

차가버섯 용매추출분획의 Acetylcholinesterase 저해활성에 대한 동역학 및 열역학적 해석

김학규¹ · 허원 · 홍억기 · 이신영*

¹(사)한국가속기 및 플라즈마연구협회, 강원대학교 생물공학과

Kinetic and Thermodynamic Analysis of AChE Inhibition of Solvent Extract Fractions from *Inonotus obliquus*

Hak-Kyu Kim¹, Won Hur, Eock Kee Hong, and Shin-Young Lee*

¹Korea Accelerator and Plasma Research Association

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University

Abstract

Twenty four fractions by solvent extraction and/or acid precipitation from fruit body and culture broth of *Inonotus obliquus* were prepared, and their inhibitory effect against acetylcholinesterase (AChE) was investigated. Among these fractions, acid (1 M HCl) precipitates from cell-free culture broth and fruit body exhibited the highest inhibitory effect on AChE *in vitro*. Acid precipitates inhibited AChE activity in a concentration-dependant manner and IC₅₀ values of both acid precipitates were 0.53 mg/mL. The inhibition pattern was general non-competitive inhibition. The energetic parameters were also determined by dual substrate/temperature design. Both acid precipitates increased the values of E_a , ΔH , ΔG and ΔH^* decreasing the value of ΔS for AChE. The results implied that the acid precipitates from *I. obliquus* increased the thermodynamic barrier, leading to the breakdown of ES complex and the formation of products as inhibitory mechanism.

Key words: *Inonotus obliquus*, solvent extract, acid precipitate, acetylcholinesterase, inhibition kinetics and thermodynamic analysis

서 론

치매는 기억과 인지능력의 점차적인 악화로 일상생활에 치명적 손상을 주는 질병이며, 서구의 경우 65세 이상 고령인구 사망의 4번째를 차지한다(Brhlmann et al., 2004). 가장 흔한 유형은 Alzheimer's disease(AD)인데, AD의 원인은 아직까지 불분명한 점이 많고, 효과적인 치료제도 거의 없는 실정이다(Wolf-Klein et al., 2007).

하지만 치매환자 사체의 뇌조직에서 전시냅스(presynapse) 콜린성 신경의 퇴화와 손실이 확인됨으로써 AD는 콜린성 인지결손에 기인한다는 가설(cholinergic deficiency hypothesis)이 가장 널리 수용되고 있다(Nordmeyer & Dickson, 1991; Rao & Dasgupta, 1991; Doulgeraki et al.,

2002). 특히, 기저 전뇌의 콜린성 세포의 손실은 치매관련 인지손상에서 중요한 역할을 하는 chemical messenger로서의 acetylcholine(ACh)의 감소를 초래하므로 ACh 수준의 증가는 AD의 증상치료에서 가장 유망한 접근법의 하나로 인식되고 있다.

따라서 cholinesterase 저해제는 acetylcholinesterase(E.C. 3.1.1.7; AChE)에 의한 ACh의 분해를 억제하고, 그 수준을 유지함으로써 뇌세포작용의 손상을 방지하여 치매의 증상을 치료하는 대표적 약제이다. 현재 FDA에 의해 AD의 치료제로 승인받은 5종의 약물 중, memantine(Brand names, Exiba or Namenda)을 제외한 나머지 4종(donepezil, galantamine, rivastigimine, tacrine)은 이 AChE의 저해제로서 시냅스에서의 아세틸콜린의 분해를 억제시킴으로써 뇌에 작용하는 아세틸콜린의 수준을 증가시키는 것으로 보고되고 있다(Ezio, 1998; Heo et al., 2002; Tsakiris & Schulpis, 2003).

그러나 현재 사용되는 AChE 저해제들은 낮은 생체이용성, 제한된 효능, 좁은 치료범위, 간독성, 뇌 및 말초조직에서의 콜린성 자극으로 부작용을 나타낸다. 특히, 구토, 설사와 같은 위장관 문제점이 가장 큰 위험으로 보고되었다

*Corresponding author: Shin-Young Lee, Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea

Tel: +82-33-250-6273, Fax: +82-33-243-6350

E-mail: sylee@kangwon.ac.kr

Received May 30, 2011; revised September 2, 2011; accepted September 8, 2011

(Dunbar et al., 2006).

그러므로 phytotherapy가 AD 치료의 잠재력을 갖는 것으로 보고되었으며, 그동안 천연자원으로부터의 AChE 저해제들이 탐색되었다. 주로 식물유래의 alkaloid 및 non-alkaloid에 집중되었고(Mukherjee et al., 2007; Brhlmann et al., 2004), 버섯유래 성분에는 노루궁뎅이 버섯이외에는 별로 보고된 바가 없다. Kawagishi et al.(1993,1994, 1996)은 노루궁뎅이 버섯자실체의 페놀화합물(hericenones)이 신경성장인자의 합성유도 촉진활성을 나타낸다고 하였고, 균사체 유래 페놀화합물(erinacines)에 의한 중추신경재생과 AD형 치매의 개선효과를 밝힌 바 있다.

한편, Wetwitayaklung et al.(2007)은 폴리페놀 함량이 높고, 강한 항산화활성을 갖는 *Q. indica* 꽃의 메탄올 추출물이 AChE 저해능을 갖는다고 보고하였는데, Ji & Zhang (2008)은 플라보노이드, 페놀류 등의 phytochemical 항산화제들이 AChE 저해제로서 역할을 할 수 있다고 하였다.

