

칠갑산 야생버섯 추출물로부터 혈전용해효소의 활성 검색

김준호* · 유관희¹ · 석순자² · 김양섭²

상지대학교 이공과대학 화학과, ¹상지대학교 이공과대학 생명과학과, ²농촌진흥청 농업과학기술원

Screening of Fibrinolytic Activities of Extracts from Wild Mushrooms Collected in Mt. Chilgap of Korea

Jun-Ho Kim*, Kwan-Hee Yoo¹, Soon-Ja Seok² and Yang-Sup Kim²

Department of Chemistry, ¹Department of Life Science, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

²National Agricultural Science and Technology Institute, RDA, Suwon 441-707, Korea

(Received January 20, 2005)

ABSTRACT: Extracts of 67 wild mushrooms were tested for their fibrinolytic activities. The extract of *Marasmius pulcherripes* showed 112% higher increased activity as compared with a positive control, plasmin (0.75 U/ml). *Helvella elastica* and *Psathyrella* sp. showed 60% and 49% of activities to that of plasmin, respectively. Three mushrooms such as *Lepista sordida*, *Fomitella fraxinea*, and *Leucoagaricus rubrotinctus* showed 40% of plasmin activity. The other 60 mushroom extracts did not show any fibrinolytic activity.

KEYWORDS: Fibrin plate assay, Fibrinolytic activity, *Marasmius pulcherripes*, Wild mushroom

최근 의학계는 대체의학에 관한 관심이 증가하고 있다. 기존의 약품개발은 미생물이나 제한된 천연물에서 검색하였으나 한계가 있어 새로운 분야의 물질로부터 유효성분을 분리하는데 많은 관심을 가지고 있다. 그 중 하나가 식품이나 식품 가능한 천연물로부터 생리활성물질을 탐색하려는 시도인데 식품은 반복해서 장시간 섭취하기 때문에 유효성분이 미량이라 하더라도 항상 공급됨으로써 큰 효과를 얻을 수 있기 때문이다.

버섯은 다양한 종류의 성분을 함유하고 있어 오래 전부터 식용과 약용으로 사용되어 왔다.

국내에는 약 1,500여종의 버섯이 존재하는데 이 중 약 400여종이 식용가능하며 약 100종이 약용 가능한 것으로 알려져 있다(안, 1992). 버섯은 암(김 등, 1983), 뇌졸중(정, 1998), 심장병(정, 1998) 등 성인병 예방에 효과가 높은 것으로 평가되고 있으며 또한 혈관계 질환의 원인 중 하나인 혈전의 주 성분인 섬유소를 분해하는 성분도 함유하고 있는 것으로 알려져 있어 혈관계 질환의 예방뿐 아니라 치료에도 효과가 있을 것으로 예상 된다(Gavrilova and Falina, 1975).

혈전은 혈관 내 상처 복구 시 지혈과정에서 트롬빈에 의해 섬유소원으로부터 생긴 섬유소와 혈소판의 응집체로 형성된다. 정상적인 경우 내피세포로부터 생긴 프라즈미노겐 활성화제(plasminogen activator)의 작용에 의해

plasminogen으로부터 생긴 plasmin에 의해 형성된 혈전이 용해되어 혈관내에 응고체와 용해체계가 평형을 이룬다. 그러나 지혈과정에서 혈액응고가 과다하게 진행되어 생긴 혈전은 plasmin에 의해 완전한 용해가 일어나지 않아, 이 작은 혈전들이 혈관을 따라 흐르며 혈관계 질환을 유발한다. 이 혈전을 용해시키기 위해서 혈전 용해제를 사용해야 하는데 기존에 사용되고 있는 혈전 용해제들은 가격이 비싸며 혈전에 대한 선택성이 낮아 여러 가지 부작용을 초래하고 있어 혈전만을 선택적으로 제거하는 새로운 혈전 용해제의 개발이 필요하게 되었다. 근래에 혈전과 섬유소원을 직접 용해하는 효소를 뱀독(Chung and Kim, 1992)과 지렁이(Park et al., 1998)로부터 분리 정제 하였다는 보고와 함께 발효식품인 청국장(Kim et al., 1995), 된장(김, 1998), 젓갈(Kim et al., 1997)로부터 혈전용해물질을 만들어내는 균주를 분리하고 그들이 생산한 혈전용해 효소의 분리 정제에 관한보고도 있었다. 본 연구에서는 많은 종류의 생리활성 물질을 포함하고 있는 야생버섯으로부터 혈전용해물질을 찾고자 하였다.

