

연구노트

## 인공재배 버섯의 혈전분해효소 활성검색

최한석 · 김명곤<sup>1\*</sup> · 박효숙<sup>2</sup> · 김재성<sup>3</sup> · 심명화<sup>3</sup> · 김성준<sup>3</sup>

전북대학교 식품공학과, <sup>1</sup>익산대학 특용작물가공과, <sup>2</sup>원광대학교 농화학과, <sup>3</sup>조선대학교 유전공학과

## Screening of Fibrinolytic Activities from Cultured Mushrooms

Han-Seok Choi, Myung-Kon Kim<sup>1\*</sup>, Hyo-Suk Park<sup>2</sup>, Jae-Sung Kim<sup>3</sup>,  
Ming-Hva Shen<sup>3</sup>, and Sung-Jun Kim<sup>3</sup>

Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University

<sup>1</sup>Department of Industrial Crop Production and Processing, Iksan National College

<sup>2</sup>Department of Agricultural Chemistry, Wonkwang University

<sup>3</sup>Department of Genetic Engineering, Chosun University

**Fibrinolytic activities of cultured medium and mycelium from 13 selected culturable mushrooms ranged 0.00-0.16 U and 0.00-0.48 U, respectively. Dry cell weight of *Armillaria mellea* was 6.50 g/100 mL, 1.9-5.0 fold higher than other tested mushrooms. Among artificially cultured mushroom fruiting bodies tested, fibrinolytic activity was lowest in *Hericium erinaceus* (0.17 U) and highest in *Pleurotus ferulea* (0.94 U).**

**Key words:** fibrinolytic activity, mycelium, mushroom, fruit body

### 서 론

현재 지구상에는 약 15,000종 이상의 버섯이 존재하는 것으로 알려져 있으나(1) 국내에는 1,600여종이 자생하고 있으며 이중 400여종이 식용가능 한 것으로 보고되어 있다(2,3). 특히, 최근에 버섯은 항암, 뇌졸중, 심장병 등의 성인병에 대한 예방과 개선효과가 있는 것으로 평가되어 지고 있으며(3) 콜레스테롤 저하, 고지혈증 개선, 혈전분해, 혈압 및 혈당강하, 노인성 치매 개선 등에 이르기까지 여러 유효성분들이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다(4-6). 또한, 이와 같은 버섯의 기능성에 관한 연구가 많이 이루어지면서 버섯의 소비 촉진에도 많은 기여를 하고 있고 식용, 약용, 건강음료, 기호식품, 화장품, 기타 산업용 등 각종 버섯가공품들의 개발이 다양화되고 있는 추세이다.

혈관이 손상되면 출혈이 일어나고 지혈과정이 뒤따르며 손상된 부위의 조직이 재생되면 plasminogen의 활성화제인 plasminogen activator의 작용으로 plasmin이 활성화 되어 지혈과정 중 생성된 혈전을 용해시킴으로서 생체는 다시 정상상태를 유지하게 된다(7). 그러나 이러한 기전에 이상이 발생할 경우 체내에 혈전이 증가하게 되어 혈전증(thrombosis)을 유발할 수 있으며 이로 인하여 인체에 치명적인 손상을 줄 수 있다(8). 현

재 임상에서 사용되어지고 있는 혈전 용해제는 가격이 매우 높고, 경구 투여에 제한적이며, 반감기가 짧은 단점이 있다(9). 따라서 최근에는 지렁이(10), 뱀독(11) 및 각종 발효식품(12,13)으로부터 혈전용해제를 분리하고자 하는 시도가 있었다.

특히, 버섯류의 혈전분해효소를 이용하고자 Kim 등(3,14)은 치악산에서 자생하는 65종의 야생버섯 및 칠갑산에서 자생하는 67종의 야생버섯에 대한 혈전분해 효과를 검색하였으며, Choi 등(8) 역시 한국에서 자생하는 50여종의 버섯을 수집하여 이의 혈전분해 활성을 보고하기도 하였다. 그러나 야생버섯의 경우 아직까지 재배방법이 확립되어 있지 않거나 인공재배가 불가능한 것이 많아 적절한 시기에 채집하여야 하므로 원료수급에 많은 문제점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 현재 인공재배 가능한 버섯류를 대상으로 혈전분해 활성을 검색하였다.

