

상황버섯(*Phellinus linteus*) 균사체로부터 항혈전 생산의 최적화

서호찬*

국제뇌교육종합대학원대학교 뇌교육학과

Optimization of Anticoagulant Production from *Phellinus linteus* Mycelia

Ho-Chan Seo*

Department of Brain Education, University of Brain Education, Cheonan 330-841, Korea

(Received 20, July 2011., Accepted 25, July 2011)

ABSTRACT : To produce the functional food materials, 50 kinds of the mycelial extracts from edible mushroom were examined for anticoagulant activity and *Phellinus linteus* showed the highest activity through the activated partial thromboplastin test (aPTT). The maximum production of anticoagulant activity and the mycelial growth was observed in culture medium containing soluble starch 3.0%, peptone 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, K_2HPO_4 0.1% and in the culture conditions controlled at initial pH 7.0, 30°C and 150 rpm by the rotary shaker. In addition, the maximum production of mycelial dry weight was 7.5 mg/mL after 10 days under the optimal conditions, and anticoagulant activity was reached to 390 sec in 5 L-jar fermentor.

KEYWORDS : Anticoagulant, Mycelia, *Phellinus linteus*

서 론

현대인의 사망률 중 혈관 장애에 의한 순환기계 질환으로 사망자가 많은 수를 차지하고 있다. 이러한 순환기계 질환은 혈류부전, 혈관상해, 고혈압 등으로 나타나는데 이는 혈관 내에서 생성된 혈전이 원인이다. 혈전은 정맥 및 동맥에서 혈액의 순환을 방해하여 조직으로의 영양공급 및 산소공급을 차단함으로써 뇌출혈, 뇌혈전, 심부전, 심근경색, 동맥경화 등의 질환을 일으킨다(윤 등, 1986). 이에 따라 성인병의 중요한 치료제로서 혈전형성을 방지하고 생성된 혈전을 용해하는 용해제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(김 등, 1990; 윤 등, 1993; 윤 등, 1995; 백 등, 1995).

현재 항혈전제로는 유기 합성 제제인 coumarin과 warfarin, 소의 심장이나 돼지의 소장에서 추출한 heparin, 거머리에서 분리한 hirudin 등이 알려져 있다. Coumarin은 생체 투입 후 8~12시간이 지나서 항혈전 활성을 나타내며 소화관에서 쉽게 흡수되므로 내복용 항혈전제로 이용되고 있다. Heparin은 sulfated glucosamine과 glucuronic acid로 중합되어진 sulfated mucopolysaccharide로서 정맥주사 시 내인성 경로의 prothrombin activator의 형성을 억제하거나 이미 형성된 thrombin의 저해제인 antithrombin III의 활성을 증강시킴으로서 강력한 항혈전 활성을 나타낸다. Hirudin은 직접적으로 thrombin에만 작용하여 항혈전 활성을 나타

내는 단백질이다. 이러한 항혈전제들은 반감기가 1~2시간으로 매우 짧고 장기적으로 사용할 때 혈소판 감소, 출혈, 골다공증의 부작용이 나타나고 분자량이 크고 극성이어서 세포막 통과가 불량하여 소화관에서 흡수되지 않으므로 주로 정맥내 혹은 피하주사를 해야 한다는 결점을 가지고 있다(김 등, 1992; 김 등, 1993; 김영식, 1990).

담자균류인 버섯은 특유의 맛과 향을 가지고 있고 탄수화물, 단백질, 비타민, 무기질과 같은 영양소를 골고루 함유하고 있으며 항암활성, 면역증강효과 및 항산화 효과 등의 약리효과 때문에 건강식품 및 의약품 소재로 많이 이용되고 있다(Lee and Bang, 2001). 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 분류학적으로 소나무 비늘버섯과(Hymenochaetaceae) 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색부후균으로 항암력이 매우 우수한 버섯으로 관심의 대상이 되고 있다(Choi 등, 1996). 상황버섯(*P. linteus*)의 자실체 열수 추출물은 위암, 식도암, 십이지장, 결장암, 직장암 등의 소화기 계통의 암(Ikekawa et al, 1968)을 비롯하여 간암 수술 후 화학요법을 병행할 때 면역기능 향진에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 자궁출혈, 월경불순, 장출혈, 오장기능을 활성화시키고 해독작용을 하는 것으로 알려져 있다(Kim et al, 2003; Kim et al, 2004; Orange and Ballas, 2006).