차가버섯(*Inonotus obliquus* 또는 *Fuscoporia obliquus*)은 소나무비늘버섯과(*Hymenochaetaceae*), 시루뻐버섯속(*Inonotus*)에 속하는 버섯으로, Kahlos et al.(1986)에 의해 육종암에 대한 항암효과가 보고된 이후, anti-HIV 활성, 항균작용, 항변이원성 작용 등이 광범위하게 보고되었다. 하지만 아직 까지도 각종 생리활성에 대한 차가버섯의 유효성분들이 불분명한 점들이 많은데, 주로 hispidin analogue 및 melanin 등의 많은 페놀성 화합물을 함유하며, 높은 항산화 활성을 나타낸다(Kazuo, 2003; Zheng et al., 2009).

이와 같이, 차가버섯의 각종 용매 추출물들은 페놀성 화합물 함량이 높고, 강한 항산화활성을 나타내므로, AChE 저해활성에 대한 검토의 필요성이 있다. 하지만 그동안 이의 관련 연구는 보고된 바 없고, 특히, AChE 저해활성에 대한 효소동역학적 및 열역학적 해석은 이루어진 바가 없다.

본 연구에서는 차가버섯의 자실체 및 액체배양 생성물 분획(균사체와 배양여액)의 용매추출 및 이의 산침전에 의한 총 24 종의 분획물을 조제하였다. 지금까지 보고된 바 없는 이들의 AChE 저해활성을 탐색하였으며, 동역학 및 열역학적 해석에 의해 이들의 저해기작을 규명하여 새로운 생물산업소재로서의 이용 가능성 자료를 마련하고 자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 사용한 재료는 *Inonotus obliquus*의 자실체와 균사체이다. 자실체는 시장에서 직접 구입하였고, 균사체는 다음과 같은 방법으로 얻었다. 즉, P.D.A.(potato dextrose agar) 평판배지에서 생육한 균사체를 직경 5 mm의 stainless steel pipe로 mycelium disk를 만든 다음, 이 disk 7-10개를 50 mL의 배지를 넣은 250 mL 삼각 플라스크에 접종하였다. 30°C에서 7 일간 배양한 다음, 다시 종균용 배지 50 mL을

함유한 250 mL의 삼각 플라스크에 5%(v/v)의 전배양액을 접종하였고, 30°C에서 10일간 진탕배양하였다. 이 때, 전배양액은 균질기(T25 Basis, IKA Labortechnik, Staufen, Germany)로 30초 동안 균질화시켜 본 배양의 접종용으로 사용하였고, 매 실험마다 새로이 배양하여 사용하였다. 본 배양 후 배양액은 10,000×g에서 15분간 원심분리(Super 25K, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Incheon, Korea)하였고, 상정액과 침전물로부터 각각 배양여액과 균사체를 얻었다. 배양여액은 액상 그대로 사용하였으며, 균사체는 filter paper (Advantec No.2, Toyo Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과한 다음, 증류수로 2-3 회 수세하였고, 70°C에서 24 시간 건조하여 건조균사체로 사용하였다.

용매추출 및 산침전

건조 균사체는 Fig. 1의 분획도에 따라 hot water(90°C), warm water(30°C), 80% ethanol, 80% methanol 및 80% acetone 등에 의해 24 시간 동안 추출하였으며, 배양여액은 80%의 ethanol, methanol, acetone 및 1 N HCl에 의한 침전 조작을 통하여 분획물을 조제하였다. 또한 자실체는 균사체와 동일한 추출조작으로 분획물을 조제하였으며, 이후 실험에서 액체배양 생성물과의 활성을 비교하였다.

용매 분획물의 중량은 rotary evaporator(Eyela Co., N-N-series, Tokyo, Japan)로 진공농축하여 건조중량법으로 측정하였으며, 각 용매별 분획물의 수율은 배양여액, 균사체 또는 자실체 고형분 중량당 각 분획물의 무게 백분율(%)로 계산하였다.

또, 각 분획물 중에서 산에 의한 침전 방법은 시료용액에 1 M HCl 용액을 첨가하여 pH 1-2가 되도록 하고, 그 침전을 원심 분리하여 산 침전물을 얻었다. 이 침전물을 소량의 증류수로 HCl 용액을 씻어낸 다음, 1-2 일간 투석(Sigma Cat# D7884, MWCO < 12,000, Sigma Co., St. Louis, USA)하였으며, 투석내액을 취하여 0.05 torr에서 24 시간 동안 동결건조한 다음, 부분 정제 시료로 사용하였다.

분석

Acetylcholinesterase(AChE)에 대한 저해활성은 Ellman et al.의 방법(1961)을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 50 mM 인산완충액(pH 8)에 녹아있는 0.2 mM의 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, Sigma Co., St. Louis, USA) 용액(1.5 mL)에 시료 분획물 0.2 mL와 5 mM의 acetylthiocholine iodide(Sigma Co., St. Louis, USA) 0.2 mL를 잘 혼합하여 효소 반응의 기질 용액으로 하였다. 기질 용액을 37°C에서 5 분간 incubation 한 뒤 37°C에서 pre-incubation한 2.6 g/mL의 acetylcholinesterase(EC 3.1.1.7, Sigma Co., St. Louis, USA) 용액 0.1 mL를 첨가하고 잘 혼합하여 분광광도계(Genesys 5, Milton Roy Spectronic, Rochester, NY, USA)로 412 nm에서 비색정량하여 측정하였다.