### 재료 및 방법

#### 공시균주

균사체 및 균사체 배양액의 혈전분해 활성을 검색하기 위해 익산대학 특용작물가공과 균이학 실험실에서 보관중인 균주 13종을 공시 균주(Table 1)로 사용하였으며, 자실체의 혈전분해 활성은 팽이(*Flammulina velutipes*), 표고(*Lentinus edodes*), 양송이(*Agaricus bisporus*), 느타리(*Pleurotus ostreatus*), 새송이(*Pleurotus eryngii*), 노루궁뎅이(*Hericium erinaceus*), 아귀(*Pleurotus ferulea*)버섯을 대상으로 하였다. 팽이, 표고, 양송이, 느타리의 자실체는 시장에서 구입하였으며 그 외의 자실체는 톱밥배지에서 병재배 방법으로 생산된 것을 시료로 사용하였다.

\*Corresponding author: Myung-Kon Kim, Department of Industrial Crop Production and Processing, Iksan National College, Ma-dong, Iksan 570-752, Korea  
Tel: 82-63-850-0732  
Fax: 82-63-850-0729  
E-mail: kmyuko@iksan.ac.kr

### 균사체 배양

전라북도 종자보급소에서 구입한 태백보리 품종을 이용하여 17°C, 상대습도 80%에서 싹이 2 mm될 때까지 발아시켜 천일 건조한 것을 배지원료로 하였다. 건조된 엇기름에 4배의 증류수를 첨가하여 60°C에서 6시간 동안 당화한 뒤 pH 6.5, 11°Brix 농도로 조절 한 후 500 mL 삼각플라스크에 200 mL씩 분주하고 25°C, 100 rpm로 조절된 배양기에서 10일간 진탕배양 하여 그 배양여액 및 균사체를 시료로 이용하였다. 이후 건조 균체량은 105°C 건조법에 의해 측정되었다.

### 조효소액의 제조

조단백질 분리는 Healy 등(15)의 방법에 준하여 분리하였다. 즉, 배양물을 4°C, 600×g에서 30분간 원심분리하여 배양여액과 균사체를 분리시켜 각각을 회수하였으며 균사체는 멸균수로 2회 세척한 뒤 25 g(생체량)씩 평취하여 동량의 멸균수를 넣고 균질화한 후 4°C, 600×g에서 30분간 원심분리하여 상정액을 사용하였다. 이 후 배양여액 10 mL 및 균사체 추출물에 95% 에탄올(-70°C)을 서서히 가하면서 교반(최종에탄올 농도, 50%) 시킨 후 1시간 동안 4°C에서 교반하며 반응시켰다. 다시 4°C, 600×g에서 30분간 원심분리하여 상정액을 회수하고 최종 에탄올 농도를 70%로 하여 4°C에서 1시간 교반 후 0°C, 12,000×g에서 원심분리하여 생성된 침전물은 10 mM citrate-NaOH(pH 6.0)완충용액 0.5 mL 및 1.25 mL에 각각 용해시켜 조효소액으로 사용하였다. 자실체는 균사체의 조효소액 추출방법과 동일하게 제조하여 이용하였다.

### 혈전분해활성 측정

0.15 M NaCl 함유 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에 fibrinogen(Calbiochem Co.)을 최종농도 0.3% 되도록 완전히 용해시킨 용액 5 mL에 동량의 2% agarose 5 mL을 첨가하여 혼합한 후 용액에 thrombin(100 NIH unit/mL, Calbiochem Co.) 0.1 mL을 첨가하여 1시간 동안 실온에서 고화시켜 fibrin plate를 조제하였다. Fibrin plate에 지름 5 mm의 구멍을 만들어 각 조효소 추출물 20 µL와 대조구로 plasmin 1 unit(Calbiochem

Co.)를 첨가한 후에 37°C에서 12시간 반응시켜 plasmin 용해면적에 대한 시료의 상대적인 용해면적 비율로 환산하여 산출하였다.