식용버섯인 *Flammulina velutipes*에 섬유소(fibrin)를 분해하는 단백질 분해효소가 있다는 Gavrilova 등의 보고(Gavrilova and Falina, 1975) 이후 팽이버섯(Shin and Choi, 1998), 뽕나무버섯(김 · 김, 1998; Kim and Kim, 1999)과 할미송이버섯(김, 2000)으로부터 혈전용해 물질의 분리 정제에 관한보고 이외에는 거의 발표되어 있지 않아, 많은 야생버섯으로부터 혈전용해물질의 개발에 관

*Corresponding author <E-mail: jhokim@mail.sangji.ac.kr>

Table 1. Mushroom samples used for the screening of fibrinolytic activity

Family	Scientific name	Korean name
Agaricales(주름버섯목)		
Agaricaceae(주름버섯과)	<i>Agaricus plaecloaresquamosus</i>	노란대주름버섯
	<i>Agaricus</i> sp.	
	<i>Lepiota cristata</i>	갈색고리갯버섯
	<i>Lepiota</i> sp.	
	<i>Leucoagaricus rubrotinctus</i>	돌여우버섯
Amanitaceae(광대버섯과)	<i>Amanita ceciliae</i>	점박이광대버섯
	<i>Amanita pantherina</i>	마귀광대버섯
	<i>Amanita rubescens</i>	붉은점박이광대버섯
	<i>Amanita subjunquillea</i>	개나리광대버섯
	<i>Amanita vaginata</i>	등황색주머니우산버섯
	<i>Amanita verna</i>	흰알광대버섯
	<i>Amanita volvata</i>	큰주머니광대버섯
Boletaceae(그물버섯과)	<i>Boletus auripes</i>	수원그물버섯
	<i>Boletus reticulatus</i>	
	<i>Boletus</i> sp.	
	<i>Leccinum hortonii</i>	홀트겉겉이그물버섯
	<i>Leccinum rugosiceps</i>	붉은갯겉겉이그물버섯
	<i>Phylloporus bellus</i>	노란길민그물버섯
	<i>Pulveroboletus ravenelii</i>	갯그물버섯
	<i>Suillus granulatus</i>	젓비단그물버섯
	<i>Tylopilus neofelleus</i>	제주쓴맛그물버섯
	<i>Tylopilus</i> sp.	쓴맛그물버섯속
	<i>Xanthoconium affine</i>	황금씨 그물버섯
	<i>Xerocomus parvulus</i>	칠갑산그물버섯
	<i>Xerocomus</i> sp.	
Coprinaceae(먹물버섯과)	<i>Coprinus echinosporus</i>	멍게먹물버섯
	<i>Psathyrella candolleana</i>	죽제비눈물버섯
	<i>Psathyrella</i> sp.	
Cortinariaceae(끈적버섯과)	<i>Cortinarius salor</i>	푸른끈적버섯
	<i>Cortinarius</i> sp.	
	<i>Hebeloma</i> sp.	
	<i>Inocybe asterospora</i>	삿갓땀버섯
	<i>Inocybe</i> sp.	
Pluteaceae(난버섯과)	<i>Pluteus aurantiorugosus</i>	빨간난버섯
	<i>Pluteus</i> sp.	
Russulaceae(무당버섯과)	<i>Lactarius subzonarius</i>	당귀젓버섯
	<i>Lactarius volemus</i>	젓버섯
	<i>Lactarius</i> sp.	
	<i>Russula alboareolata</i>	흰둘레무당버섯
	<i>Russula foetens</i>	갈대기무당버섯
	<i>Russula sororia</i>	회갈색무당버섯
	<i>Russula</i> sp.	
Strobilomycetaceae(귀신그물버섯과)	<i>Boletellus shichianus</i>	석류밤그물버섯
	<i>Strobilomyces confusus</i>	솔방울귀신그물버섯
Strophariaceae(독청버섯과)	<i>Pholiola highlandensis</i>	재비늘버섯
Tricholomataceae(송이과)	<i>Collybia butyracea</i>	버터애기버섯
	<i>Collybia</i> sp.	
	<i>Laccaria vinaceoavellanea</i>	색시줄각버섯
	<i>Lepista sordida</i>	자주방망이버섯아재비
	<i>Marasmiellus</i> sp.	
	<i>Marasmius pulcherripes</i>	종이꽃낙엽버섯
	<i>Marasmius</i> sp.	
	<i>Mycena</i> sp.	
	<i>Omphalina epichysium</i>	제주솔밭버섯
	<i>Oudemansiella pudens</i>	털긴뿌리버섯
	<i>Oudemansiella</i> sp.	