상황버섯은 희귀 한방 약재로 각광받지만 인공 배양에 의한 자실체 생산은 배양 기간이 길고 버섯 재배기술의 부족과 비효율적인 재배사 구조, 종균의 적기 구입으로 인한 부담으로 생산에 어려움이 작용하지만 액체 배양에 의한 균

*Corresponding author <E-mail : hcaseobravo@ube.ac.kr>

사체 생산은 항상 일정한 조건에서 배양이 가능하므로 품질이 우수한 균사체를 저비용으로 대량 생산이 가능하며 자실체 형성을 필요로 하지 않고 단지 생리 활성물질의 생산이 목적이려면 고체 배양보다 매우 유리한 조건을 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 상황버섯으로부터 항혈전 물질과 균사체를 생산하기 위하여 액체 배양의 최적 생산조건을 검토하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선별

항혈전 활성균주를 선별하기 위해 보관균주(고려대학교 생명공학연구소) 30여종과 양주 임업협동조합(양주시, 경기도)에서 분양 받은 20여종의 균주를 대상으로 PDB (potato dextrose broth) 배지에 25°C에서 25일간 배양하였다. 배양 후, 균사체 생산과 항혈전 활성이 뛰어난 균주를 1차적으로 선별하고 이 선별균주를 상기의 배양조건에서 배양을 하여 배양 상등액이 제거된 균사체를 대상으로 항혈전 활성이 뛰어난 균주를 최종균주로 하였다.

종균생산

종균 생산을 위한 배지는 PDA (potato dextrose agar, Difco, Sparks, MD)로 하였으며 배양접시 중심부에 버섯 균주를 접종하여 30°C, 7일간 배양한 후, 콜크보오러(지름 8 mm)로 배지상의 균사를 punching하여 제조된 disk 5개를 종균으로 사용하였다.

사용배지 및 배양조건

항혈전 활성의 최적 배양조건을 검토하기 위한 배지는 PDB를 기본배지로 하여 200 mL를 500 mL baffle flask에 넣고 초기 pH 7.0, 30°C, 120 rpm에서 7일간 배양하였다. Fermentor((주) 이노바이오, 금산군, 충남) 배양은 5 L 배양조에 working volume을 2 L로 하여 상기와 동일한 환경조건에서 배양하였다.

균사체량 측정

균사체량 측정은 103~105°C의 건조기에서 미리 건조한 유리섬유(Whatman G/FB, Maidstone, England)에 배양된 시료 10 mL를 여과하여 2시간 건조시킨 후, desiccator에서 방냉 후의 무게와 여과 전의 유리섬유 무게의 차이로 측정된 다음 건조 균사체량 (mg/mL)으로 환산하였다.

항혈전 활성물질의 추출

균사체의 항혈전 활성물질을 추출하기 위하여 배양된 액상배지를 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분리하고 얻어진 균사체를 여과지(whatman No. 42)로 여과시킨 후, 증류수로 3회 세척하고 동결건조를 하였다. 동결건조된 균사체를 aluminium oxide와 함께 막자사발에 넣어

분쇄하고 열수추출을 4시간동안 행한 후, 원심분리(5,000 rpm, 30분, 한일과학산업(주), 인천)하여 얻어진 상등액을 동결건조하여 균사체의 열수추출물을 항혈전 활성의 시료로 이용하였다.

항혈전 활성의 측정

항혈전 활성은 혈장 응고 활성 측정법(Activated partial thromboplastin time, aPTT)을 이용하여 측정하였다. 시료를 함유한 100 µL의 혈장(platelet pool plasma)을 aPTT 진단시약 100 µL와 혼합한 후 37°C에서 3분간 예열한 다음 37°C에서 미리 예열된 20 mM CaCl₂ 100 µL를 가한 후 blood coagulation analyzer (BC 2210, (주)京都第一科學, Japan)를 사용하여 응고가 될 때까지의 시간을 기록하였으며 대조구는 순수한 혈장 100 µL를 이용하여 응고시간을 측정하였다.