## 결과 및 고찰

### 버섯균 배양액 및 균사체의 혈전분해활성

버섯균 배양 후 배양액 및 균사체의 혈전분해활성 그리고 균사체의 건조 균체량을 Table 1에 나타내었다. 배양액 조효소 추출물의 혈전분해 활성은 0.00-0.16 plasmin U/20 µL of crude enzyme(U)로 그 활성이 없거나 매우 낮았던 반면 장수, 만가닥, 영지, 느타리, 토끼털송편, 뽕나무버섯 균사체의 혈전분해 활성은 0.42 U 이상으로 배양액에 비하여 상대적으로 높은 활성을 보였다. 특히, 뽕나무버섯 균사체의 경우 0.42 U로 비교적 높은 활성을 가지고 있을 뿐만 아니라 실험에 이용된 다른 균보다 1.9-5.0배 높은 균체 생산량을 보였다. Kim 등(16)은 뽕나무버섯 균사체의 대량생산 가능성을 제시하였고 Choi 등(7)은 뽕나무버섯 배양액에 홍삼박을 첨가하였을 경우 혈전분해 활성이 65%정도 증가된다고 보고하였으며 Lee 등(17)은 뽕나무버섯 균사체의 혈전분해효소는 chymotrypsin계통의 분자량이 21 kDa 정도라고 보고하였다. 일반적으로 버섯 균사체는 직접 섭취가 가능하며 복잡한 설비 없이 좁은 면적에서 적은비용으로 생산할 수 있는 장점을 가지고 있어 혈전분해 기능성식품의 소재로 이용가능 할 것으로 판단되나 이에 관련된 연구가 많이 부족한 실정으로 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

### 자실체의 혈전분해활성

Fig. 1에 나타난 것처럼 인공 재배된 버섯 자실체의 혈전분해활성은 0.17-0.94 U로 버섯균의 종류에 따라 많은 차이를 보여주었다. 특히, 느타리과(Pleurotaceae) 버섯인 느타리, 새송이, 아귀버섯의 혈전분해 활성은 각각 0.54, 0.57, 0.94 U로 매우 높은 활성을 나타내었던 반면 팽이, 표고, 양송이, 노루궁뎅이버섯의 혈전분해활성은 0.23 U 이하로 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 아귀버섯은 새송이버섯의 변종으로써 영양학적 측면

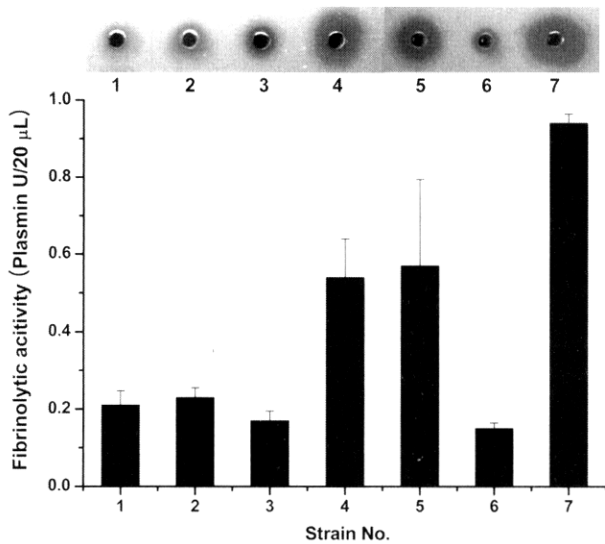
**Table 1. The list of mushroom species for the screening of fibrinolytic activity from the cultured medium and mycelium, and that of activity and dry cell weight**