Table 1. Continued

Family	Scientific name	Korean name
Aphylllophorales(민주름버섯목)		
Cantharellaceae(피꼬리버섯과)	<i>Cantharellus cinereus</i>	회색나팔피꼬리버섯
Ganodermataceae(불로초과)	<i>Ganoderma lucidum</i>	불로초
Hymenochaetaceae(소나무 비늘버섯과)		
	<i>Coltricia cinnamomea</i>	톱니겨우살이버섯
Polyporaceae(구멍장이버섯과)	<i>Fomitella fraxinea</i>	장수버섯
	<i>Microporus affinis</i>	매꽃버섯부치
	<i>Polyporellus varius</i>	노란대겨울우산버섯
Gasteromycetes(복균목)		
Clathraceae(바구니버섯과)	<i>Pseudocolus schellenbergiae</i>	세발버섯
Phallaceae(말뚝버섯과)	<i>Phallus rugulosus</i>	붉은말뚝버섯
Sclerodermataceae(어리알버섯과)	<i>Scleroderma</i> sp.	
Ascomycotina(자낭균아문)		
Sarcoscyphaceae(술잔버섯과)	<i>Microstoma floccose</i>	작은입술잔버섯
Helvellaceae(안장버섯과)	<i>Helvella elastica</i>	긴대안장버섯

한 체계적인 연구가 필요하게 되었다. 이에 따라, 혈전 용해 물질을 버섯으로부터 탐색하여 새로운 혈전용해제 개발을 위한 기초 자료로 사용하기 위해 치악산에 자생하는 65종의 야생버섯 추출물로부터 fibrin 분해 활성을 검색하여 발표한바 있지만(김 등, 1998), 좀더 많은 야생버섯의 활성을 탐색하기위해 칠갑산에 자생하는 야생버섯 67종으로부터 fibrin 분해활성을 검색하였다.

실험에 사용한 버섯시료(자실체)는 2001년 7월 10, 11 일에 충청남도 칠갑산에서 채집하여 분류 동정한 다음 시료로 사용하였으며(Table 1), 시료 처리 시 모든 작업은 4°C에서 행하였다. 채집한 버섯 약 10 g를 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)에 넣고 homogenizer로 잘게 부순 후 gauze로 걸러낸 용액을 4°C, 10000×g에서 60분간 원심분리 한 후 용액의 농도를 2.2 mg/ml로 맞추고 시료로 사용하였다. 단백질의 농도는 Lowry법(Lowry et al., 1951)을 이용하여 측정하였으며, bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다. Fibrin 분해활성의 측정(Fibrin plate assay)은 Haverkate-Trass의 fibrin plate법(Haverkate and Trass, 1974)에 따라 2% gelatin용액에 녹인 0.7%(W/V) fibrinogen 용액 10 ml와 0.05 M Barbitol 완충용액(pH 7.5)에 녹인 thrombin(100 NIH units) 50 µl을 잘 섞은 후 이를 Petri dish에 부어 fibrin 막을 만든 다음 시료로 처리된 용액을 20 µl씩 fibrin plate 위에 점적한 후 36°C에서 8시간 방치하고 fibrin막이 용해되면 용해면적을 측정하여 활성을 비교하였다. 대조구로는 혈전용해효소인 plasmin(0.75 U/ml)을 사용하였으며, 다음과 같은 방법으로 혈전용해활성을 산출하였다.

Fibrin 분해활성(%)

$$= (\text{시료의 용액면적} / \text{plasmin의 용해면적}) \times 100$$

Fibrin 분해활성을 검색한 결과 Table 2와 같이 총 67개의 야생버섯 시료 중에서 7개의 시료가 활성을 보였다. 주름버섯과의 *Leucoagaricus rubrotinctus*(둘여우버섯)는

Table 2. Extracts of mushrooms showing fibrinolytic activities

Mushroom	Fibrinolytic activity (%) ^a
Agaricaceae	<i>Leucoagaricus rubrotinctus</i> 39
Coprinaceae	<i>Psathyrella</i> sp. 49
Tricholomataceae	<i>Lepista sordida</i> 41
	<i>Marasmius pulcherripes</i> 112
	<i>Oudemansiella</i> sp. 26
Polyporaceae	<i>Fomitella fraxinea</i> 40
Helvellaceae	<i>Helvella elastica</i> 60
Plasmin (0.75 unit) 100	