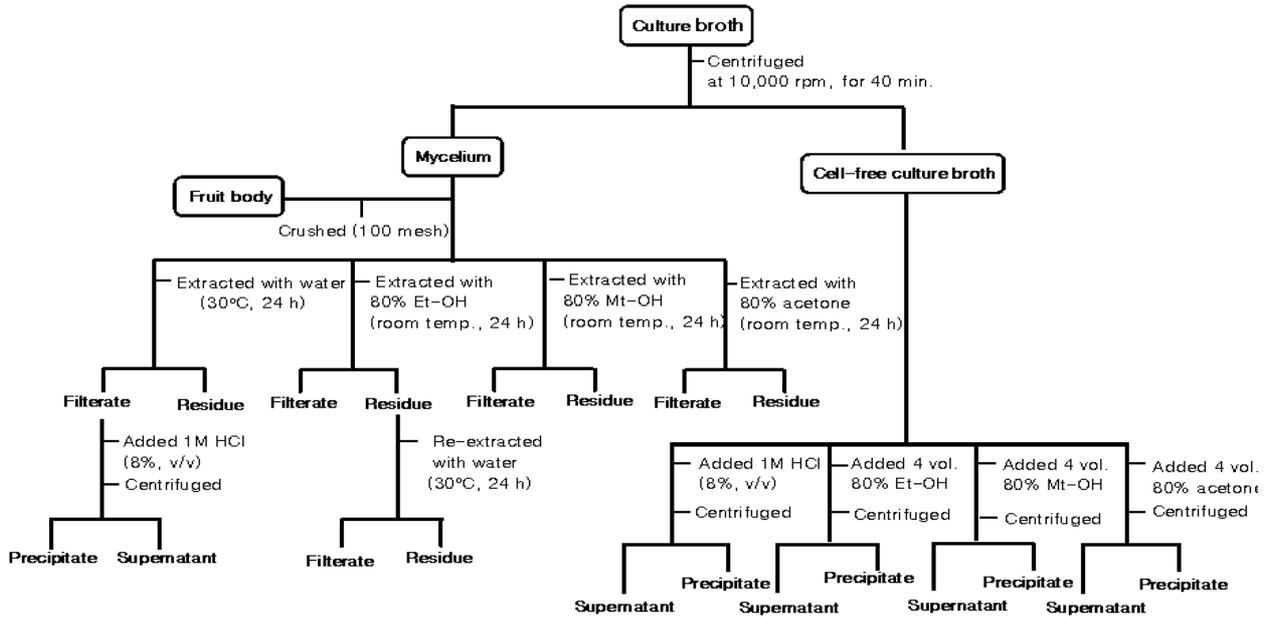


Fig. 1. Fractionation of fruit body, mycelium and cell-free culture broth from *Inonotus obliquus* by various solvents.

한편, 동역학적 특성은 기질 및 시료의 농도를 달리하고 초기속도(dA/min)를 측정하여 분석하였다. V_{max} 및 K_m 은 Lineweaver-Burk plot으로 구하였으며, K_i 값은 Lineweaver-Burk plot의 secondary re-plot에 의해 계산하였다. 또한, IC_{50} value는 Giacobini et al.의 방법(1997)에 의하여 $\text{Log}[V/(V_0 - V)]$ Vs. $\text{Log}[I_0]$ 로서 계산하였다.

한편, ΔG , ΔH , ΔH^* , E_a 및 ΔS 와 같은 열역학적 매개변수들은 Kamal et al.의 방법(2000)에 따라 dual substrate 및 dual temperature model로 실험하여 산출하였다. 즉, 20°C (moderate temperature; T_M)와 40°C(Higher temperature; T_H)의 두 가지 온도 조건 및 고농도(0.5 mM, Higher substrate concentration; HS)와 저농도(0.05 mM, Lower substrate concentration; LS)의 두 기질농도로 나누어 서로 다른 저해제 농도하의 AChE 활성을 측정하여 산출하였다.

Kamal et al.(2000)의 산출법에 따라 대조구 및 저해제 존재하의 K_{eq} 값은 각각 다음 식 (1) 및 (2)에 의해 구하였다.

$$K_{eq}(\text{for control}) = 1/K_m \tag{1}$$

$$K_{eq}(\text{in the presence of inhibitor}) = 1/K_m \times K_i \tag{2}$$

또, ΔG , ΔH 및 ΔS 의 열역학적 변수들은 각각 다음 식 (3), (4) 및 (5)에 의하여 구하였다.

$$\Delta G = -2.303RT \log k_{eg} \tag{3}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \tag{4}$$

$$\Delta H = 2.303R(\log K_{eqT_H} / \log K_{eqT_M}) (T_H \cdot T_M / T_H - T_M) \tag{5}$$

한편, 시료 무침가구(no inhibitor, control) 및 시료 첨가구에 대한 activation energy (E_a)는 각각 다음 식(6) 및 (7)로 계산하였다.

$$\log(K_m)_H / (K_m)_M = \frac{E_a}{2.303R} \frac{T_H - T_M}{T_H \cdot T_M} \tag{6}$$

$$\log(K_m \cdot K_i)_H / (K_m \cdot K_i)_M = \frac{E_a}{2.303R} \frac{T_H - T_M}{T_H \cdot T_M} \tag{7}$$

또, 활성화 엔탈피(ΔH^*)는 다음 식(8)에 의하여 계산하였다.

$$E_a = \Delta H^* + RT \tag{8}$$

결과 및 고찰

차가버섯 자실체 및 배양생성물 분획의 수율

차가버섯 자실체와 액체배양에 의한 균사체 및 배양여액의 3종 시료에 대해 유기용매에 의한 추출 및 산(1 N HCl) 침전으로 각각 8종씩 총 24종의 분획물을 조제하였으며(Fig. 1), 이들의 수율을 조사하여 Table 1에 나타내었다.