No.	Strains Scientific name	Korean name	Fibrinolytic activity (Plasmin U/20 µL of crude enzyme)		Dry weight of mycelium (g/100 mL)
			Cultured medium	Mycelium	
1	<i>Coriolus versicolor</i>	구름버섯	0.10	0.00	1.70
2	<i>Lentinus edodes</i>	표고버섯	0.00	0.00	1.31
3	<i>Pleurotus eryngii</i>	새송이버섯	0.14	0.32	2.18
4	<i>Phellinus linteus</i>	상황버섯	0.06	0.00	1.61
5	<i>Fomitella fraxinea</i>	장수버섯	0.06	0.46	2.41
6	<i>Lyophyllum ulmarium</i>	만가닥버섯	0.09	0.46	2.91
7	<i>Hericium erinaceus</i>	노루궁뎅이버섯	0.00	0.00	1.65
8	<i>Elfvigia applanata</i>	잔나비겉상버섯	0.16	0.24	3.46
9	<i>Ganoderma lucidum</i>	영지버섯	0.11	0.48	2.37
10	<i>Pleurotus ostreatus</i>	느타리버섯	0.06	0.42	2.46
11	<i>Trametes trogii</i>	토끼털송편버섯	0.07	0.44	2.40
12	<i>Inonotus obliquus</i>	차가버섯	0.00	0.22	1.45
13	<i>Armillaria mellea</i>	뽕나무버섯	0.06	0.42	6.50

For the enzyme assays, enzyme extracts were obtained through EtOH (final conc. 50-70%) precipitation.

Fibrinolytic activity was assayed by fibrin agarose plate at 37°C for 24 hours and 20 µL of crude enzyme was employed for the assay.

문 헌



**Fig. 1. Fibrinolytic activity of artificial cultured mushroom fruiting body on 2% fibrin agarose plate.**

1: *Flammulina velutipes*, 2: *Lentimius edodes*, 3: *Agaricus bisporus*, 4: *Pleurotus ostreatus*, 5: *Pleurotus eryngii*, 6: *Hericium erinaceus*, 7: *Pleurotus ferulea*. Fibrinolytic activity is expressed as means  $\pm$  SD of triplicate.

에서도 풍부한 영양소를 가지고 있어(18) 기능성 소재로서 충분한 가능성을 가지고 있을 것으로 판단되나 생리활성에 대한 연구는 극히 미진한 실정이라서 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다. Kim과 Kim(19)은 뽕나무버섯 자실체의 혈전분해 활성은 ammonium sulfate(30-80%, w/v) 분획에서 0.41 U/mg protein 가진다고 보고하여 균사체의 활성과 유사하였다. 또한, 김 등(3)은 갈갑산에 자생하는 버섯 67종의 혈전분해 활성을 검색한 결과 종이꽃낙엽버섯(*Marasmius pulcherripes*)이 0.84 U로 가장 높았다고 보고하였고 Kim 등(14)과 Choi 등(8) 역시 각각 65종 및 50여종의 야생버섯에 대한 혈전분해 활성을 검색해 보고한바 있다. 그러나 야생버섯의 경우 균분리가 어려우며 재배 조건이 확립되어 있지 않거나 까다롭기 때문에 자연으로부터 채취 하여야하는 큰 문제점을 가지고 있어 산업적으로 적용하기는 어려운 것으로 생각되며, 인공재배버섯 또한 생산기간이 길다는 단점을 가지고 있어 산업적으로는 균사체를 이용하는 것이 유리할 것으로 판단된다.

요 약

인공재배 가능한 버섯 13종을 선정하여 균사체 배양 후 배양액 및 균사체의 혈전분해활성을 검토한 결과 배양액에서는 0.00-0.16 U 매우 낮았던 반면에 균사체의 혈전분해 활성은 0.00-0.48 U로 배양액에 비하여 상대적으로 높은 활성을 보였다. 또한, 뽕나무 버섯의 건조 균체량은 6.50 g/100 mL로 다른 균체에 비하여 1.9-5.0배의 높은 생산력을 보여주었다. 인공 재배된 버섯 자실체(7종)의 혈전분해활성은 0.17-0.94 U로 나타났으며 야위버섯 자실체의 혈전분해 활성이 가장 높게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농림기술관리센터 기획연구과제 연구비 지원에 의해 수행된 연구의 일부로 연구비지원에 감사드립니다.

