. 1990. *Biochemistry*. John Wiley Sons, New York. p 1087-1095.
7. Ebina T, Kubota T, Ogamo N, Matsunaga K. 2002. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from a mycelium of *Tricholoma matsutake* (S. Ito and Imai) Sing. *Biotherapy* 16: 255-259.
8. Hoshi H, Yagi Y, Iijima H, Matsunaga K, Ishihara Y, Yasuhara T. 2005. Isolation and characterization of a novel immunomodulatory α-glucan-protein complex from the mycelium of *Tricholoma matsutake* in basidiomycetes. *J Agric Food Chem* 53: 8948-8956.
9. Mau JL, Chang CN, Huang SJ, Chen CC. 2007. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chem* 87: 111-118.
10. Gulcin I, Sat IG, Beydemir S, Elmastas M, Kufrevioglu OI. 2004. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thumb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chem* 87: 393-400.
11. Astrup A, Müllertz S. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* 40: 346-351.
12. Sohn BH, Oh KH. 2006. Isolation and characterization of the fibrinolytic enzyme producing bacterium isolated from naturally fermented *Chungkookjang*. *J Korean Inst Venture Technol* 7: 476-482.
13. Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
14. Kleinsek DA, Ranganathan S, Porter JW. 1977. Purification of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from rat liver. *Proc Natl Acad Sci* 74: 1401-1435.
15. Cheung LM, Cheung CK, Vincent ECO. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem* 81: 249-255.
16. Yun YP, Kang WS, Lee MY. 1996. The antithrombotic effects of green tea catechins. *J Food Hyg Safe* 11: 77-82.
17. Lee KY, Kim JH, Son JR, Lee JS. 2001. Detection and extraction condition of physiological functional compounds from bran of *Heugjinju* rice (*Oryza sativa* L.). *Korean J Postharvest Sci Technol* 8: 296-301.
18. Choi NS, Seo SY, Kim SH. 1999. Screening of mushrooms having fibrinolytic activity. *Korean J Food Sci Technol* 31: 553-557.

19. Kim JH, Yoo KH, Seok SJ. 2007. Screening test of wild mushroom methanol extracts for fibrinolytic and α -glucosidase inhibitory activity. *J Exp Biomed* 13: 245-249.
20. Vermeirssena V, Campb JV, Verstraetea W. 2002. Optimization and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J Biochem Biophys Methods* 51: 75-87.
21. Messerli FH. 1999. Combination in the treatment of hypertension: ACE inhibitors and calcium antagonists. *Am J Hypertens* 12: 86s-90s.
22. Hagiwara SY, Takahashi M, Shen Y, Kaihou S, Tomiyama T, Yazawa M, Tamai Y, Sin Y, Kazusaka A, Terazawa M. 2005. A phytochemical in the edible Tamogi-take mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 1603-1605.

(2008년 2월 1일 접수; 2008년 2월 29일 채택)