Periodate 산화

열수 추출물 20 mg을 취하여 acetate buffer(pH 4.5, 10 mL)에 용해시킨 후, 50 mM NaIO₄ 5 mL를 가하여 4°C의 암실에서 3일간 산화시켰다. 이 반응액에 ethylene glycol 5 mL를 가해 1시간 동안 실온에 방치한 후, 투석하여 NaBH₄ 20 mg을 가해 1시간 교반시켰으며 0.1 M acetic acid로 중화한 후, 투석 및 동결건조하여 항혈전 활성을 검토하였다(Yamada *et al.*, 1984).

Pronase 처리

열수 추출물 20 mg을 취하여 10 mM CaCl₂가 함유된 Tris-HCl buffer(pH 7.9, 20 mL)에 용해시킨 후, pronase (20 units)를 가하여 37°C에서 48시간 반응시켰다. 이 반응액을 100°C에서 5분간 가열, 반응을 정지시킨 후, 원심분리하여 얻은 상등액을 투석 및 동결건조하여 항혈전 활성을 조사하였다(Yamada *et al.*, 1984).

결과 및 고찰

항혈전 생산균주의 선별

항혈전 생산균주를 선별하기 위하여 보관균주 30여종과 임업협동조합에서 분양 받은 20여종의 균주를 PDB 배지에서 25°C, 25일간 배양하여 얻어진 균사체를 열수추출한 후 항혈전 활성을 측정하였다(Table 1). 각각의 항혈전 생산균주 중, *P. linteus*가 항혈전 활성이 167 sec로 다른 균주와 비교하여 볼 때 가장 뛰어난 것을 알 수 있었으며 최종균주로 선정되었다.

본 균주가 생산하는 항혈전 활성의 본체를 파악하기 위해 열수 추출물을 pronase 처리와 periodate 산화를 행한 후, 항혈전 활성을 측정하였다(Fig. 1). 그 결과 pronase로 처리한 시료는 무처리군과 비교하여 차이가 없었던 반면 periodate로 산화시킨 시료는 항혈전 활성이 크게 감소함

Table 1. Anticoagulant activity of hot-water extract from mushroom mycelia by liquid culture

Mushroom	Clotting time (sec)
<i>Grifola frondosa</i>	38.7
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	34.8
<i>Pleurotus osteratus</i>	37.2
<i>Lentinus edodes</i>	43.0
<i>Flammulina velutipes</i>	34.1
<i>Pholiota nameko</i>	37.5
<i>Phellinus linteus</i>	167.0
<i>Ganoderma lucidum</i>	34.8
<i>Lyophllum cinerascens</i>	37.1

*Cultivation was carried out at 25°C for 25 days in PDB medium.

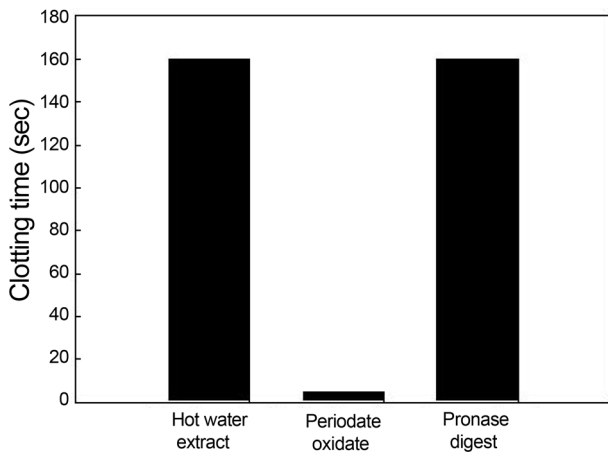


Fig. 1. Comparison of anticoagulant activity to periodate oxidate and pronase digest of hot water extract with *Phellinus linteus* Mycelia.

에 따라 *P. linteus*가 생산하는 항혈전 활성의 본체는 다당에 기인되는 것으로 추정되었다.