1. Kim MK, Kim HM, Nha ES, Yoo SH, Chai JK, Hong JS. Mushroom biology. Hakmunsa, Seoul, Korea. p. 10 (2002)
2. Lee JY. Additional list of recorded mushrooms in Korea (from 2001 to 2004). Korean J. Micol. 33: 54-57 (2005)
3. Kim JH, Yoo KH, Seok SJ, Kim YS. Screening of fibrinolytic activities of extracts from wild mushrooms collected in Mt. Chilgap of Korea. Korean J. Micol. 33: 18-21 (2005)
4. Chang ST, Miles PG. Mushroom science. pp. 3-25. In: Edible mushroom and their cultivation. CRC press, Inc., Boca Raton, FL, USA. (1989)
5. Kawagishi H, Shimada A, Mori H, Okamoto KF, Sakamoto H, Furukawa S. Erinacines D, a stimulator of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Heridium erinaceum*. Heterocyclic Comm. 2: 51-54 (1996)
6. Mizuno T. Yamabushitake, *Heridium erinaceum*: bioactive substances and medical utilization. Food Rev. Int. 11: 173-178 (1995)
7. Choi HS, Kim MK, Park HS, Kim JS, Kim SJ. Effect of various plants extracts on the mycelial growth and fibrinolytic activity of *Armillaria mellea*. Korean J. Micol. 33: 11-17 (2005)
8. Choi NS, Seo SY, Kim SH. Screening of mushrooms having fibrinolytic activity. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 553-557 (1999)
9. Reed GL, Lin LF, Parhaml-Seren B, Kussie P. Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of streptokinase-plasminogen activator complex. Biochem. 34: 10266-10271 (1995)
10. Mihara H, Sumi H, Yoneta T, Mizumoto H, Ikeda R, Seiki M, Maruyama M. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus fubellus*. Jpn. J. Physiol. 41: 461-468 (1991)
11. Chung KH, Kim DS. Fibrinolytic and coagulation activities of Korean snake venoms. J. Korean Biochem. 25: 696-701 (1992)
12. Fujita M, Nomura K, Hong K, Ito Y, Asada A, Nishimuro S. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean fermented food in Japan. Biochem. Biophys. Res. Comm. 197: 1340-1347 (1993)
13. Sumi H, Nakajima N, Yatagai C. A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack "Shiokara" a Japanese traditional fermented food. Comp. Biochem. Pytosiol. 112B: 543-547 (1995)
14. Kim JS, Lee HY, Yoo KH, Kim YS, Seok SJ, Kim YS. The screening of fibrinolytic activities of extracts from mushrooms in Mt. Chiak. Korean J. Mycol. 26: 589-593 (1998)
15. Healy V, O'Connell J, McCarthy TV, Doonan S. The lysine-specific proteinase from *Armillaria mellea* is a member of a novel class of metalloendopeptidases located in basidiomycetes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 262: 60-63 (1999)
16. Kim MK, Choi HS, Park HS, Kim SJ. Optimal condition for mycelial production of *Armillaria mellea*. Korean J. Micol. 31: 187-191 (2003)
17. Lee SY, Kim JS, Kim JE, Sapkota K, Shen MH, Kim S, Chun HS, Yoo JC, Choi HS, Kim MK, Kim SJ. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. Protein Express. Purif. 43: 10-17 (2005)
18. Hong, KH, Kim BY, Kim HK. Analysis of nutritional components in *Pleurotus ferulea*. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 563-567 (2004)
19. Kim JS, Kim YS. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Armillaria mellea*. Korean J. Micol. 26: 583-588 (1998)

(2005년 8월 9일 접수; 2005년 10월 14일 채택)