^aFibrinolytic activity (%) = (lysed area of test solution / lysed area of control) × 100.

plasmin 0.75 unit의 39%에 해당하는 fibrin 분해활성을 나타냈고(Fig. 1), 먹물버섯과의 *Psathyrella* sp.는 49%의 활성을 나타냈다. 송이버섯과의 *Lepista sordida*(자주방망이버섯아재비), *Marasmius pulcherripes*(종이꽃낙엽버섯), *Oudemansiella* sp.는 각각 plasmin 0.75 unit의 41%, 112%, 26%의 활성을 나타냈다. 또한 구멍장이버섯과의 *Fomitella fraxinea*(장수버섯)은 40%의 fibrin 분해활성을 나타냈고 안장버섯과의 *Helvella elastica*(긴대안장버섯)는 60%의 활성을 나타냈다. 그러나 광대버섯과, 그물버섯과, 끈적버섯과, 난버섯과, 무당버섯과, 귀신그물버섯과, 독청버섯과, 피꼬리버섯과, 불로초과, 소나무비늘버섯과, 바구니버섯과, 말뚝버섯과, 어리알버섯과, 붉은목이과 및 술잔버섯과의 버섯은 모두 활성을 나타내지 않았다.

활성을 보이는 7종의 버섯 중에서 송이과 버섯이 3종으로 가장 많았고 또한 활성도 가장 커 송이과 버섯이 혈전용해 효소 함유비율이 높은 것으로 나타났다. 지금까지 혈전용해 효소와 관련해 발표된 버섯 중 쓴송이버섯, 뽕나무버섯, 할미송이버섯은 야생버섯이었지만, 대부분의 다른 버섯은 주로 재배된 버섯들이었다. *M. pulcherripes* 추출액의 비활성(0.38 U/mg)은 쓴송이버섯(0.81 U/mg), 할미송이버섯(0.95 U/mg)보다는 작은 활성을 나타냈지만

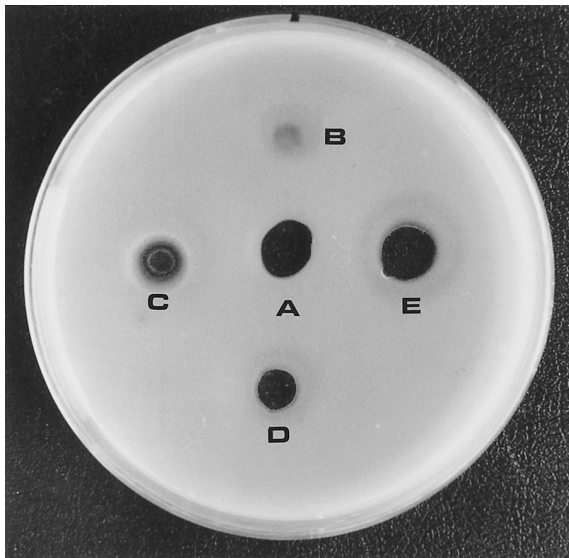


Fig. 1. Fibrinolytic activity of mushroom extracts and plasmin (A: plasmin (0.75 U/ml), B: *Oudemansiella* sp., C: *Helvella elastica*, D: *Psathyrella* sp., E: *Marasmius pulcherripes*).

팽나무버섯(0.17 U/mg)의 경우나 발효식품인 청국장(Kim *et al.*, 1995), 된장(김, 1998), 젓갈(Kim *et al.*, 1997) 등의 경우보다는 큰 활성을 나타냈다. *M. pulcherripes*는 여름에 구과식물 주변에 군생적으로 생장하며, 갓의 색은 초기에 분홍색을 나타내나, 후반에는 분홍빛 갈색을 띠는 버섯으로 갓은 2~5센티이고, 대(자루) 2~6센티미터로 매우 질긴 편으로 식용으로 사용하기에는 너무 작은 버섯이다. 또한 활성이 좋은 *H. elastica*는 여름과 가을에 혼합림 주변의 길가와 구과 식물 주위에 홀로 또는 군생적으로 자라며 식용가능성은 아직 알려져 있지 않다.