탄소원의 영향

선별균주 *P. linteus*의 항혈전 활성과 균사체 생육에 미치는 탄소원의 영향을 검토하기 위해 PDB 배지에 탄소원 3.0% 첨가하여 30°C, 120 rpm의 조건에서 7일간 배양한 후, 균사체 열수추출물에 대한 항혈전 활성을 조사하였다(Fig. 2). 그 결과 soluble starch가 320 sec의 가장 높은 항혈전 활성과 균사체 생육(6.2 mg/mL)을 보였으며 단당류와 함께 다당류에서 항혈전 활성과 균사체 생육이 높게 나타낸 것을 알 수 있었다. 이는 *P. linteus*의 균사체 생육에 대한 soluble starch 3.0%가 효과적이라 보고한 Song *et al* (1995)과의 결과와 일치하였다.

질소원의 영향

탄소원으로 3.0% soluble starch를 첨가한 기본배지에 각각의 무기태, 유기태 질소원을 첨가하여 항혈전 활성과

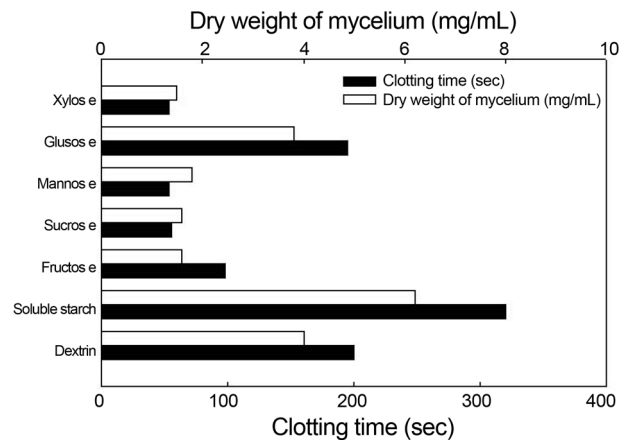


Fig. 2. Effects of carbon sources on mycelium growth and anticoagulant activity. Carbon sources of 3.0% (w/v) were added to potato dextrose broth (PDB) medium. Cultivation was carried out with rotary shaker controlled at 30°C and 120 rpm for 7 days.

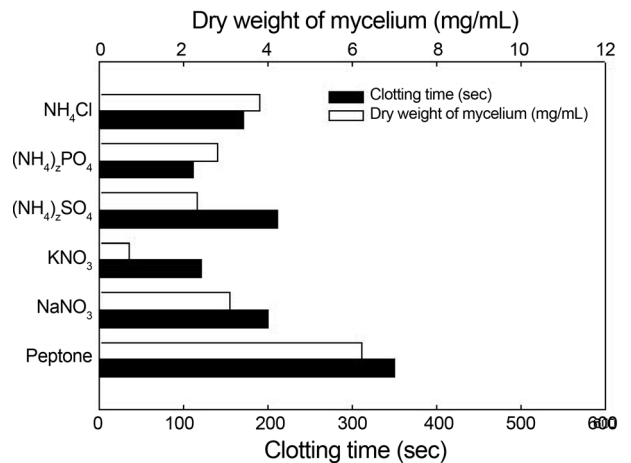


Fig. 3. Effects of nitrogen sources on mycelium growth and anticoagulant activity. Nitrogen sources of 0.1% (w/v) were added to PDB medium containing 3.0% soluble starch. Cultivation was carried out rotary shaker controlled at 30°C and 120 rpm for 7 days.

균사체 생육에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다. 항혈전 활성은 peptone, ammonium sulfate, sodium nitrate 순으로 균사체 생육은 peptone, ammonium chloride, sodium nitrate의 순으로 활성이 높았다. 0.1% peptone을 첨가하였을 때 가장 높은 항혈전 활성(350 sec)과 균사체 생육(6.2 mg/mL)을 나타내었으며 이의 결과는 Song *et al* (1995)이 보고한 *P. linteus*의 생육조건에서 peptone의 결과와 일치함을 알 수 있었다.