각 분획물의 수율은 서로 큰 차이를 보였으며, 시료 중 에 따른 수율은 대체로 배양여액(1.1-96.5%) > 균사체(1.9-50.1%) > 자실체(0.04-14.2%)의 순이었다. 또 시료 중에 상관없이 용매추출의 수율은 열수추출물에서 가장 높았고 이

Table 1. Yields of fractions obtained by various solvents.

Fractions	Yield (%)
Mycelium	
Water extract (30°C)	30.7±1.4
Hot water extract (100°C)	36.1±1.2
Ethanol extract	20.7±1.1
Methanol extract	17.4±0.9
Acetone extract	22.5±0.9
Water extract after ethanol extraction	50.1±2.6
Acid precipitate after water extraction	24.4±1.1
Supernatant after acid precipitation	1.9±0.01
Cell-free broth (freeze dried)	
Acid precipitate	96.5±1.6
Supernatant of acid precipitation	1.1±0.01
Ethanol precipitate	49.5±2.1
Supernatant of ethanol precipitation	57.7±1.9
Methanol precipitate	29.1±1.0
Supernatant of methanol precipitation	75.4±2.2
Acetone precipitate	61.4±1.6
Supernatant of acetone precipitation	37.6±1.0
Fruit body	
Water extract (30°C)	13.8±0.9
Hot water extract (100°C)	14.2±1.0
Ethanol extract	0.5±0.03
Methanol extract	0.5±0.01
Acetone extract	1.1±0.02
Water extract after ethanol extraction	10.6±0.6
Acid precipitate after water extraction	13.3±0.5
Supernatant after acid precipitation	0.04±0.0

어서 acetone, EtOH 및 MetOH 등의 유기용매순이었다.

전반적으로 배양여액 분획의 수율이 높았는데, 특히 배양여액의 산침전물은 24 종 분획물 중 가장 높은 수율을 나타내었으며, 그 값은 배양여액 건조중량당 백분율(%)로 96.5%의 매우 높은 값이었다.

각 분획물의 acetylcholinesterase 저해활성 동역학

각 분획물들의 AChE 저해활성을 알아보기 위해 Ellman et al.의 방법(1961)에 의하여 저해활성을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다.

각 분획물의 농도를 0.4 mg/mL로 하여 측정한 결과에서는 산침전물 분획에서 가장 높은 저해활성을 나타내었는데, 균사체의 경우는 물추출 후의 산침전물 분획에서 가장 높았지만 저해율은 10%에 불과하였다. 반면, 배양여액의 산침전물 및 자실체의 열수추출 후 산침전물 분획에서는 저해율이 각각 21.4% 및 24.7%로 시료들 중 가장 높은 저해율을 나타내었다.

한편, 가장 높은 저해율을 나타낸 배양여액의 산침전물과 자실체 열수추출후의 산침전물 분획의 AChE 저해활성

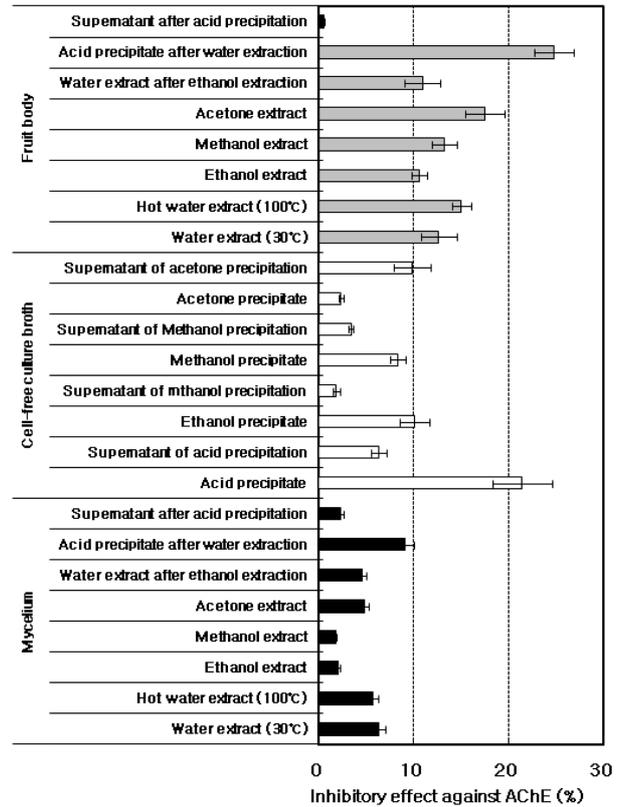


Fig. 2. Screening data for inhibition effect of fractions obtained by various solvents on AChE activity from *Inonotus obliquus*. Concentration of each fraction was 0.4 mg/mL.

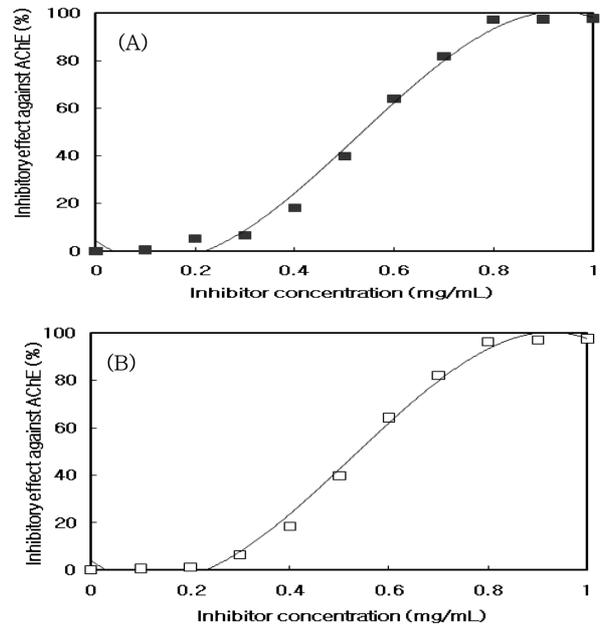


Fig. 3. Dose-dependent inhibitory effect of AChE activity by acid precipitate of cell-free broth (A) and acid precipitate of fruit body (B). The inhibition efficacy was expressed as an inhibition percentage of enzyme activity compared with the control value (100%).