실험 결과에서 나타난 바와 같이 많은 종류의 버섯에 활성이 좋은 fibrin 분해 물질이 존재함을 확인 할 수 있었다. 활성이 큰 버섯들이 갖고 있는 fibrin 분해효소가 혈전에 대한 선택성이 크고 또한 이 버섯들의 대량 재배가 가능할 경우 기존의 혈전용해제들이 갖고 있는 단점인 고가의 제품 대신 저가의 새로운 혈전용해제의 개발이 가능할 것으로 기대되며, 또한 이 실험 결과들은 새로운 혈전용해제 개발의 기초 자료로 중요하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

칠갑산에 자생하는 야생버섯 67종의 Fibrin 분해활성을 검색한 결과 *Marasmius pulcherripes*(종이꽃낙엽버섯)는 plasmin 0.75 units의 112%에 해당하는 fibrin 분해활성을 나타냈고, *Helvella elastica*(긴대안장버섯)는 60%, *Psathyrella* sp.는 49%, *Fomitella fraxinea*(장수버섯)은 40%, *Leucoagaricus rubrotinctus*(돌여우버섯)는 39%, *Lepista sordida*

(자주방망이버섯아재비)와 *Oudemansiella* sp.는 각각 41%, 26%의 fibrin 분해활성을 나타냈다. 그러나 광대버섯과, 그물버섯과, 끈적버섯과, 난버섯과, 무당버섯과, 귀신그물버섯과, 독청버섯과, 피꼬리버섯과, 불로초과, 소나무비늘버섯과, 바구니버섯과, 말뚝버섯과, 어리알버섯과, 붉은목이과 및 술잔버섯과의 버섯은 모두 활성을 나타내지 않았다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 상지대학교 연구비 지원(연구년제)으로 이루어졌음을 밝히며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 김승호. 1998. 된장의 기능성에 대한 새로운 연구방향-혈전용해능에 관하여. 한국공연구회지 **15**: 8-15.
- 김준호. 2000. 할미송이버섯으로부터 혈전용해효소의 정제 및 특성 연구. 한국균학회지 **28**: 60-65.
- _____, 김양선. 1998. 팽나무버섯으로부터 Fibrinolytic enzyme의 정제 및 특성 연구. 한국균학회지 **26**: 583-588.
- _____, 이호용, 유관희, 김양선, 석순자, 김양섭. 1998. 치악산 버섯추출물로부터 Fibrin 분해활성의 검색. 한국균학회지 **26**: 589-593.
- 김진숙, 최웅철, 김혜령, 이종길, 이정옥, 정경수, 심미자, 김병각. 1983. 한국산 고등 균류의 성분 연구(제 37보). 한국균학회지 **11**: 151-157.
- 안덕균. 1992. 한국산 약용 균류. 한국균학회지 **20**: 154-166.
- 정훈. 1998. 버섯류를 이용한 의약품의 개발. 미생물과 산업. 한국미생물학회지 **24**: 30-41.
- Chung, K. H. and Kim, D. S. 1992. Fibrinolytic and coagulation activities of Korean snake venoms. *Korean Biochem. J.* **25**: 696-701.
- Gavrilova, V. P. and Falina, N. N. 1975. (Russ) Proteolytic enzyme isolated from a fungus, *Flammulina velutipes* (Fr) Sing. *Mikol. Fitopatol.* **9**: 431-433.
- Haverkate, F. and Traas, D. W. 1974. Dose-response curves in the fibrin plate assay. Fibrinolytic activity of protease. *Thromb. Haemostas* **32**: 356.
- Kim, H. K., Kim, G. T., Kim, D. K., Choi, W. A., Park, S. H., Jeong, Y. K. and Kong, I. S. 1997. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish. *J. Ferment. Bioeng.* **84**(4): 307-312.
- Kim, J. H. and Kim, Y. S. 1999. A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **63**(12): 2130-2136.
- Kim, Y. T., Kim, W. K. and Oh, H. S. 1995. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from ChungKook-Jang. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 1-5.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. and Randall, A. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Shin, H. H. and Choi, H. S. 1998. Purification and partial characterization of a metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *J. Microbiol.* **36**: 20-25.
- Park, Y. D., Kim, J. W., Min, B. G., Seo, J. W. and Jeong, J. M. 1998. Rapid purification and biochemical characteristics of *Lumbrokinase III* from earthworm for use as a fibrinolytic agent. *Biotechnol. Lett.* **20**(2): 169-172.