무기염의 영향

항혈전 활성과 균사체 생육에 미치는 무기염류와 금속 이온의 영향을 검토하기 위해 각각을 0.1%의 농도에서 상기에서 검토한 최적배지에 첨가하였다. 그 결과 Fig. 4에서와

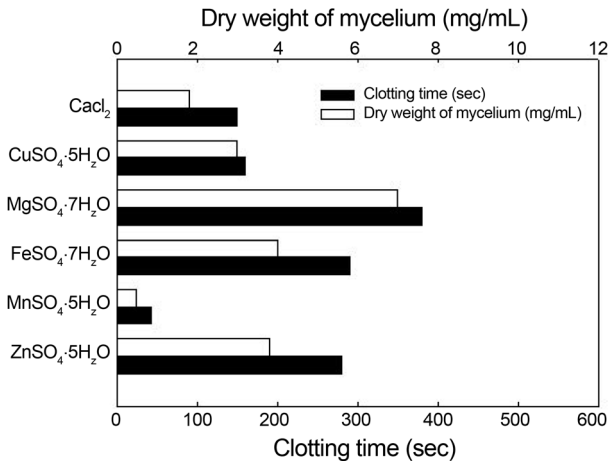


Fig. 4. Effects of inorganic salts on mycelium growth and anticoagulant activity. Cultivation was carried out at 30°C for 7 days with medium containing 3.0% soluble starch, 0.1% peptone.

같이 Mg²⁺, Fe²⁺ 및 Zn²⁺ 등의 첨가 시 항혈전 활성과 균사체 생육이 상승하였으나 Ca²⁺, Cu²⁺ 및 Mn²⁺에서는 균사체 생육이 감소하는 경향을 나타내었다. Mg²⁺ 첨가 시에는 항혈전 활성이 380 sec, 균사체 생육이 7.0 mg/mL로 가장 높은 활성을 나타내었다. Song *et al* (1995)의 보고에 의하면 Mg²⁺, Fe²⁺ 이온이 항혈전 활성과 균사체 생육에 촉진하고 Ca²⁺, Cu²⁺ 이온이 저해한다는 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 버섯 재배에서 K₂HPO₄는 ATP 생산에 필수적인 요소로 알려져 있으며 Choi *et al.* (1996)은 버섯의 경우 무기염류 중에서 K₂HPO₄의 결핍은 균사체 생육에 치명적이라고 보고하였다. 이에 K₂HPO₄ 농도를 0.05~0.2%로 달리하여 항혈전 활성과 균사체 생육을 살펴본 결과(Fig. 5) 0.1% 첨가 시에 가장 높은 항혈전 활성(390 sec)과 균사체 생육(8.5 mg/mL)을 보였다.

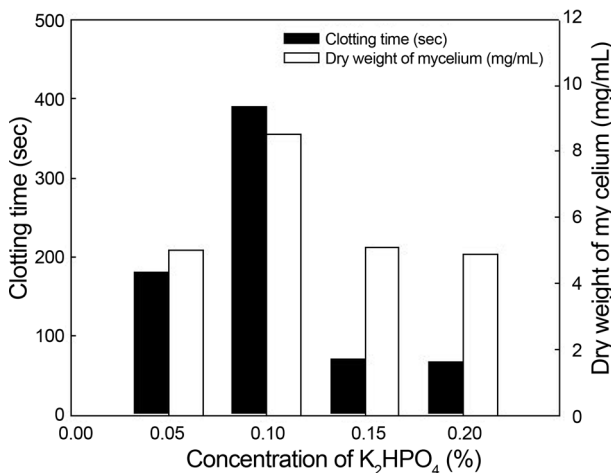


Fig. 5. Effects of K₂HPO₄ concentrations on mycelium growth and anticoagulant activity. Cultivation was carried out at 30°C for 7 days in medium containing 3.0% soluble starch, 0.1% peptone and 0.1% MgSO₄·7H₂O.

이상의 검토 결과들로부터 *P. linteus*의 항혈전 생산의 배지조건을 soluble starch 3.0%, peptone 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, pH 7.0으로 최적화시킬 수 있었다.

환경인자들의 영향과 fermentor 배양

본 균주의 항혈전 활성 및 균사체 생육과 관련된 환경인자인 pH, 배양온도를 최적화한 배지를 사용하여 검토하였다. pH를 3~9로 달리하여 조사한 결과 pH 7에서 380 sec의 항혈전 활성과 6.0 mg/mL의 균사체 생육을 나타냈다(Fig. 6). 배양온도를 10~40°C에서 조사한 결과 30°C에서 항혈전 활성이 380 sec로 최고값을 나타내었으며 균사체 생육은 6.0 mg/mL으로 나타냈다(Fig. 7).