에 미치는 농도의 영향을 살펴본 결과는 Fig. 3과 같다.

AChE 저해활성은 농도증가에 따라 증가하는 농도의존성을 나타내었으며, 두 시료 모두 0.8 mg/mL의 농도에서 거의 100%의 매우 우수한 저해활성을 나타내었다.

또, 이 자료로부터 Giacobini(1997)의 방법에 따라 $\log[v/(v_0 - v)]$ vs. $\log[I_0]$ 를 도시하여 50% 효소활성 저해농도인 IC_{50} 값을 구한 결과, 시료간의 차이없이 두 시료 모두 0.53 mg/mL의 IC_{50} 값을 나타내었다. 이 값은 노루궁뎅이버섯의 자실체와 균사체 열수추출물 및 배양여액의 경우 IC_{50} 값이 3.5-5.26 mg/mL이었다는 보고 및 10 mg/mL의 농도에서 저해율이 75-85%이었다는 보고(Jung & Lee, 2007)와 비교하면 IC_{50} 값은 약 7-10 배나 낮은 값이고, 저해율은 12배나 낮은 농도인 0.8 mg/mL에서 100%의 저해율을 나타내므로, 본 시료가 추출물 시료임을 고려할 때 AChE 저해활성의 효능이 매우 우수한 것으로 판단되었다.

한편, 이 두 시료의 시료간 차이가 없었으므로 배양여액의 산침전물에 대해 기질의 농도와 저해제의 농도를 달리 하여 Lineweaver-Burk plot으로 도시하였으며, 그 결과는 Fig. 4와 같다.

배양여액의 산침전물 분획의 농도가 증가함에 따라 기울기가 크게 증가하였고, 절편값도 다소 증가하였으며, 각 직선의 교점이 x축상에 존재하지 않아 일반적 비경쟁 저해 (general non-competitive or mixed type inhibition)의 양상을 나타내었다. 또 이는 그림내의 기질-속도간의 관계에서 보는 바와 같이, 저해제농도에 따른 각 최대반응속도는 저해제가 없는 경우보다 낮아져 비경쟁적 저해양상의 경향과 잘 일치하였다. 또, 고농도(> 0.4 mg/mL)에서는 기질저해현상을 보였다. 현재 널리 이용되는 AChE 저해제인 galantamin이나 rivastigmine이 경쟁적 저해양상을 보이는 것으로

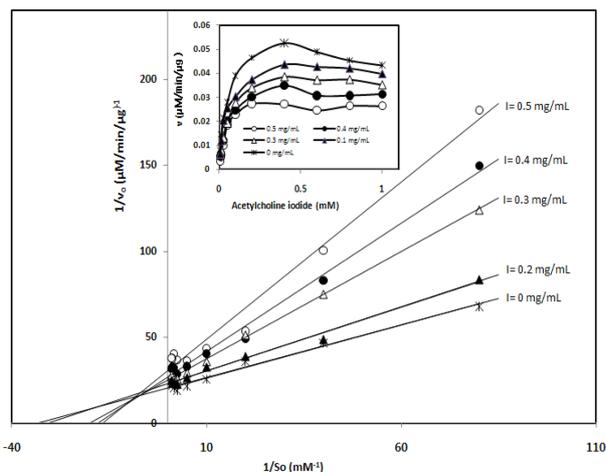


Fig. 4. Lineweaver-Burk plots of AChE as a function of substrate concentration in the presence of inhibitor for acid precipitate of cell-free culture broth. Inset represents initial AChE velocity Vs. various concentrations of acetylcholine iodide.

보고되었지만(Štěpánková & Komers, 2008; Zdražilová et al., 2006), 나머지 대부분의 경우는 비경쟁적 저해로 보고되었다(Cummings, 2000). 또, 배양여액의 산침전물에 대해 Lineweaver-Burk plot의 기울기값 및 절편값을 저해제 농도에 대해 재도시하고 저해제 상수값인 K_{IE} 및 K_{IES} 값을 조사한 결과, 각각 0.23 mg/mL 및 1.15 mg/mL이었다(Fig. 5). 따라서 저해제는 유리효소 또는 효소-기질 복합체와 결합하지만, 유리효소에의 친화력이 결합효소보다 약 5배나 더 큰 것으로 나타났다. 자료로 나타내지는 않았으나 자실체 열수추출후의 산침전물 분획도 거의 동일하여 두 시료의 저해활성을 나타내는 유효물질은 서로 동일한 것으로 생각되었다.