이상의 결과들로부터 확립한 항혈전 생산용 최적배지에 *P. linteus*를 impeller speed 150 rpm, 배양온도 30°C 및 working volume 2 L로 한 5-L jar fermentor를 사용하여

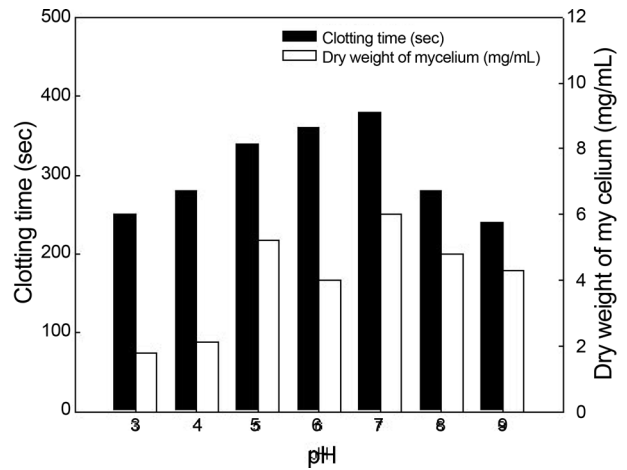


Fig. 6. Effects of pH on mycelium growth and anticoagulant activity. Cultivation was carried out at 30°C for 7 days in medium containing 3.0% soluble starch, 0.1% peptone and 0.1% MgSO₄·7H₂O and K₂HPO₄.

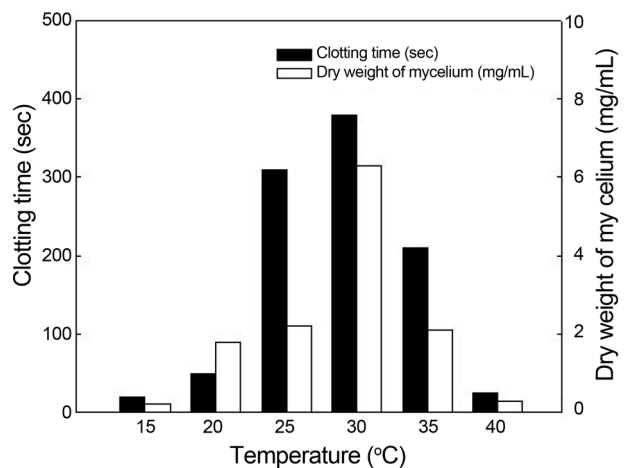


Fig. 7. Effects of temperature on mycelium growth and anticoagulant activity. Cultivation was carried out at 30°C for 7 days in medium containing 3.0% soluble starch, 0.1% peptone and 0.1% MgSO₄·7H₂O and K₂HPO₄.

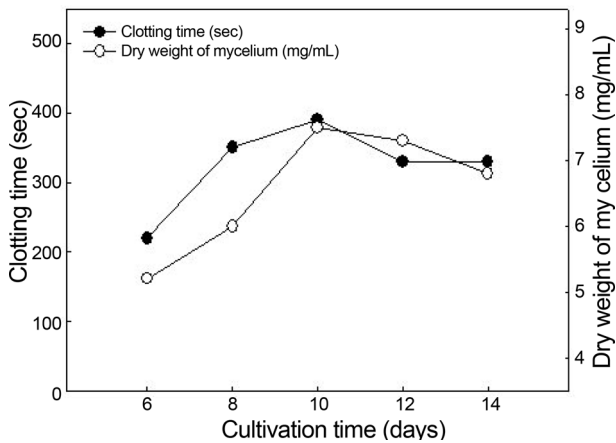


Fig. 8. Time course of mycelium growth and anticoagulant activity in jar fermentor. Cultivation was carried out under the following condition; working volume 2 L, impeller speed 30 rpm, 1 vvm, 30°C and initial pH 7.0.

검토한 배양시간에 따른 항혈전 활성과 균사체 생육의 변화는 Fig. 8과 같다. 균사체 생육과 함께 항혈전 활성도 증가하여 배양 10일에서 390 sec의 최대치를 보였으며 균사체 생육의 증가가 항혈전 생산에 영향을 미친다는 Song *et al.* (1995)의 보고와 일치함을 보였다.