활성 분획물의 acetylcholinesterase 저해활성의 열역학적 해석

AChE 저해활성이 우수한 배양여액의 산침전물 및 자실체 열수추출 후의 산침전물 분획의 ΔG , Ea , ΔH , ΔS 및 ΔH^* 와 같은 열역학적 변수를 측정하기 위하여 dual substrate & temperature model(Kamal et al., 2000)에 의해 저

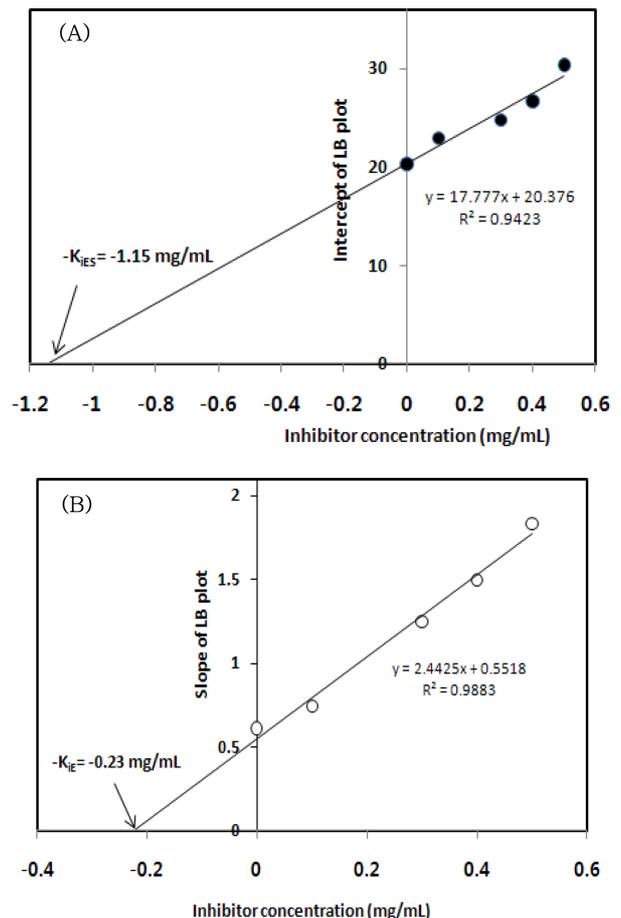


Fig. 5. The secondary replots of the Lineweaver-Burk plots. Intercept (A) and slope (B) of LB plot vs. concentration of inhibitor for determination of inhibition constants.

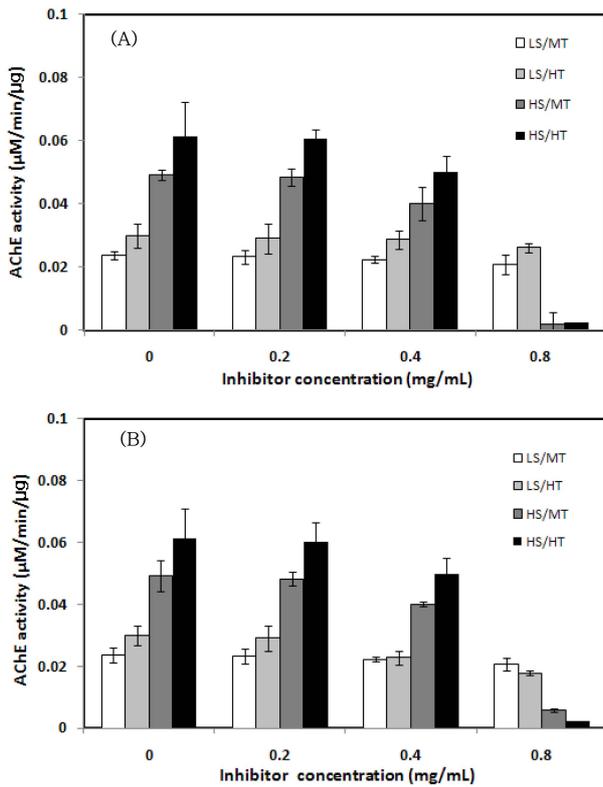


Fig. 6. Activity of AChE in the absence and presence of acid precipitate of cell-free culture broth (A) and acid precipitate of fruit body (B) at dual temperatures (20°C;40°C) under dual substrates conditions (0.05 mM; 0.5 mM). H, M and L mean higher, moderate and lower, respectively, while S and T mean substrate and temperature, respectively.

해제의 농도를 달리하고 효소의 활성을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 6과 같다.

기질의 농도가 높을수록, 그리고 온도가 높을수록 더 높은 효소 활성을 나타내었으며, 저해제로서 배양여액 산침전물의 농도를 증가시킬수록 효소의 활성은 감소하는 경향

을 나타내어 Fig. 4의 결과와 잘 일치하였다. 특히, 고농도 기질에서의 높은 저해율은 역시 Fig. 4의 기질-속도관계에서 볼 수 있는 바와 같이 고농도기질에서 기질저해를 동반하기 때문이라 생각된다.

Fig. 4의 자료를 이용하여 Al-Jafari et al.(1997)의 식에 의해 얻은 Michaelis-Menten 상수(K_m) 및 maximum velocity (V_{max})는 Table 2와 같다. Incubation 온도 및 저해제의 농도가 증가할수록 K_m 값은 상승하였으며, V_{max} 값은 감소하였다. 이는 고온에서 저해제의 농도가 증가함에 따라 효소와 기질의 친화도(affinity)가 감소함을 의미한다. 또, Table 2의 결과를 Kamal 등(2000)의 방법에 따라 ΔG , ΔH , ΔS , E_a 및 ΔH^* 와 같은 열역학적 변수들을 산출한 결과는 Table 3과 같다.

본 산침전물 시료는 AChE에 대하여 ΔG , ΔH^* 및 E_a 의 값을 각각 2.6 배, 3.8 배 및 3.6 배 상승시켰으며, ΔS 값에 대하여서는 약 13 배의 감소효과를 나타내었다. 이러한 경향은 AChE의 비경쟁 저해제로 널리 알려진 tacrine이나 cyclophosphamide의 보고와 유사하였다(Kamal et al., 2000; Kamal, 1997; Al-Jafari et al., 1997).

ΔH^* (heat of activation)의 증가는 전이상태의 형성 중 화학결합의 신장, 압착 및 및 파괴 등이 일어났음을 의미하며, 전이상태 존재의 고유 확률의 척도인 ΔS 의 현저한 증가는 산침전물이 AChE 구조의 현저한 무질서화를 유도하였음을 의미한다. 또 활성화에너지(E_a)는 촉매반응 중 극복되어야 하는 열역학적 장벽의 척도로, 이의 증가는 AChE-Acetylthiocholine iodide complex의 열역학적 에너지 장벽을 증가시킴을 의미한다(Kamal et al., 2000; Kamal, 1997).

따라서 이들 열역학적 매개 변수를 증가시킨 것은 Kamal et al.의 보고(2000)에 기초할 때 저해제로서 배양여액의 산침전물 및 자실체 열수추출 후의 산 침전물이 AChE의 열역학적 barrier를 상승시켜 ES complex로의 전환을 어렵게 만들며, 이에 따라 생성물의 생성을 저해하는

Table 2. Michealis-Menten constant and maximum velocity for AChE in the absence and presence of acid precipitate of cell-free broth (top) and acid precipitate of fruit body (bottom) at dual temperatures and substrates conditions.

Temperature	20°C				40°C			
Inhibitor conc. (mg/mL)	0	0.2	0.4	0.8	0	0.2	0.4	0.8
$K_m^{a)}$ (mM)	0.0361	0.0414	0.0632	0.1043	0.0452	0.0463	0.0631	0.0690
$V_{max}^{b)}$ (µM/min/µg)	0.0527	0.0485	0.0456	0.0324	0.0670	0.0615	0.0487	0.0363

Temperature	20°C				40°C			
Inhibitor conc. (mg/mL)	0	0.2	0.4	0.8	0	0.2	0.4	0.8
K_m (mM)	0.0361	0.0390	0.0620	0.1030	0.0452	0.0440	0.0620	0.0701
V_{max} (µM/min/µg)	0.0513	0.0454	0.0433	0.0313	0.0670	0.0620	0.0459	0.0361

a,b) K_m and V_{max} values were determined according to the following equations (Al-Jafari et al., 1997):

$$K_m = \left[\frac{(s_1/v_1)(s_2 - s_1)}{(s_2/v_2) - (s_1/v_1)} \right] - s_1$$

$$V_{max} = 1 / \left\{ (s_2/v_2) - (s_1/v_1)/(s_2 - s_1) \right\}$$

In the above equation, s_1 is the lower (0.05 mM) and s_2 is higher (0.5 mM) substrate concentration, and v_1 and v_2 are the initial velocities at the respective substrate concentration.

Table 3. Comparative data of energetic parameters for AChE inhibition by acid precipitates of cell-free broth and fruit body.

Thermodynamic parameters	Control (No inhibitor)	Acid precipitate of cell-free broth	Acid precipitate of fruit body
ΔG (kcal/mg/L)	1.35	3.50	3.50
Ea (kcal/mg/L)	8.43	30.35	30.34
ΔH (-kcal/mg/L)	0.84	13.12	13.22
ΔS (entropy unit)	0.80×10 ⁻³	0.61×10 ⁻⁴	0.62×10 ⁻⁴
ΔH* (kcal/mg/L)	7.89	29.86	29.80

것으로 볼 수 있었다.

이상으로부터 차가버섯의 산침전물 분획은 높은 AChE 저해활성을 나타내며, 저해기작은 기질과 비경쟁적으로 ES complex로의 전환을 어렵게 하거나 전환과정을 저해하여 AChE의 활성을 저해하는 것으로 생각되었다. 차후 이 산 침전물에 대한 동정 및 *in vivo* 실험의 필요성이 매우 충분한 것으로 판단된다.

결 론

차가버섯(*Inonotus obliquus*)의 자실체 및 액체배양을 통하여 얻은 배양 생성물 (균사체 및 배양여액)의 여러 가지 유기용매 분획물들을 조제하여 AChE 저해 활성의 생물활성을 조사하였다.

배양 여액으로부터 색소물질을 분리하기 위한 방법으로는 배양 여액에 1 M HCl을 8-10% 첨가하였을 때, 색소물질이 가장 잘 분리되었으며, 이때의 pH는 1-2 범위이었다. 분획물 중 항산화 활성이 뛰어났던 배양여액 및 자실체의 열수추출 후 산 침전물의 수율은 배양여액 및 자실체의 고형분 중량 당 각각 96.5% 및 13.8% (w/w)이었다. 각 용매별 분획물의 AChE에 대한 저해활성을 측정된 결과, 배양여액 및 자실체 열수추출 후의 산 침전물에서 가장 높은 AChE 저해활성을 나타내었으며, 0.8 mg/mL 농도에서 거의 100% 저해활성을 보였다. 다. 두 시료의 IC₅₀ 값은 둘 다 0.53 mg/mL로서 차이를 보이지 않았으며, 일반적 비경쟁 저해양상(General non-competitive inhibition pattern)을 나타내었다. 한편, energetic parameter들을 측정된 결과, 배양여액 및 자실체 산 침전물은 열역학적 에너지 장벽을 상승시킴으로써 ES 복합체로의 전환을 어렵게 하고 생성물의 생성을 저해하는 것으로 생각되었다.