적요

각종 버섯에서 항혈전 활성균주를 선별하기 위해 보관 균주 50여종과 임업협동조합에서 분양 받은 20여종의 균주를 대상으로 항혈전 활성을 검색한 결과, 항혈전 활성이 167 sec를 나타낸 상황버섯(*Phellinus linteus*)을 선별하였다. 본 균주가 생산하는 항혈전 활성의 본체를 파악하기 위해 pronase 처리와 periodate 산화를 행한 결과 pronase로 처리한 시료는 무처리균과 비교하여 차이가 없었던 반면 periodate로 산화시킨 시료는 항혈전 활성이 크게 감소함에 따라 *P. linteus*가 생산하는 항혈전 활성의 본체는 다당에 기인되는 것으로 추정되었다. 항혈전 생산을 위한 최적 배양조건은 soluble starch 3.0%, peptone 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, 초기 pH 7.0, 배양온도 30°C 및 교반속도 150 rpm이었다. 상기의 최적 배양조건에서 jar fermentor로

10일 배양하였을 때 390 sec의 항혈전 활성과 7.5 mg/mL의 균사체 생육을 나타내었다.

참고문헌

김영식, 노지은, 안형수, 박호균. 1992. 식물성 산성당으로부터 헤파리노이드의 제조. 약학회지 36(4):350-356.
 김영식, 노지은, 안형수. 1993. 지유로부터 분리한 다당류의 분석과 항응고 작용. 생약학회지 24(2):124-130.
 김영식. 1990. 헤파린; 구조와 활성. 생화학 뉴스 10(1):36.
 김제훈, 유영선, 맹미호, 윤혜숙. 1990. 소중 생약제제들의 혈소판 응집억제 작용. 생약학회지 21(2):126-129.
 백영숙, 송재경, 윤춘희, 정교순, 윤혜숙. 1995. 천마의 항혈소판, 항혈전 활성. 생약학회지 26(4):385-389.
 윤혜숙, 강삼식, 김문희, 정기화. 1993. Procatechuic acid 및 gallic acid 유도체들의 항혈전작용. 약학회지 37(5):453-457.
 윤혜숙, 김제훈, 이종남. 1986. 혈소판 응집 억제작용 생약의 검색 (II). 생약학회지 17(1):19-22.
 윤혜숙, 정교순, 김문희, 오재희. 1995. 수중 생약의 항혈전활성. 생약학회지 26(2):154-158.
 Choi, J. H., Ha, T. M., Kim, Y. H. and Rho, Y. D. 1996. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Kor J Mycol* 24:214-222.
 Ikekawa, J., Nakamishi, M., Uehara, N., Chihara, G and Fukuoka, F. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes especially *Phellinus linteus*. *Gann* 59:155-157.
 Kim, G. Y., Han, M. G., Song, Y. S., Shin, Y. I., Lee, H. J., Moon, D. O., Lee, C. M., Kwak, J. Y., Bae, Y. S., Lee, J. D. and Park, Y. M. 2004. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* induces toll-like receptors 2- and 4-mediated maturation of murine dendritic cells via activation of ERK, p38, and NF-kappaB. *Biol Pharm Bull* 27:1656-1662.
 Kim, G. Y., Oh, Y. H. and Park, Y. M. 2003. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* induces nitric oxide-mediated tumorecidal activity of macrophage through protein tyrosine kinase and protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 309:399-407.
 Lee, J. W. and Bang, K. W. 2001. Biological activity of *Phellinus* spp. *Food Industry and Nutrition* 6:25-33.
 Orange, J. S. and Ballas, Z. K. 2006. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* 118:1-10.
 Song, K. S., Cho, S. M., Lee, J. H., Kim, H. M., Han, S. B., Ko, K. S. and Yoo, I. D. 1995. B-lymphocyte stimulating polysaccharide from *Phellinus linteus*. *Chem Pharm Bull* 43:2105-2110.
 Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J. C., Kojima, Y., Kumazawa, Y. and Otsuka, Y. 1984. Studies of polysaccharide from *Angleica acutiloba*. part I. Fractionation and biological properties of polysaccharides. *Planta Med* 50:163-167.