참고문헌

Al-Jafari AA, Kamal MA, Alhomida AS. 1997. Thermodynamic investigation of camel retina acetylcholinesterase inhibition by cyclophosphamide. *J. Enz. Inhibit.* 11: 275-283.
 Bray HG, Thrope WV. 1954. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. In: *Method in Biochemical Analysis* (D. Glich ed.), John Wiley, New York, USA.
 Brühlmann C, Marston A, Hostettmann K, Carrupt PA, Testa B. 2004.

Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. *Chem. Biodivers.* 1: 819-829.
 Cummings JL. 2000. Cholinesterase inhibitors: A new class of psychotropic compounds. *Am. J. Psychiatry* 157(1): 4-15.
 Doulgeraki A, Papadoulou DZ, Tsakiris S. 2002. Effects of L-phenylalanine on acetylcholinesterase and Na⁺, K⁺-ATPase activities in suckling rat frontal cortex, hypovampus and hyposalamus. *Verlag, der Zeitschrift, für Naturforschung.* Tübingen 57: 182-185.
 Dunbar F, Zhu Y, Brashear HR. 2006. Post hoc comparison of daily rates of nausea and vomiting with once-and twice daily galantamine from a double-blind, placebo-controlled, parallel-group, 6-month study. *Clin. Ther.* 28: 365-372.
 Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr, Freatherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
 Ezio GL. 1998. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer disease therapy: from tacrine future application. *Neurochem. Int.* 32: 413-419.
 Giacobini E. 1997. From molecular structure to Alzheimer therapy. *Jpn. J. Pharmacol.* 74: 225-241.
 Heo HJ, Hong SC, Cho HY, Hong BS, Kim HK, Kim EK, Shin DH. 2002. Inhibitory effect of zeatin, isolated from *Fiatoua villosa* on acetylcholinesterase activity from PC12 cells. *Mol. Cells* 13: 113-117.
 Ji HF, HY Zhang. 2008. Multipotent natural agents to combat Alzheimer's disease. *Functional spectrum and structural features.* *Acta Pharmacol. Sin.* 29(2): 143-151.
 Jung JH, Lee SY. 2007. AChE inhibitory effect and antioxidative activity of submerged cultured products from *Hericium erinaceum*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 22(1): 30-36.
 Kahlos K, Kangas L, Hiltunen R. 1986. Antitumor tests of inotodiol from the fungus *Inonotus obliquus*. *Acta Pharmaceutica Fennica* 95:173-177.
 Kamal MA. 1997. Dual temperature model for the estimation of energetics parameters for acetylcholinesterase inhibition by cyclophosphamide. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43(3): 571-581.
 Kamal MA, Aihomida AS, Al-Rajhi AA, Al-Jafari AA. 2000. Thermodynamic analysis of human retinal acetylcholinesterase inhibition using an anti-Alzheimer's drug, tacrine, through the development of a dual substrate and temperature model. *Proc. Natl. Sci. Counc.* 3:108-115.
 Kazuo S. 2003. Preventive and therapeutic agents for microbe-related syndromes including HIV. US patent NO. 0030161841.
 Kawagishi H, Ando M, Shinba K, Sakamoto H, Yoshida S, Ojima F, Ishiguro Y, Ukai N, Furukawa S. 1993. Chromans, hericenones F, G and H from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Phytochem.* 32: 175-178.
 Kawagishi H, Shimada A, Shirai R, Okamoto K, Ojima F, Sakamoto H, Ishiguro Y, Furukawa S. 1994. Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.* 35: 1569 - 1572.
 Kawagishi H, Simada A, Shizuki K, Mori H, Sakamoto H, Furukawa

- S. 1996. Erinacines E, F, and G, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.* 41: 7399-7402.
- Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 14: 289-300.
- Nordmeyer D, Dickson DW. 1991. Biological activity and acetylcholinesterase inhibition by nonfumigant nematicides and their degradation products on *Meloidogyne incognita*, *Revue Nematol.* 14: 517-524.
- Rao MS, Dasgupta DR. 1991. Purification of the enzyme acetylcholinesterase (AChE. 3.1.1.7) from the *Meloidogyne incognita* and *Heterodera zea*. *Revue Nematol.* 14(4): 517-524.
- Štěpánková S, Komers K. 2008. Cholinesterases and cholinesterase Inhibitors. *Current Enzyme Inhibition* 4: 160-171.
- Tsakiris S, Schulpis KH. 2003. Alanine reverses inhibitory effect of phenylalanine on acetylcholinesterase activity. *Z. Naturforsch.* 57: 506-511.
- Wetwitayaklung P, Limmatvapirat C, Phacechamud T, Keokitichai S. 2007. Kinetics of acetylcholinesterase inhibition of *Quisqualis indica* Linn. flower extract. *Silpakorn Univ. Sci. Tech. J.* 1(2): 20-28.
- Wolf-Klein G, Pekmezaris R, Chin L, Weiner J. 2007. Conceptualizing Alzheimer's disease as a terminal medical illness. *Am. J. Hosp. Palliat. Care* 24: 77-82.
- Zheng W, Zhang M, Zhao Y, Wang Y, Miao K, Wei Z. 2009. Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of *Inonotus obliquus*. *Bioresource Technol.* 100: 1327-1335.
- Zdrzilová P, Štěpánková S, Komersová A, Vránová M, Komers K, Čegan A. 2006. Kinetics of 13 new cholinesterase inhibitors. *Z. Naturforsch.* 61c: 611-617.